

微流控芯片技术及其在检验医学中的应用

岳志红 张 正

(北京大学人民医院检验科 北京 100044)

摘 要 芯片实验室技术作为基因组学和蛋白质组学研究的一种新的技术平台,受到广泛重视。其中微流控芯片可用于基因组学和蛋白质组学的各个领域,包括基因表达分析、基因多态型分析和临床诊断等,可以完成样品的分离、反应和分析等所有步骤。基于毛细管电泳的微流控芯片技术可以更快地完成 PCR 产物分离。本文介绍微流控芯片技术的原理、研究进展及其在检验医学中应用。

关键词 微流控芯片 毛细管电泳 检验医学

经典实验室的规模正在缩小,最近出现的新名词“芯片实验室”(Lab-on-a-Chip)、“芯片工厂”(Factory-on-Chip)等证明这种发展趋势。芯片实验室是系统集成和微刻技术发展的结晶,是可以完成生物化学分析的微型芯片。最完整形式的芯片实验室可以完成样品的预处理、分离、稀释、混合、化学反应、检测以及产品的提取等所有步骤,因此也称为微完全分析系统(micro Total Analytical System, μ TAS)。它不仅可以提高分析速度、增加分析效率、大大降低样品和试剂消耗,而且可使分析过程自动化、排除人为干扰、防止污染以及完成自动高效的重复实验。目前已进入检验医学的微流控芯片(Microfluidic chip)是此项技术的代表。

1 技术原理

微型芯片根据其结构和工作机理可分为两大类:微阵列芯片(Microarray chip)和微流控芯片。微流控芯片采用类似半导体的微机电加工技术在芯片上构建微流路系统,将实验与分析过程转载到由彼此联系的路径和液相小室组成的芯片结构上。加载生物样品和反应液后,采用微机械泵、电水力泵和电渗流等方法驱动芯片中缓冲液的流动,形成微流路,于芯片上进行一种或连续多种的反应。激光诱导荧光、电化学和化学等多种检测系统以及与质谱等分析手段结合的很多检测手段已经被用在微流控芯片中,对样品进行快速、准确和高通量分析¹。微流控芯片的最大特点是在一个芯片上可以形成多功能集成体系和数目众多的复合体系的微全分析系统。微型反应器是芯片实验室中常用的用于生物化学反应的结构,如毛细管电泳、聚合酶链反应²、酶反应和 DNA 杂交反应的微型反应器等³。其中电压驱动的毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)比较容易

在微流控芯片上实现,因而成为其中发展最快的技术⁴。它是在芯片上蚀刻毛细管通道,在电渗流的作用下样品液在通道中泳动,完成对样品的检测分析。如果在芯片上构建毛细管阵列,可在数分钟内完成对数百种样品的平行分析(其模式示意图见图1)。自1992年微流控芯片CE首次报道以来,进展很快。首台商品仪器是微流控芯片CE(生化分析仪, Agilent),可提供用于核酸及蛋白质分析的微流控芯片产品。

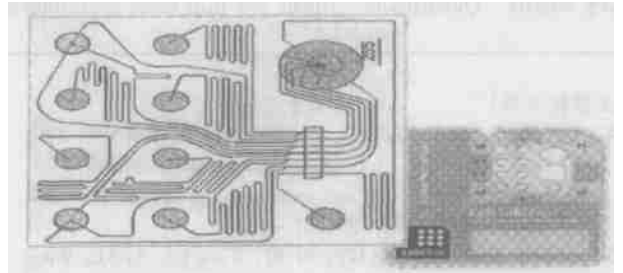


图1 微流控芯片技术原理示意图

微流控芯片CE技术在反应体系中引入先进有效的内对照系统,与目的基因在一个体系中同步扩增,一方面可监测PCR污染,另一方面通过Low Marker、Upper Marker定位及相对定量,可实现准确的微量全定量检测。同时,有高效的防污染系统,可排除假阳性。微流控芯片仪可自动识别PCR产物或蛋白质的不同大小的片段,并以数字化的形式直接给出有关基因的PCR产物或蛋白质的大小和浓度等有关信息。这些图形非常直观,结果易于判断。目前该技术已用于DNA、RNA、蛋白质和细胞等生物学检测。

2 应用

原则上,微流控芯片可以用于各个分析领域,如

生物学、新药物的合成与筛选、以及食品和商品检验、环境监测、刑事科学、军事科学和航天科学等其他重要应用领域,其中生物分析是热点。目前其应用主要集中在核酸分离和定量、DNA 测序、基因突变和基因差异表达分析等。另外,蛋白质的筛分在微流控芯片中也已有报道⁵。

