

# 生物芯片技术的原理与应用

池晓菲,舒庆尧

(浙江大学原子核农业科学研究所,杭州 310029)

**摘要:**生物芯片是指将大量生物讯息密码(寡核苷酸、cDNA、基因组 DNA、蛋白质等)以预先设计的方式固定在玻片、硅片等固相载体上组成的密集分子阵列,可分为核酸芯片、蛋白芯片、芯片实验室三类。生物芯片技术的本质是生物信号的平行分析,它利用核酸分子杂交、蛋白分子亲和原理,通过荧光标记技术检测杂交或亲和与否,可迅速获得所需信息。高效、快速的生物芯片技术以其无与伦比的优势,已在医学、分子生物学等领域显现出巨大的应用价值,具有非常广阔的发展前景。

**关键词:**生物芯片;核酸芯片;蛋白芯片;芯片实验室;荧光标记技术

中图分类号:Q786

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)04-0370-05

## The Principle and Application of Bio-Chip Technology

CHI Xiao-fei, SHU Qing-yao

(Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Bio-chip is a molecular micro-array, which is composed of some biological message codes (e.g. oligonucleotides, cDNA, genome DNA, protein, and so on) arranged on solid surfaces in light of an engineering design in advance. There are three kinds of Bio-Chips, i.e., nucleic acid chip, protein chip, and chip "lab". The essence of Bio-Chip technology is a parallel analysis for biology message. It is based on the principle of nucleic acid molecule hybridization or protein immunochemistry. The occurrence of hybridization/immunoreaction is detected by fluo-labelled technology. Then the needed message can quickly be obtained. Efficient and fast Bio-Chip technology has already exhibited enormous applied value in medical science and molecule biology field because of incomparable superiority. Moreover, it possesses very wide development prospect.

**Key words:** bio-chip; nucleic acid chip; protein chip; chip "lab"; fluo-labelled technology

美国加州旧金山 Affymetrix 公司 Fodor 等从固相支持物上合成多肽中得到启发,灵活运用照相平版印刷、计算机、半导体、激光共聚焦扫描、寡核苷酸合成、荧光标记、DNA 分子杂交及分子生物学的其他技术研制成功了世界上第一块 DNA 芯片<sup>[1]</sup>。随后又酝酿了蛋白芯片、芯片实验室。生物芯片的出现充分体现了生物学技术与其他学科和技术的相互交叉和渗透。生物芯片技术是融微电子学、生命科学、物理学于一体的一项崭新技术,它使一些传统的生物学研究实验能在非常小的空间范围(指甲盖大小~“随身听”大小)内,以非常快的速度(几小时就可将一个人的不正常基因检测出来)完成。随着生物学技术的飞速发展,该技术越来越显示

出巨大的潜力和诱人的前景。在不久的将来,一场改变生命的“革命”即将发生,而生物芯片技术必将推动这场“革命”尽快到来。本文对该技术作了简单介绍,帮助读者对这一热点问题有一初步了解。

### 1 生物芯片技术的基本原理

生物芯片技术是 80 年代末才发展起来的一项新技术,它将生命的化学过程转化为一种可控制的静态形式,对这种形式的表现结果用计算机进行检测、分析。生物芯片中最早实现商品化的是 DNA 芯片<sup>[1]</sup>。DNA 芯片技术利用 DNA 分子可以变性、杂交的特性,通过 DNA 芯片上固定的探针或样

收稿日期:2000-11-30;修回日期:2001-01-08

作者简介:池晓菲(1977-),女,浙江金华人,硕士,专业方向:诱变遗传育种和生物技术。舒庆尧(1965-),男,浙江新昌人,教授,博导,现从事诱变遗传育种和生物技术方面的研究,通讯联系人, E-mail: qyshu@zju.edu.cn, Tel: 0571-6971202。

