蛋白芯片技术研究进展及其应用*

高志贤**

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所　天津　300050)

摘　要　蛋白芯片技术作为进行生命科学研究的一种新的技术平台,日益受到人们的关注。目前这一技术已经应用于基因表达分析、单核苷酸多态性分析、基因突变检测、抗体筛选及临床诊断等许多领域。随着该技术的不断完善,它将在生命科学研究中发挥越来越重要的作用。本文就蛋白芯片的原理、分类、制备过程、研究进展、优缺点和发展前景作一介绍。

关键词　生物芯片　蛋白芯片　免疫分析

中图分类号:Q81　　**文献标识码**:A

生物芯片(biochip)是近几年生命科学研究领域中崭露头角的一项新技术,它是指在固相基质上集成各种可以作为受体的生物信息,包括寡核苷酸、蛋白质/酶、抗原/抗体、细胞等,利用受体与连接物间的反应(包括核酸杂交反应、抗原/抗体亲和识别反应等)来进行生物学的检测。它将生命科学研究中所涉及的许多分析步骤,综合运用微电子技术、微机械技术、计算机技术、分子生物学技术、半导体技术、共聚焦激光扫描技术、化学荧光标记技术,使样品制备、化学反应和分析检测等连续化、集成化、微型化、自动化。生物芯片上可以集成的成千上万的密集排列的分子探针,能够在同一时间内分析大量的样品。根据生物芯片固定的生物分子及材料不同可分为基因芯片、蛋白质芯片、芯片实验室、细胞芯片及组织芯片[1]。

随着蛋白质组学概念的提出及其研究的进行,人们需要一种新的技术来进行大规模的蛋白质分析,蛋白质芯片技术于是应运而生。蛋白质芯片是一种新型的生物芯片,是由固定于不同种类支持介质上的抗原或抗体微阵列组成,阵列中固定分子的位置及组成是以知的,用标记(荧光物质、酶或化学发光物质等标记)的抗体或抗原与芯片上的探针进行反应,然后通过特定的扫描装置进行检测,结果由计算机分析处理。

1　蛋白质芯片的制备及分析过程

1.1　载体的选择及抗体或抗原的固化

用于连接、吸附或包埋各种生物分子使其以水不溶状态行使功能的固相材料统称为载体。制作蛋白芯片的载体材料必须符合下列要求:①载体表面必须有可以进行化学反应的活性基因,以便于蛋白分子进行偶联;②使单位载体上结合的蛋白分子达到最佳容量;③载体应当是惰性的并且有足够的稳定性,包括物理、化学和机械的稳定性。④载体具有良好的生物兼容性。目前适合于作生物芯片载体的材料包括玻璃片、硅片、金片、聚丙烯酰胺凝胶膜、尼龙膜等。

载体上的生物分子固定化方法主要有2种:化学性、生物性。化学性配基包括疏水基团、阴离子、阳离子、金属离子、混合离子等;生物性配基包括受体、配体、酶、抗体抗原等。它们的相应检测对象分别是:配体、受体、底物、抗原抗体结合蛋白。

待固定的生化分子(配基)可通过化学键直接固定(例如通过戊二醛将已活化的玻片表面),也可不直接通过化学键固定于载体上,而是先将能与之特异结合又不干扰其活性的分子偶联载体上,再通过专一性,高亲和力作用间接固定配基。如第2抗体-第1抗体系统、蛋白A-抗体系统、生物素-亲和素系统等。下面将根据不同的载体介绍蛋白固定化方法。

1.1.1　玻璃片　玻璃片受到许多研究者的重视,其原因是载玻片来源方便、玻片廉价、处理简便而且具有足够的稳定性和惰性。因为尽管载玻片有吸附非特异性蛋白的性质,但通过几种预处理和使用阻断剂可以减少背景信号。因此在准备蛋白阵列的时候,表面化学是很关键的。载玻片表面羟基可以用N,N-二乙氧基氨丙基三乙氧基硅烷作表面处理,然后能够偶连核酸、酶、抗体(抗原)、蛋白质、多肽等各种生物分子。用巯基标记的生物分子可直接固定