针对病原微生物基因组的特征性片段、染色体 DNA 的序列多态型、基因变异的位点及特征等,设计和选择合适的核酸探针,经 PCR 扩增后检测,就能获得病原微生物种属、亚型、毒力、抗药、致病、同源性、多态型、变异和表达等信息,为疾病的诊断和治疗提供一个很好的切入点。

国际上公认的 PCR 产物检测共有五种方法,按其灵敏度高低顺序排列为:毛细管电泳法、固相杂交法、液相杂交法、高压液相杂交法和凝胶电泳法(不推荐临床)。微流控芯片 CE 以毛细管电泳为该芯片主体,无需进行探针杂交,受检样品的信号获得率接近百分之百。微流控芯片 CE 可检测 15 ~ 7500bp 范围的 PCR 产物,分辨率可达 20bp,样品微量使扩散进一步减少,分离效果极好,每孔可供多个不同的 PCR 产物作同时分析。

该技术临床应用已多有报道。(1)应用多重逆转录 PCR (multiplex Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction, mRT - PCR) 通过多组特定引物设计,经 mRT - PCR 扩增后,其产物应用微流控芯片 CE 检测,同时可检测数种上呼吸道病毒,并可准确鉴定病毒的种类、型和亚型,其中可包括 SARS 病毒(见图 2)。图 2 中第 1、6 个峰分别为 Low Marker、Upper Marker。(2)核酸扩增检测技术可缩短病毒“窗口期”,而应用微流控芯片,可同时检测多种病原微生物核酸的 PCR 产物如 HBV、HCV、HIV、梅毒等(见图 3)。对献血员进行更为有效的筛选,减少甚至避免输血传播疾病的发生。(3)HBV DNA 的定量测定能准确反映出 HBV 的复制水平、病程变化和疗效等,所以在乙型肝炎的临床诊断、治疗方案选择和抗病毒疗效观察等方面起着重要的作用。样品中 HBV - DNA 经 PCR 扩增后,其产物应用微流控芯片 CE 定量检测(见图 4)。图 4 中第 1、5 个峰分别为 Low Marker、Upper Marker,第 4 个峰为内对照 (Internal Control, IC),因而可获得高准确度和重复性的定量实验结果。

3 微流控芯片特点

微型芯片的主要特点是高通量、微型化和自动

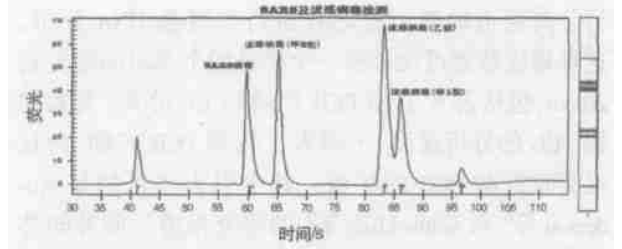


图 2 SARS 病毒及流感病毒检测

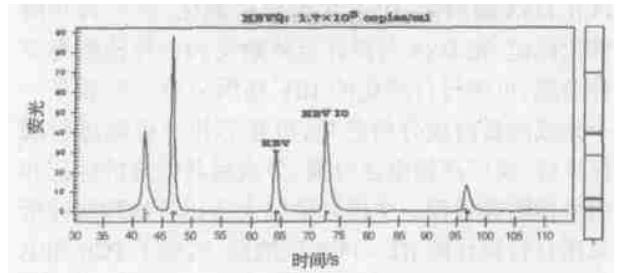


图 3 HBV - DNA 定量检测

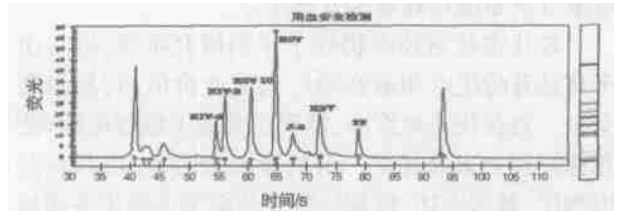


图 4 用血安全检测

化,是在传统生物技术和疾病诊断等方面的创新和飞跃。微流控芯片的发展极大地拓宽了生物芯片的内涵,是当前微全分析系统发展的重点,它有很多优点。

微流控芯片主要以分析化学和分析生物化学为基础,以微机电加工技术为依托,以微管道网络为结构特征,各工作单元既能独立完成单一反应或单元操作,也能与其他单元合作完成较复杂的工作,使整个芯片成为一个动态的反应系统。探针和靶分子的作用是主动式的,因而大大增强敏感性,提高反应速率。微流控芯片把整个实验室的功能,包括样品处理、化学反应、分离和检测等集成在芯片上,且可多次使用,因此具有更广泛的适用性。每个芯片可用于多个病人而不是一个病人一块芯片,每块芯片至少可重复使用 20 次,因此比微阵列芯片更为经济耐用。微流控芯片为通用模式的 DNA 芯片,特异性由 PCR 控制,因此可以提供检测平台。利用菜单式服务,及时提供临床信息,也为将来长期发展新增的项目提供基础。