品 DNA 与游离的样品 DNA 或探针杂交来推断未知的靶分子,杂交发生与否可采用荧光标记技术检测。DNA 芯片技术比其他芯片技术更为成熟,目前应用也更广泛。蛋白芯片是生物芯片中极具挖掘潜力的一种芯片。它利用蛋白质分子间的亲和作用,检测样品中存在的特异蛋白。可在医学上应用的免疫芯片即是把抗体固定在芯片表面制备而成。但最理想的生物芯片是芯片实验室,它是一种微型化、无污染、全功能的“实验室”,包含了运算电路、显示器、检测以及控制系统,在“随身听”大小的一间“实验室”里可一次性完成芯片制备、样品处理、靶分子和探针分子杂交/亲和,以及信号检测、分析。

## 2 生物芯片的制备

生物芯片的制备利用了微阵列技术将成千上万的生物

讯息密码集中到一小块玻片、硅片等固相载体上组成密集分子阵列。下面以 DNA 芯片的制备为例,介绍生物芯片制备过程。

DNA 芯片的制备,即在控制条件下将大量 DNA 分子有规则地排列到载体上,是 DNA 芯片技术应用的前提和关键。制备方法因 DNA 芯片种类不同而有异,大致可分为两类:一是原位合成法<sup>[2-4]</sup>,即按预先设计的序列顺序有规律地在固相支持物上直接合成成千上万种不同的 DNA 片段,该法适用于寡核苷酸探针的合成;二是交联制备法<sup>[5]</sup>,即利用由电脑控制的点样装置将预先合成或制备的探针、cDNA、基因组 DNA 等按一定的排列顺序点在经特殊处理的载体上,通过共价交联或非共价吸附固定核酸分子,该法主要用于中、低密度芯片的制备,既适用于大片段的 DNA,也适用于小分子的寡核苷酸。

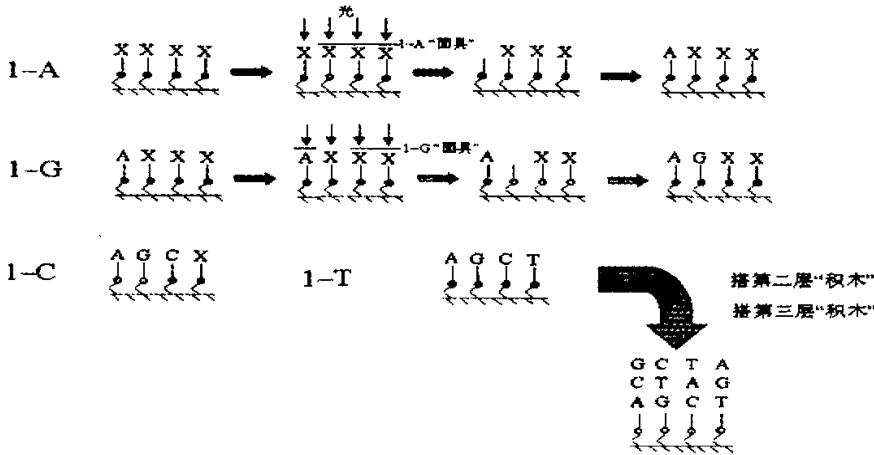


图 1 原位光控芯片合成示意图

注 \ \ \ \ 表示硅片等固相载体;●表示羟基;◁表示连接分子;X表示光敏保护基团。

Fig.1 DNA chip light-directed synthesis

原位合成法是目前制备高密寡核苷酸芯片最为成功的方法,主要有光控合成和标准试剂合成两种途径。原位光控合成技术由 Affymetrix 公司开发,它应用了固相化学、光敏保护及光刻技术,合成排列规则、种类丰富多样的寡核苷酸阵列。该法中,利用光敏保护基保护核苷酸的 5' 羟基,光照使之脱保护,DNA 的合成只发生在脱去保护基的地方,光照的区域即为合成的区域,合成过程可由一系列光刻掩膜或“面具”(mask)控制(如图 1 所示)。具体步骤是根据预先设计的探针序列,采用“搭积木”策略(有的称“盖瓦”策略)<sup>[6]</sup>进行固相合成。碱基有 A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)、G(鸟嘌呤)、C(胞嘧啶)4 种类型,每一个探针都是由 A、T、G、C 这 4 种“积木”由下而上合成的。对于一套 20bp 的探针,从立体上