*国家863(2002AA649180)、天津市重点科技攻关(023105611)和国家自然科学基金(30000137)资助课题

**作者简介:高志贤。男,1966—,博士,副研究员,主要从事水和食品中毒物快速监测方法研究。
Tel:022-84655403,E-mail:gaozhx@1631.com。

在玻璃表面。另一方面多数生物芯片需要采用发光的检测方法,而玻片适应这一要求。

1.1.2 聚丙烯酰胺凝胶膜 利用聚丙烯酰胺凝胶能够吸附容纳4 000 000道尔顿大小的蛋白质分子,而且其吸附的蛋白能够保持原来的活性,通过光致聚合作用制备聚丙烯酰胺凝胶膜,然后用戊二醛等进行膜的活化。活化膜上的醛基和蛋白质中的氨基反应形成烯胺键,从而完成蛋白质的固定。然而有反应速率较低和芯片准备步骤复杂等缺点。

1.1.3 金膜 通过金表面分子自组装技术固定抗体。洁净的金膜用 N - 乙酰半胱氨酸溶液进行自组装,形成自组膜后冲洗。然后用碳二亚胺盐酸盐(缩写为 EDC)及 N - 羟基磺基琥酰亚胺(缩写为 NHS)活化自组膜上的羧基形成活泼酯。活泼酯与蛋白质反应形成酰胺键从而固定蛋白质。

1.2 抗原或抗体的标记

1.2.1 酶标记 常用的标记酶有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),碱性磷酸酶(alkaline phospharase, AP),葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶(glucose 6 - phosphatedehydrogenase, G6PD) β - D - 半乳糖苷酶(β - galactosidase β - Gal)等。其中 HRP 由于比活性高、价廉易得,因而是酶标记中最常用的酶。酶标记抗原(抗体)的方法主要有两种,直接法和交联法。直接法是用过碘酸钠使酶分子表面的多糖羟基氧化成醛基,醛基可以和抗体(抗原)中的游离氨基反应形成 Schiff 碱,然后用硼酸化钠终止反应,从而实现酶与抗原(抗体)的结合。这种方法仅适用于含糖基酶的标记物的制备。交联法是通过双功能交联剂将酶与抗原(抗体)连接在一起。根据交联剂上反应基团是否相同,可将交联剂分为两种:一类是同源双功能交联剂如戊二醛、苯二马来酰胺,另一类是异源双功能交联剂如羟琥珀酰亚胺酯。

1.2.2 荧光物标记 荧光免疫分析中常用的荧光物质有异硫氰酸荧光素、丹磺酰氯、若丹明 B - 异硫氰酯等。由于普通的荧光标记有许多不足之处,如荧光团的荧光寿命短,本底荧光干扰大,检测时不能将发射光中散射的激发光有效的去掉,而时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)技术以镧系元素为标记物,利用波长和时间两种分辨,有效地克服了普通荧光标记的不足,大大提高分析的灵敏度。目前在蛋白质芯片的检测中常用的荧光标记物是 Cy3 及 Cy5 两种物质。

1.2.3 化学发光物质标记 常用的化学发光物有吖啶酯,吖啶酯可共价结合于抗原(抗体)上,标记好的抗原(抗体)与对应物结合后,用起动发光试剂($NaOH + H_2O_2$)与吖啶酯作用从而产生可检测的光信号。

1.3 封闭

封闭液通常用含小牛血清白蛋白(BSA)的缓冲液,其目的不仅是封闭芯片上未结合配基的醛基,同时也在芯片表面形成一层 BSA 的分子层,减少了以下步骤中其他蛋白的非特异结合。

1.4 探针蛋白的制备

对以阵列为基础的蛋白芯片来说,所应用抗体或蛋白的收集是很关键的。蛋白芯片的探针,可根据研究目的不同,选用某些特定的抗原、抗体、酶和受体等。由于具有高度的特异性和亲和性,单克隆抗体是比较好的一种探针蛋白。用其构筑的芯片可用于检测蛋白质的表达丰度及确定新的蛋白质。传统的杂交瘤细胞技术用于单克隆抗体的研制所需时间长,制约抗体阵列密度的发展。而基因工程抗体则给蛋白芯片的发展带来新的机遇。噬菌体抗体库技术就是典型的代表,它可以同时有效的处理大量的分子,而且抗体分子可以不经过动物的阴性选择,能从任一种属获得少有的抗体专一性和提高亲和力。最近 deWildt 等用 scFv 抗体制作微阵列,阵列化的抗体在数周乃至数月后保持稳定[2]。也可用其他的蛋白质文库制作探阵蛋白,如全合成人重组抗体库、噬菌体肽库、噬菌体表达文库等。