4 研究进展

PCR 反应器和 CE 作为复合体已被制作在一个微流控芯片上,用作 PCR - CE 全分析,也可用多平

行分离通道的微流控芯片进行高通量 DNA 分析。这种集成装置可使分析一个样品的全部时间缩短到 20min,包括芯片上的 PCR 扩增和 CE 分离,大大加快 PCR 的分析速度,不需人工转移 PCR 产物,而且可实时控制 PCR 的扩增。其中引人注目的是 Anderson 等⁶ 和 Gattschlich 等⁷ 的研究报道。前者的芯片集成细胞裂解、RNA 提取纯化、逆转录 PCR、套式 PCR、DNA 酶消化、DNA 片段脱磷酸化、末端转移酶催化标记、靶 DNA 与探针点阵杂交和信号检测等多种功能,可进行自动化的 HIV 基因分型。后者是一个集成的蛋白质分析芯片,可在芯片上连续进行酶促反应、反应产物电泳分离、分离后各组分的标记和信号检测等过程。中国科学院大连化学物理研究所采用自行设计的 RT-PCR 试剂盒,实现了 PCR 和电泳检测的微流控芯片在线分析⁸。微流控芯片的集成微分析系统正在继续发展中。

芯片实验室技术仍处于早期研究阶段,但是由于其显著的优点和潜在的巨大商业价值,它从出现至今一直在快速地发展,特别是集成毛细管电泳、荧光标记和 PCR 技术于一身的微流控芯片,以其在基因测序、基因表达、疾病诊断及药物筛选等诸多领域的应用前景引起人们的极大关注。

Microfluidic chip technique and its application on laboratory medicine

Yue Zhihong Zhang Zheng

(People's Hospital of Peking University, Beijing 100044)

Abstract Lab-on-a-chip has been widely used in bioscience research as a new technical flat. Microfluidic-based microdevices can be applied in both the fields of genomics and proteomics, including analysis of gene express, gene polymorphism studies and clinical diagnostics et al. Within these systems, material is transported within microstructures where separations, reactions and analysis can occur. Capillary electrophoresis by microfluidics is an alternative method for more rapidly separating such as PCR products. The review describes basic principle, research of microfluidic chip and its application on laboratory medicine.

Key words Microfluidic chip Capillary electrophoresis Laboratory medicine

(下接第 22 页)

Progress in neutron radiography and their application

Pei Yuyang Tang Guoyou Guo Zhiyu

(Institute of Heavy Ion Physics, Peking University, Beijing 100871)

Abstract In this paper, the basic principle, method and characteristics of neutron radiography technology are briefly described, including the technique of neutron generating source, the neutron-sensitive converter and Various detector systems. Some results of fast neutron imaging with 4.5MV Van de Graff of Peking University are given, and some application of neutron radiography are expounded.

Key words Neutron radiography Fast neutron Neutron-sensitive converter NDT

参考文献

- 1 齐小花,张新祥,常文保. 微流控芯片仪器进展,现代仪器,2002,4:12~15
- 2 Jeff Chiou, Paul Matsudaira, Ain Sonin, et al. A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine. Anal Chem, 2001, 73:2018~2021
- 3 杨军,李卓荣,杨梦更. 芯片实验室(微流芯片)技术,生物化学与生物物理学报,2002,34:117~123
- 4 Bublmann C, Preckel T, Cban S, et al. A new tool for routine testing of cellular protein expression: integration of cell staining and expression on a micro-fluidic chip-based system. Biomolecular Techniques, 2003, 14:119~127
- 5 高志贤. 蛋白芯片技术研究进展及其应用,现代仪器,2004,3:1~5
- 6 Anderson RC, Su X, Bogdan G, et al. A miniature integrated device for automated multiseq genetic assay. Nucl. Acids Res, 2000, 28:e60
- 7 Gottschlich N, Gilbertson CT, Mcknight TE, et al. Integrated microchip for digestion, separation and postcolumn labeling of proteins and peptides. J. Chromatog B, 2000, 745:243~249
- 8 周小棉,梅晓丹,刘大渔等. SARS 病毒的微流控芯片实验室系统检测,现代科学仪器,2003,4:13~16
(感谢上海黄道培教授提供应用实例图片)