看相当于有 20 层横断面,每一层都有 A、T、G、C 4 种类型。在制备时每一层的合成都有 4 个相应的“面具”。如在合成该层的 A 时,只需将该层的“A 面具”对应地在硅片上,用汞灯照射。只有要合成 A 的部位才有光透过,从而去除该部位羟基上的光敏保护基团,游离羟基。撤去面具,引进带相同保护基团的 A,利用化学反应,在这些相应部位加上 A;同样的原理,在该层“积木”上可分别加上 T、G、C。依此类推就可以将一层层积木搭起来,合成一整套探针。这种制备方法需要预先设计、制造一系列“面具”,造价较高;制造过程中采用光脱保护方式,“面具”孔径较小时会发生光衍射现象,制约了寡核苷酸密度的提高,且光脱保护不彻底,每步产率只有 92%~94%,只能合成 30nt 左右的寡核苷酸。McCall 将光

控合成技术与光敏抗蚀技术结合,以酸作为脱保护剂,解决了光衍射的难题,提高了芯片的密度,并增加了产率(达98%)<sup>[7]</sup>。标准试剂合成原理与喷墨打印相似,喷头根据芯片上不同部位探针序列的需要,将特定的碱基喷印到芯片的相应位置。该技术每步产率达98%,合成寡核苷酸的长度为40~50nt。

交联制备法根据排列设计,在固相表面点上不同的待测核酸分子或探针,利用它们与载体的交联将其固定在芯片上。点样可采用手工或自动方式,中、高密度芯片的制备须使用自动点样仪,目前自动点样仪速度可达2000单元/秒。载体的表面处理是交联制备芯片的首要步骤,处理方法因核酸分子的长度不同而不同。cDNA芯片的制备主要是利用cDNA与载体的共价交联或静电作用的非共价吸附,可采用多阳离子聚赖氨酸包被方法进行静电固定或紫外线照射等

产生共价交联。寡核苷酸与载体表面的交联以共价方式为主,寡核苷酸合成时需引入交联的活化基团。交联制备法有较为明显的优点,制备方式直接,不需原位合成那样复杂的技术;点样的样品可事先纯化;交联的方式多样,可方便地设计、制备符合需要的DNA芯片。但制备过程中样品用量大、浪费也较严重。

### 3 生物芯片技术的应用

作为分子生物学上一个重要的技术进展,生物芯片技术可在许多领域内应用,有些已成熟,有些则还处于探索阶段。本文以DNA芯片技术的几个较为成熟的应用为例,简要介绍生物芯片技术在分子生物学、医学等领域内的应用。