1.5 抗原抗体的反应

蛋白芯片上的抗原抗体分子之间的反应是芯片检测的关键一步。通过优化合适的反应条件使生物分子间反应处于最佳状况中,可以减少生物分子之间的错配比率。

1.6 蛋白质芯片的检测

目前,对于吸附到蛋白质芯片表面的靶蛋白的检测主要有 2 种方式。一种是以质谱技术为基础的直接检测法,如表面增强激光解析离子化 - 飞行时间质谱技术(SELDI - TOF - MS),可以使吸附在芯片表面的靶蛋白离子化,在电场力的作用下飞行,通过检测离子的飞行时间计算出质量电荷比,用以分析蛋白质的分子量和相对含量。另一种为蛋白质标记法,样品中的蛋白质预先用荧光物质或同位素等标记,结合到芯片上的蛋白质就会发出特定的信号,用 CCD 照相技术及激光扫描系统等对信号进行检测。常用的芯片信号检测是将芯片置入芯片扫描仪中,通过采集各反应点的荧光位置、荧光强弱,再经相关软件分析图像,即可以获得有关生物信息。

2 蛋白质芯片的应用

蛋白芯片的快速发展,极大地促进蛋白诊断和蛋白质组学等方面的研究。如:利用蛋白芯片发现新的蛋白并且阐明其功能;寻找与疾病有关或直接引发疾病的新蛋白;在蛋白芯片上筛选与这些疾病蛋白有关的新药,发现新的药物靶标和生物标记物,这些都已成为当前蛋白研究的重点课题。而蛋白芯片的研究起着重要的作用。

2.1 免疫检测及酶活性测定

目前许多临床检验及环境毒物检测均是基于抗原、抗体反应进行的,如果将多种检测集中在一块芯片上进行,就会极大的提高检测效率、降低检测成本。Arenkov P 等人[3,4]研制出一种用于免疫检测及酶活性测定的蛋白质芯片。他们在玻璃片表面制备了 100 ×100 ×20μm 大小的聚丙烯酰胺凝胶垫,在凝胶内固定蛋白质分子,这种固定方法属于三维固定,其特点是固定容量大,比普通的二维固定容量大 100 倍,因此灵敏度有很大的提高,在凝胶内进行的反应属于均一的液相反应,固定的分子相互干扰小。在进行免疫检测时,这种芯片可以重复使用 10 次,但信号并没有明显的降低。Ewalt KL 等人[5]首次利用"主动式"芯片进行葡萄球菌肠毒素 B 及霍乱毒素 B 的检测,证明利用这种芯片进行蛋白质检测具有许多优点,如检测所需时间少、整个分析所需样品少(10μL)及不需要封闭等。

2.2 抗体筛选

利用抗原与抗体可以进行特异性的结合反应,可以对噬菌体抗体库进行筛选。Wildt RM 等人[6]用带有抗体基因的高密细菌阵列进行重组抗体的筛选,一次可以对 18 342 个不同的抗体克隆进行高通量的检测。

2.3 蛋白质组研究

随着蛋白质组研究的不断展开,人们需要一种高通量的检测技术对细胞或组织所表达的众多蛋白质进行研究,蛋白质芯片正适合进行此项研究。Nacbeath G 等人[7]研制出一种新型的蛋白质芯片,他们利用与基因芯片制作相似的点样技术,将纳升级的蛋白质样品点于醛基化的玻璃片表面,蛋白质中的氨基基团和玻璃片表面的醛基形成共价键从而实现蛋白质的固定。在点样的过程中为保持蛋白质的水溶性并防止其变性,在样品中加入 40 %的甘油。在一张 2.5cm ×7.0cm 的玻璃片上可以固定 10 000 个蛋白质样品,从而保证其实现高通量的检测功能。点样之后将玻璃片孵育 3h,然后将片浸入含有牛血清白蛋白的缓冲液中封闭未反应的醛基。利用这种芯片进行蛋白质检测时,灵敏度可达 150pg/mL。他们还证明用这种芯片可以进行蛋白质间相互作用、确定蛋白激酶底物、分析蛋白质与其它小分子物质相互作用的研究。

