

DNA 及寡聚核苷酸微型阵列芯片的研究进展

金 亚, 罗国安*

(清华大学化学系, 北京 100084)

1 引言

近年来, DNA 及寡聚核苷酸的微型阵列 (microarray) 芯片 (也称 DNA 芯片或基因芯片) 在制造技术上得到了很大的发展, 在生物学和医学等领域的应用更为世人瞩目。DNA 及寡聚核苷酸微型阵列芯片, 概括说即使用光刻或点样技术将 DNA 或寡聚核苷酸阵列制作在玻璃或尼龙基底上, 样品 DNA 经 PCR 扩增和荧光探针插入 (或同位素标记) 后, 对微型阵列进行杂交, 从而能进行大量平行的基因表达和基因发现研究。此种技术已成功用于对上千种基因同时进行表达监控、大范围的基因发现、多态性检测和基因组 DNA 克隆的遗传图谱绘制。

微型阵列技术起源于早期在固体表面进行的生化实验。尽管仍有某些基于滤膜分析的痕迹, 但芯片分析在本质上已脱离了使用多孔滤膜的技术。使用芯片能达到真正的平行实验、微型化、多路复用和自动化, 且这些特点使其能进行早期技术所不能完成的一些应用。

微型阵列分析能进行大量平行的数据采集和分析。平行实验能使实验进程大大加快, 从而对芯片上分析的基因或基因产物之间进行有效的对比分析。微型阵列分析最终可能允许在单个反应中分析整个人类基因组, 最近对酵母的基因表达实验向这个目标迈出了重要的一步^[1-3]。

传统分析微型化是生物医药研究的一个大趋势^[4]。微型化分析减少了试剂的消耗和反应的体积, 增加了样品的浓度, 加速了反应。基于芯片的分析通过使用共焦扫描仪^[1-3, 5-9]或与电荷耦合器件 (CCD) 相连的摄像机^[10], 能进行灵敏而迅速的检测。微型阵列分析的对象目前主要是核酸, 将来一定会扩展至蛋白、脂类、糖和其他小分子。

多路复用, 指在一次分析中能对多个样品进行

分析, 这是微型阵列另一个有潜力的发展方向。新兴的标记和检测方法, 如多颜色荧光的使用, 可在一块芯片上对多个样品进行比较^[11]。由于消除了复杂的影响因素如芯片-芯片差异、试验条件偏差和其他类型的比较性实验所具有的先天缺点, 多路复用能提高比较分析中的精确性。多路复用的特点已在表达分析^[1-3, 5-9]、基因分型^[12]和 DNA 再测序^[13]中有所应用。

2 微型阵列芯片的制造技术

微型阵列的制造技术分为两种主要类型: “合成”和“转移”。在“合成”方法中, 微型阵列用阶梯式的方法在原位合成核酸和其他生物大分子, 每一轮加一个核苷到不断增长的链上, 直至达到所需的长度。相反, 在“转移”的方法中, 则是用制备好的生化样品对芯片从外部进行点样, 即将少量经 PCR 扩增和纯化后的分子 (如 cDNA), 用不同方法转移到芯片的指定位置上。评估这两种方法的主要技术参数包括微型阵列的密度和设计、生化成分、多样性、重现性、分析效率、质量、费用和原形的简单与否等。目前在微型阵列芯片的制造方面主要有以下 3 种技术 (图 1)。

2.1 光刻

由 Fodor 等^[3, 4, 7, 13, 14]发展的一种新型合成技术, 它结合了半导体工业的光刻技术和 DNA 合成化学, 能制造高密度的核酸微型阵列。这种方法相对于非合成方法的一个主要优点是能直接根据序列数据库制造芯片, 具体说, 是将传统的基于磷酸酯的 DNA 合成方法进行改进, 使用光不稳定的保护基团连接在与基底表面结合的连接基团的羟基上。首先, 通过光掩膜对芯片的特定位置进行紫外光照射, 除去保护基团, 产生自由的羟基。其次, 在合成的每一轮中, 5' 端保护的氨基磷酸酯 (phosphoramidite) 被加到去保护的位点。将未反应的试剂除去后, 再使用第二块光掩膜在其他特定位置进行另一个核苷酸的合成, 经过 4 次这样的步骤, 每个位点的链上都增加了一个核苷酸。此过程重复至所需的一套核苷