#### 3.1 DNA测序

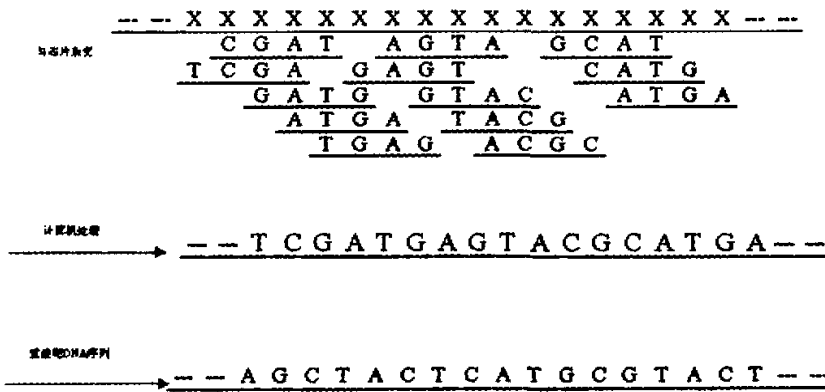


图2 DNA杂交测序

Fig.2 DNA resequencing

十几年前就已提出利用DNA芯片进行DNA测序<sup>[8]</sup>。其依据是杂交测序原理,短的标记寡核苷酸探针(一般为18~50个核苷酸)与靶DNA杂交,计算机扫描分析杂交谱,从而重建靶DNA序列。一般情况下,探针的序列越短,杂交所需时间也越短,如一个20mer核苷酸探针在0.1微克/毫升浓度下,10分钟就能达到最高限度的杂交率。带荧光标记的目标DNA与芯片上的探针杂交后,经检测器及处理器分析处理就可得出靶DNA序列(如图2所示),一次可测定较长片段的DNA序列。DNA芯片技术具有快速、准确等特点,应用该技术进行杂交测序有其他方法无可比拟的优越性。Murk Chee等利用这种方法验证性地对人类线粒体基因组测序,证明其准确率达99%<sup>[3]</sup>。

#### 3.2 基因诊断

随着生物学和医学的发展,已知人类有6000多种疾病

与基因有关,所以基因诊断,特别是致病基因如癌基因、肿瘤基因等的诊断对人类的健康和发展至关重要。DNA芯片可用于大规模筛查由点突变、插入及缺失等基因突变引起的疾病(如图3所示)。用于基因诊断的芯片一般是针对靶基因而特别设计的,利用分子杂交进行特定基因的确证。据报道,目前已研制出了检测艾滋病病毒(HIV)相关基因、囊性纤维化相关基因<sup>[9]</sup>、与肿瘤抑制有关的P53基因<sup>[10]</sup>、与乳腺癌相关的BRCA1基因<sup>[11]</sup>及监控药物代谢的CY450等20余种DNA芯片。用20mer包含有96600种寡核苷酸探针的高密DNA芯片检测到了遗传性乳腺和卵巢癌基因BRCA1全长3.45kb外显子11的突变<sup>[11]</sup>。在国内利用点样法已研制出乙型肝炎表面抗原诊断型DNA芯片,并成功地诊断了血清样本,其优点是只需少量血液样本。据最新报道,英国一家生物技术公司研制成功了用于检测人类基因的新型

DNA 芯片<sup>[12]</sup>,该芯片集成了多种遗传疾病的检测,能够检测的基因突变障碍多达 16 种类型,其中包括有关智力和遗传方面的基因。由于这项技术的高度准确性、高度自动化和高效率使其在分子诊断方面得到了广泛的应用。当人类所有

基因被解读后,科学家们预言可以利用 DNA 芯片检测人类 DNA 上所有的遗传突变位点,根据检测结果预测一个人患某种病的可能性,将每个人基因的改变与疾病表现联系在一起,从根本上了解病因。