2.4 蛋白芯片用于生物分子间的相互作用研究

蛋白微阵列具有和 DNA 微阵列一样的潜力,会对生物科学产生巨大影响。它会显著地拓宽现在蛋白表达和蛋白相互作用分析的范围[8]。现在分析蛋白质的技术,例如二维凝胶电泳(2 - DE,two - dimensional gel electrophoresis)和质谱联用,可以检测生物相关蛋白,有很高的分辨能力,但也有很大的局限。这一点已经被 Gygi 等人证明,从全细胞提取物观测到,2 - DE 中的大多数的点,是高丰度蛋白。然而低丰度蛋白,例如信号分子或激酶,就只有很少的显示。蛋白微阵列能显著的加快药物新的标记物和靶标的发现,而且有高通量应用的潜力。达到这个目标的关键是,对低丰度蛋白有高的读出灵敏度,蛋白的功能分析、化验分析的时间短,处理简便而且可以和各种各样的不同的靶标和新的化验分析方法联用的能力。

近年来,研究蛋白质相互作用的主要方法是酵母双杂交系统技术。该技术是体内方法,易于操作实施并且应用范围广,但存在着许多局限性,如假阴性和假阳性,酵母体内表达的外源蛋白质不能正确折叠,蛋白质翻译后修饰及表达过程的条件(离子浓度、存在或缺失辅助因子、温度等)难以控制等。蛋白质阵列芯片技术由于是在体外条件下进行操作,突破了酵母双相杂交系统技术的局限,可直接检测目标蛋白质。Ge 等[9]应用一低密度通用蛋白阵列(universal protein array,UPA)系统来研究蛋白质、DNA、RNA 和小分子化学配体探针的相互作用,通过测试人蛋白 p52 与点在硝酸纤维素膜上纯化的 48 种蛋白质的反应,用高浓度盐水清洗渗透膜鉴别高亲和力蛋白质间的相互作用。结合二维凝胶电泳技术,现今的蛋白质阵列芯片无疑将会填补基因组学和蛋白质组学之间的信息空缺。通过与逆向来源的 DNA 芯片和二维凝胶电泳结果进行对比,可将蛋白质表达与 DNA 序列信息有机地联系在一起,比较健康和带病的细胞蛋白质谱图,将有可能认清细胞内信号传导和新陈代谢途径。

2.5 蛋白芯片用于蛋白质和小分子间的相互作用

蛋白质芯片可用于研究蛋白质和小分子相互作用,解决药物筛选中的瓶颈问题。蛋白芯片可以高

通量、大规模、并行进行新药筛选,直接在蛋白质水平上寻找药物靶标,解释药物的作用机理,检查药物的毒性或副作用。它不仅能大大缩短药物筛选的时间,而且为药物的进一步开发和设计提供理论指导。MacBeath 和 Schreiber[10]以三对蛋白质与小分子(地高辛与鼠抗地高辛单克隆抗体,生物素与链霉亲和素(AP1497 与 FKBP12)为例研究蛋白质和小分子的相互作用和检测的灵敏度。他们将固定三种蛋白的芯片放在用不同荧光染料标记的三种小分子混合溶液中,获得蛋白质和小分子特异性作用的三色荧光图像。研究表明,这一方法即使对低亲和系数的小分子也具有较高的灵敏度。

2.6 蛋白质芯片作表达物的筛选

蛋白质芯片可进行高灵敏的表达和抗体特异性筛选。Lueking[11]等人采用机械手段将蛋白质点于 PVDF 膜上制成芯片,点间距 4.5mm,直径 250μm。在膜上检测到约 10pg 的待测蛋白质。在该实验中把 92 个人的 cDNA 克隆在酶标板上,将表达后所得的细菌溶胞物作为蛋白质样品点制成芯片,和常规的原位膜筛选方法相比,在该芯片上进行大量蛋白质表达检测的假阳性克隆的比率下降,不正确阅读框架导致错译蛋白的比率也大幅下降,从 37 %降低为 11 %。所挑选克隆产物(GAPDH)的特异性在相同的芯片上应用单克隆得到很好证实,说明蛋白质芯片技术能可靠地进行蛋白质表达物的检测。目前,能够在载玻片上并行分析 4800 个样品。该技术不仅可用于抗原抗体的筛选,也能用于配体受体体系。