收稿日期: 1999-05-10

* 联系人 Tel: (010) 62781688, Fax: (010) 62784764,

E-mail: galuo@sam.chem.tsinghua.edu.cn

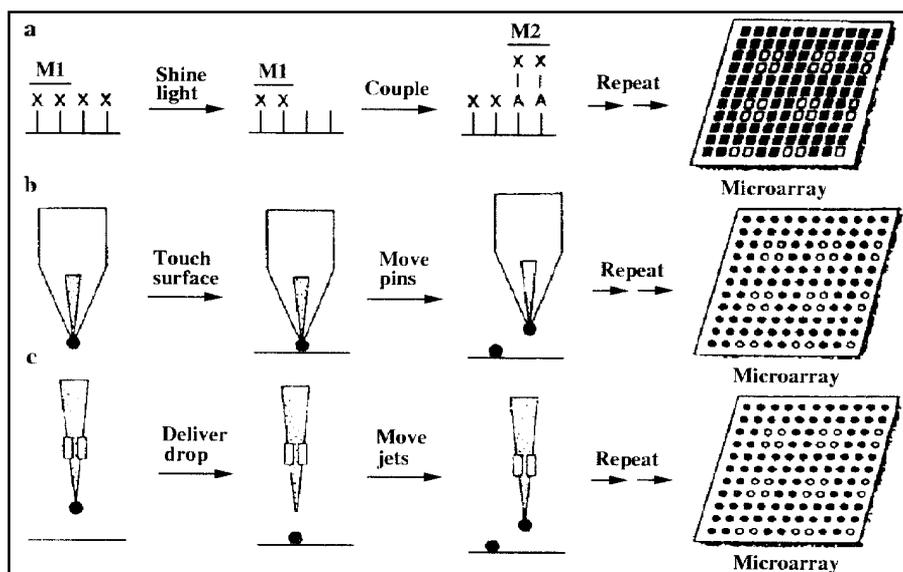


图1 微型阵列芯片制造技术. a. 光刻:玻璃基底上修饰有光不稳定基团(X),根据DNA合成要求选择光掩膜(M)对某些部分进行紫外光照射,然后用含与光不稳定基团相连的DNA碱基(A-X)的溶液处理基底,使其在特异位点与基底键合.重复地进行去保护和键合步骤能制造出高密度的阵列; b. 机械微型点样:通过毛细作用用点样针将生物物质转移到固体基底表面(点样针与基底物理接触),第一轮结束后,清洗点样针进行下一轮操作.机器人控制系统可使其实现自动化生产; c. “液体”喷射束:用与压电接口(方型)相连的微型喷嘴将生物物质喷向基底,通过电流控制使样品体积得到精确控制.第一轮喷射结束后,清洗喷嘴进行下一步。

酸序列合成后结束.用组合掩膜策略,可在相对较少的合成步骤中制造高密度的微型阵列,且随着合成中循环次数的线性增加,探针数目呈现指数级的增加.对于可能含有 4^n 种可能结构的寡聚核苷酸(oligonucleotide)阵列,可在最多为 4^n 的步数中制造出来.例如,一整套 $65\,536(4^8)$ 个寡聚核苷酸探针可在32步中用8个小时制造出。

此种方法的另一个优点是保证合成中每一步的高度精确性,最大地消除了芯片与芯片之间的差异.这种方法的一个主要缺点是光掩膜价格较高,且设计和制作周期较长.最近生产的芯片在约 1.6 cm^2 的面积上包含了400 000组寡聚核苷酸.另外,现在正努力通过改进使微型阵列的制造脱离光掩膜。

2.2 机械微型点样

另一个有生命力的技术是机械微型点样技术,它首先由Shalon和Brown^[5,12]使用,而后为美国Synteni发展出商品仪器.机械微型点样技术是早期DNA点样技术的缩微,它用一组相关的点样技术,将少量预先制备好的生物物质“印制”在固体表面,使微型阵列生产自动化(图1b)。