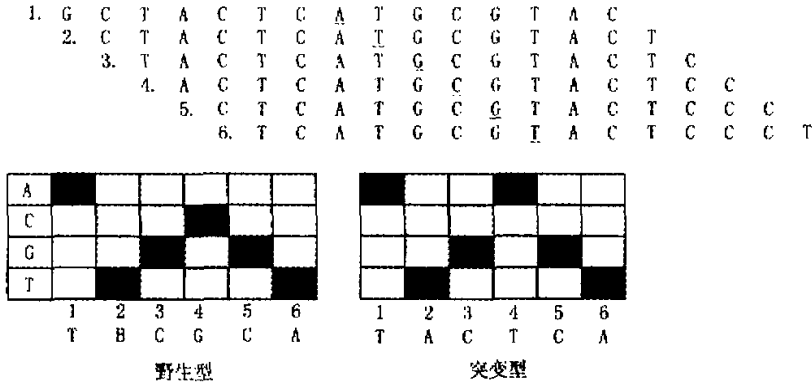


图 3 基因诊断及 DNA 测序

Fig.3 Gene diagnosing and DNA resequencing

■ 表示杂交信号;□ 表示未杂交信号。

3.3 基因表达研究

为了阐明基因有序表达的调节机制,需要研究各种外界因素控制条件下的基因表达,并对单个细胞的表达进行检测。转录水平的变化能灵敏地反映细胞表达状态,如细胞类型、所处阶段及反应敏感性等。DNA 芯片技术可直接检测 mRNA 的种类及其丰富度,该技术的快速发展和完善为 mRNA 水平研究的最终实现提供了可能性,是研究基因表达的有力工具。寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片各具特点,它们都可用于转录物的检测。Affymetrix 公司已研制出可用于检测基因表达水平的 DNA 芯片,成功地检测到了 T 细胞激活后基因的表达,并分析了 T 细胞系整个 RNA 群体中 21 个不相同 mRNA 的表达。研究表明,20 个左右探针即可准确检测一个基因,可检测的转录产物从几个数量级到每个细胞几个拷贝,现已可在一指甲大小的硅片上排列 40 万 ~ 100 万种含 20mer 的寡核苷酸探针,因而从理论上讲通常一块芯片可检测 100 000 多个目的基因。已知人类有 10 万个左右基因,通过直接测序等手段来了解功能基因的情况非常费时费力,而改用功能基因转录出来的 mRNA 与芯片杂交来研究功能基因的表达,用一块芯片就可检测全部人类基因转录产物,进而研究基因表达。另外,黑色素瘤细胞系 UACC-903 表达基因的检测试验结果证明,利用 DNA 芯片技术研究基因表达与 Northern 杂交结果非常一致。

3.4 后基因组研究

1996 年完成了第一个真核生物酵母基因组的 DNA 测

序;1998 年底完成了第一个多细胞生物线虫基因组测序;1999 年,英、美和日本的研究人员绘制出了人类 22 号染色体的蛋白编码基因完整序列,是人类第一条被完全测序的染色体;紧接着,2000 年初,人类 21 号染色体的基因序列也被完全测序;2000 年 6 月 26 日,美国、英国、法国、德国、中国等国科学家共同宣布,绘制完成了人类基因组草图<sup>[13]</sup>。研究的工作重点从基因结构方面的研究转向基因组功能的研究,标志着人类已进入了基因组测序完成后进行未知基因功能研究的后基因组时代。DNA 芯片技术将在生命科学和信息科学之间架起一道桥梁,依据自身的优势必将在后基因组时代起重要作用。酵母由于基因小、编码基因比例高及重复序列少而被作为模式生物。对生物的许多研究都从酵母开始,然后推广延伸。酵母中大约 70% 序列是编码可读框(ORF),据文献报道,酵母基因组中共有 6000 个 ORF,即在酵母中每 2kb 就可以找到一个蛋白编码序列。斯坦福大学的 Davis 研究小组利用 DNA 芯片定量分析了酵母缺失突变株 ORF 的生物学功能。Shoemaker 提出了一个新的策略,即在酵母基因组每个 ORF 中引入“分子条形码”(20 个核苷酸的标志序列),并与 DNA 芯片上的探针杂交,用于平行筛选大量缺失的突变群体<sup>[14]</sup>。人类基因组计划(HGP)正在以超过原定速度的进展实施,预计人类基因组的全序列测定能提前两年于 2003 年完成,到时,能在同一时刻检测上万乃至几万个基因功能的 DNA 芯片更被人们关注。

3.5 芯片实验室的应用

芯片实验室可防止污染,使分析过程自动化,能大大提高分析速度和多样品分析能力,而且设备体积小,便于携带。因此,它被认为是最理想和最具潜力的一种生物芯片,已引起了各国生命科学界和工业界的注意,目前国内外许多科研机构已在研究芯片实验室。1998年6月,Nanogen公司的程京博士及其同事首次报道了利用芯片实验室从混有大肠杆菌的血液中成功地分离出了细菌,破坏细胞之后用蛋白酶K孵化脱蛋白,得到纯化的DNA,经分析证实提取物为大肠杆菌的DNA<sup>[15]</sup>。该研究向实现创建芯片实验室的最终目标,即将原始样品制备、生物化学反应以及获取所需信息的整个分析过程集成化,迈出了决定性的一步。相信不久的将来,各种芯片实验室将不断涌现,利用芯片实验室将在生命科学、医学、食品检验防疫等方面不断取得突破。