2.7 药物靶标及其作用机理的研究

疾病的发生发展与某些蛋白质的变化有关。如果以这些蛋白质构筑芯片,对众多候选化学药物进行筛选,直接筛选出与靶蛋白作用的化学药物,将大大推进药物的开发。另外,蛋白质阵列芯片有助于了解药物与其效应相关蛋白质的相互作用,并允许对化学药物作用机制细节不够清楚的情况下,直接研究蛋白质谱,这可能将化学药物作用与疾病联系起来,以反应药物是否具有毒副作用、判定药物的治疗效果,为指导临床用药提供实验依据,并能进一步建立和发展外源化学药物与蛋白质表达谱的数据库,促进药理学和毒理学的研究[12]。

2.8 疾病诊断

蛋白质芯片能够同时检测生物样品中,与某种疾病或环境因素损伤可能相关的全部蛋白质的含量变化情况,即表型指纹(Phenomicfingerprint)分析。对于疾病的诊断或筛查来说,表型指纹要比单一标志物准确可靠得多。此外,表型指纹对监测疾病的进程和预后,判断治疗的效果也具有重要意义。蛋白质阵列在临床医学中最有可能应用于自身免疫病的实验室诊断,以确定特异性自身抗体谱的存在。例如,Cipher-gen Biosystems 公司应用蛋白芯片技术可以制作疾病诊断性芯片及筛查性芯片[13]。如将 18 种自身免疫性疾病的相应抗原固定在芯片上,将待测病人的血清加入反应体系,最后加入标记酶的二抗,加底物显色。根据显色位置不同可判断出为何种抗体阳性,从而诊断出相应的疾病筛查性芯片多用于肿瘤的早期诊断,如果利用过去的方法,也许要花费数月到数年的时间。据报道美国已经研制出评价心脏病风险的新型蛋白芯片,这种芯片可以诊断出血清中的心脏病危险因子,例如 C - reactive 蛋白和白介素 - 6[14]。另外,利用蛋白质翻译后的修饰,尤其是磷酸化蛋白与人类肿瘤的发生关系密切,不少癌基因表达的蛋白具有蛋白激酶的活性。利用蛋白质芯片技术寻找到肿瘤相关的磷酸化蛋白,明确其性质、功能及作用机制,可能会为诊断和治疗肿瘤找到一条新途径。

2.9 蛋白芯片在食品分析中应用

蛋白芯片在食品分析方面也具有较好的应用前景。食品营养成分的分析(蛋白质),食品中有毒、有害化学物质的分析(包括农药、重金属、有机污染物、激素),检测食品中污染的致病微生物的检测,食品中污染的生物毒素(细菌毒素、真菌毒素)的检测等大量工作几乎都可以用生物芯片来完成。目前国内此领域的工作才刚刚开始,但已显示出良好的应用前景,如建立利用免疫芯片技术检测食品中黄曲霉毒素和葡萄球菌肠毒素、农药、雌激素、生物碱的方法。相信在不久的将来,生物芯片技术一项高灵敏、快速的分析方法在食品安全监测、检验方面将获得广泛应用。另外,利用免疫芯片或酶芯片检测各种蛋白毒素类生物战剂和侦检化学战剂。

2.10 蛋白芯片在毒理学中的应用

利用蛋白芯片技术,研制处毒理芯片(ToxChip)成为目前的研究热点。ToxChip 可帮助预防一些环境和食品中污染物引起的疾病,还可用于新药的临床试验甚至建议合适的治疗剂量。也可利用毒理芯片进行环境污染物的检测、监测与环境质量评价,研究环境污染物对人体健康的影响、环境污染物的分布与转归、环境污染物治理效果评价、环境生物修复微生物的筛选与改造等领域发挥作用。

2.11 在卫生检验中的应用

军事医学科学院卫生学环境医学研究所成功的

对农药阿特拉津、罂粟碱、对硫磷半抗原进行衍生化,并且将该衍生物与大分子蛋白质 OVA 进行偶联,合成完全抗原。载玻片表面经硅烷、戊二醛处理,通过双功能试剂把抗原或抗体共价结合在载玻片表面,制作检测小分子的污染物蛋白微阵列,对阿特拉津最低检测限为 0.001μg/mL,罂粟碱最低检测限为 0.01μg/mL。同时,以葡萄球菌肠毒素为识别分子,研制检测大分子物质的蛋白微阵列,对葡萄球菌肠毒素的 A 型、B 型、C 型进行检测,其最低可检测 0.01μg/mL、0.01μg/mL 及 0.01μg/mL。目前,检测环境内分泌干扰物雌二醇、壬基酚的免疫微阵列也在研制之中。

3 蛋白质芯片的优点

随着蛋白质组学研究的技术需求,蛋白质芯片刚刚兴起就成为研究热点。蛋白质芯片技术的优点主要体现在:①由于抗原与抗体阵列芯片探针的结合的特异性高、亲和力强,受其他杂质的影响较低,因此对生物样品的要求较低,可简化样品的前处理,只须对少量实际标本进行沉降分离和标记后,即可加于芯片上进行分析和检测。甚至可以直接利用生物材料(血样、尿液、细胞及组织等)进行分析,便于诊断,实用性强。②能够快速高通量定量分析大量的蛋白样品。③蛋白芯片使用相对简单,结果正确率较高。④相对传统的酶标 ELISA 分析,蛋白质芯片采用光敏染料标记,灵敏度高准确性好。⑤蛋白芯片的所需试剂和样品少,产品化后,价格低廉。

4 存在问题

蛋白质芯片将为生物化学和分子生物学提供强有力的工具。相对于 DNA 芯片研究的进展速度,蛋白质芯片研究进展显得相对滞后,主要有以下问题亟待解决:①载体材料表面的化学修饰方法及蛋白固定化技术还需要进一步改进;②进一步改进简化样品制备和标记操作工作程序;③进一步提高信号检测的灵敏度,如低拷贝蛋白质的检查和难溶蛋白的检测;④高度集成化和高速的阵列化制作方法、保持微阵列控室的湿度、阵列的冷藏存储、高通量的在线杂交检测设备以及高效的图像处理和资料分析工具的研制和开发。

这些问题是蛋白芯片技术能否从实验室推向临床应用的关键所在。随着研究的不断深入和技术的更加完善,如表面化学修饰技术的进步,可以做到在载体上固定多种活性蛋白质;蛋白质工程可获得大量重组高特异性蛋白用于芯片制造;纳米标记的引入可提高芯片检测的灵敏度,近期也有望开发出简便可靠的检测系统。

5 应用前景

免疫芯片具有许多优越性,发展十分迅猛。以生物芯片为核心的各相关产业正在全球崛起,世界工业发达国家已开始高投入,很多生命科学研究机构和生物技术公司都在研究这项技术。国际上开展生物芯片研究的大学、公司已有几十家。像美国的 Affymetrix、Hyseqt、Synteni 公司,俄罗斯恩格尔哈特分子生物学研究所等。北美和欧洲许多国家的政府和私人机构已重新调整他们的研究开发战略来推动此项研究工作的进程,仅美国政府和企业就已投入近 20 亿美元的研究经费。我国在 1997 年开始立项对基因芯片技术的研究,受到国家 973、国家 863、国家自然科学基金重点项目、国家自然科学基金、中国科学院等提供特别资助,许多大公司也相继投入资金参与研究开发,目前已取得巨大的进展,且已在生命科学领域中发挥作用。据预测今后的 10 年内免疫芯片将会走进人们生活中。

参考文献

1 Xiao - Bo Wang, Jun Yang, Ying Huang, et al. Cell separation by dieleetrophoreticfield - flow - fractionation. Anal Chem, 2000, 72(4): 832～839

2 de Wildt R, Mundy C R, Gorich B D, et al. Antubody arrays for high - throughput screening of antibody - antigen interactions. Nat Biotechnol, 2000, 18(9): 989～994

3 Pavel Arenkov, Alexander Kukhtin, Anne Gemmell et al. Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions Analytical Biochemistry, 2000, 278(2): 123～131

4 Dmitry Guschin, Gennadiy Yershov, Alexander Zaslavsky et al. Manual Manufacturing of Oligonucleotidr, DNA, and Protein Microchips. Analytical Biochemistry, 1997, 250(2): 203～211

5 Karla L. Ewalt, Robert W. Haigis, Regina Rooney et al. Detecion of Biological Toxins on an Active Electronic Microchip. Analytical Biochemistry, 2001, 289(2): 162～172