#### 4 应用前景

尽管生物芯片技术还处于萌芽期,但在国内也已经引起了足够的重视,由于其巨大的分析能力,极少的样品用量,简便、快速、高效的使用方式,未来的生物学研究越来越可能在生物芯片上进行。这种趋势表明许多基于凝胶和薄膜的方法将最终让位给生物芯片。当然生物芯片技术想要被广泛采用必须降低芯片成本(现在一块芯片要几百美元至上千美元),但生物芯片技术的应用前景是乐观的。随着大量基因序列的确定,生物芯片技术为生物内部的生命信息的处理和应用提供了可靠的手段,对推动农业、人口、健康和环境等核心问题将发挥重大的作用。国外生命科学界、工业界和医学界等都认为生物芯片将会给21世纪整个人类生活带来一场“革命”。现在,又开发了几种新的生物芯片,如材料芯片、药物芯片等生物芯片。纳米材料目前研究得很多,DNA芯片在纳米电子学中已有应用。的确,在不久的将来,这种以多学科、多项技术相互融合产生的工具和手段的广泛应用对生物学领域的发展将起重要的推动作用。

#### 参考文献(References):

- [1] Fodor S P A, Read J L, Pirrung M C, Stryer L, Tsi L A, Solas D. Light - directed, spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. Science, 1991, 251: 767 - 773.
- [2] Pease A C, Solas D, Sullivan E J, Cronin M T, Holmes C P, Fodor S P A. Light - generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5022 - 5026.
- [3] Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang X C, Stern D, Winkler J, Lockhart D J, Morris M S, Fodor S P A. Accessing genetic information with high - density DNA arrays [J]. Science, 1996, 274: 610 - 614.
- [4] Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, Follettie M T, Gallo M V, Chee M S, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown E L. Expression monitoring by hybridization to high - density oligonucleotide arrays [J]. J Nat Biotechnol, 1996, 14: 1675 - 1680.
- [5] Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. Science, 1995, 270: 467 - 470.
- [6] Bertrand L, Aseph A, Mark S. Overview of DNA chip technology [J]. Molecular Breeding, 1998, 4: 277 - 289.
- [7] McCall G, Labadie J, Nguyen T, et al. Light - directed synthesis of high - density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists [J]. J Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 13555 - 13560.
- [8] Bains W, Smith G C. A novel method for nucleic acid sequence determination [J]. J Theor Biol, 1988, 135: 303 - 307.
- [9] Cronin M T, Fucini R V, Kim S M, Masino R S, Wespi R M, Miyada C G. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light - generated DNA probe arrays [J]. Hum Mut, 1996, 7: 244 - 255.
- [10] 吴水清, 邹宗亮, 王升启. 利用基因芯片技术检测 P53 基因突变 [J]. 生物工程进展, 2000, 20(4): 40 - 43.
- [11] Hacia J G, Brody L C, Chee M S, Fodor S P A, Collins F S. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two - colour fluorescence analysis [J]. Nat Genet, 1996, 14(4): 457 - 460.
- [12] 滕北. 检测人类基因的新型 DNA 芯片 [J]. 科学, 2000, 51(6): 36.
- [13] 王颖. 基因组生物技术的研究现状及应用 [J]. 生物学杂志, 2000, 17(5): 4 - 6.
- [14] Shoemaker D D, Lashkari D A, Morris D, et al. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar coding strategy [J]. J Nat Genet, 1996, 14: 450 - 456.
- [15] Cheng J, Sheldon E L, Wu L, Uribe A, Gerrue L O, et al. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(6): 541 - 546.