6 Ruud M. T. de Wildt, Chris R. Mundy, Barbara D. Gorick et al. Antibody arrays for high - throughput screening of antibody - antigen interactions. Nature Biotechnology, 2001, 18(9): 989～994

7 Gavin MacBeath and Stuart L. Schreiber. Printing proteins as microarrays for high - throughput function determination. Science, 2000, 289(5485): 1760～1763

8 Pawlak M, Schick, E, Bopp MA, Schneider MJ, Oroszlan P,

(下转第 14 页)

29 杨绍英,陈志华. 气相色谱法检测药物中的残留溶剂,天津药学,1996,8(4):71～72
30 张咏梅,洪铮. 紫杉醇原料药中有机溶剂残留量的气相色谱分析,应用与环境生物学报,1999,5(4):434～436
31 王卫,高立勤. 气相色谱法测定盐酸莫索尼定有机溶剂残留量,药物分析杂志,2001,21(3):208～209
32 邓湘昱. 顶空气相法测定盐酸土霉素中残留甲醇,中国医药工业杂志,2002,33(4):17～18
33 黄剑英,顾以振. 同时测定药物多种有机溶剂残留量的气相色谱法,光谱仪器与分析 1996,(3):32～33
34 范元中. 顶空色谱/质谱法测定肝素药品中的残留溶剂,仪器仪表与分析监测,1992,(1):53～54
35 张莉,晁若冰. 有机药物中残留三氟醋酸测定方法的研究,华西药学杂志,2001,16(6):427～428
36 张自霞. 眼明药液中间体乙醇残留量的测定,生化药物杂志,1990,(1):55～56
37 赵青蓉,余蓉. 分光光度法检测 S/D 处理中纯因子 VIII 制品中残留 Tween - 80 的方法研究,中国输血杂志,1996,9(3):122～124
38 王庆全,黄烈文. HPLC 法测定注射用氨苄青霉素钠中有机溶剂 N,N - 二甲苯胺的残留量,福建药学杂志 1990,2(4):18～19
39 应奇才,俞永进等. 盐酸氯洁霉素中丙酮含量分析,杭州医学高等专科学校学报 2001,22(2):112～113
40 石艳萍. 对甲苯磺酸及其残留游离酸的含量测定,山东医药工业,1992,11(4):17～17

To review the mesurement of residual solvents in drugs

Zhang Junwei
(Pharmaceutics preparation Researching & Engineering Center,
Tian jin Institute of Pharmaceutics Research,Tianjin 300193)

Abstract To review the mensuration of residual solvents in drugs,including GC、UV - VIS、HPLC and conjuct applications of several methods.

Key words Drugs Residual solvents Mensuration methods

(上接第 5 页)

Ehrat M. Zeptosens AG,Witterswil,Switaerland. zepsens'protein microarrays: a novel performance microarray platform for low abundane protein analysis. proteomics 2000,2(4):383～93
9 Ge H. UPA,a universal protein array system for quantitative detection of protein - protein,protein - DNA protein - RNA and protein ligand interactions. Nucleic Acids Res,2000,28(2):e3 Ⅰ～Ⅳ
10 Macbeath G and Schreiber S L. Rinting proteins as microarrays for high - function determination. Science,2000,289(5485):1760～1763
11 Leuking A,Holz C,etal. A novel system for dual protein expression in Pichia pastoris and Escherichia coli. Protein Expression and Purification,2000,20(3):372～378
12 Cahill DJ. Protein and antibody arrays and their medical applications. J immunol Methods,2001,250(1 - 2):81～91
13 Sjenior K. Fingerprinting disease with protein chip arrays. Mol Med Today,1999,5(8):326～327
14 Christodoulides N,Tran M. A mirochip - based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk Anal,Chem,2002,74(13):3030～6

Research on protein chip technique and its application

Gao Zhixian
(Instirute of Hygiene and Environmental Medicine,Academy of Military Medical Science,Tianjin 300050)

Abstract Protein chip has been widely used in bioscience research as a new technical flat. The applied field includes analysis of gene express,gene polymorphism studies and clinical diagnose et al. With the development of this technology, it will play a very important effect in bioscience research. The review describes basic principle,classify,detection process, unsolved problem,research and application on protein chip.

Key words Biochip Protein chip Immunoassay