机械微型点样的优点包括原型简单,实施迅速,费用低和多样性.缺点是每个样品在微型阵列制作前都需合成、纯化和保存.Synteni公司生产的微点

样微型阵列在约 3.6 cm^2 的面积上包括了10 000组cDNA,每一组cDNA允许对它的同源人类基因进行表达监控.一套4个的Synteni微型阵列能对40 000个人类基因进行表达监控,而这正是目前公开数据库中单表达序列的数目.尽管微型点样可能永远无法达到光刻技术达到的密度,但在机械点样技术上的进步可能最终能够生产在 6.5 cm^2 的面积上包括100 000组单元的芯片.由于其易用和价格原因,微型点样可能成为将来基础研究实验室对微型阵列的选择。

2.3 液体喷射技术

第3种微型阵列加工技术与机械微型点样技术的不同见图1c,此种方法的先进之处在于采用了压电和其他推动方式从微型喷嘴向固体表面转移生化成分^[15-18].类似于微型点样,此技术能对可能感兴趣的任何生物分子进行高密度的点样,包括cDNA、基因DNA、抗体和小分子.液体喷射技术正在包括Incyte Pharmaceuticals (Palo Alto, CA, USA)和Protogene (Palo Alto, CA, USA)等几处中心进行发展。

尽管液体喷射技术目前还不如光刻和微型点样完善,但已被用来制作了密度为10 000个位点/ cm^2 的cDNA芯片.由于无需直接接触基底,压电转移在理论上能够达到非常高的效率.在样品载入

和样品转换上的进一步发展与此种方法本身具有的高效率的特点,将会促进复杂芯片的生产。基于压电的氨基磷酸酯试剂的转移最近已被用来制造高密度寡聚核苷酸微型阵列。

在对微型阵列的制造技术进行回顾后,无法断言哪种技术将在此领域占据统治地位,较为普遍的看法是以上所述的每种方法(可能还有其他的)^[19,20],将会在它们最具优势的领域内得以发展,共同推进微型阵列分析技术。尚在萌芽阶段的微型阵列工业,与科学、商业、经济与立法等因素结合,相信不久将会成为科学领域内一个完整的技术和服务体系。目前,在美国、欧洲等地区已出现了一些提供微型阵列仪器、产品及相关服务的制造商^[21]。

3 微型阵列的应用

3.1 使用 DNA 阵列进行基因表达和基因发现

DNA 芯片已被用来测定植物^[5,22]、酵母菌^[12,23]和人类^[6,8,9,24]样品中的基因表达水平。在早期的工作中,Schena 等使用 48 个复制 cDNA 单元的微型阵列,用一套混合的用荧光素或丽丝胺标记了的探针(阴性控制为鼠糖皮质激素受体和酵母 TRP4 cDNA)对 *Arabidopsis thaliana* 中的差异表达进行了同时测量,用增强的人 AchR mRNA 作为对照,对结合探针的信号作了校正。阴性控制没有信号,证明这种阵列具有高度选择性,检测限为 1:50 000 w/w 总 mRNA。对靶 DNA 进行了测序,与公开数据库进行对比,48 个样品中有 45 个是吻合的。其中,转基因植物与其野生型相比,HAT4 基因的表达增强了 10 倍,其他 44 个则差别因子在 5 以内,另外,荧光素标记的鼠糖皮质激素受体和丽丝胺标记的酵母 TRP4 cDNA 两种控制探针的结果表明两种荧光间没有交叉干扰。这项研究表明可以在同一阵列中,用两套探针对两种生物样品同时进行表达水平测定。之后,用从 *Arabidopsis* 根和叶 mRNA 中得到的探针进行了表达差异的研究,结果表明,光调控 CAB1 基因在叶组织中的表达水平相当于根组织中的 500 倍,这与预料的一致,因为众所周知此基因在根细胞中是被高度抑制的。

Schena 等使用双色差异表达分析(热休克或佛波酯调控基因),对 1 046 个未知的人类 cDNA 进行了表达监控。此系统比以前的工作灵敏度高出 10 倍以上,检测限与总人类 mRNA 之比为 1:500 000 w/w。用从热休克和佛波酯处理过的细胞中提取的总 mRNA 制得的探针,在同一块芯片上,对热休克和佛波酯处理对人体 T 细胞的影响进行了研

究^[6]。对诱导基因的 cDNA 进行了测序后,与已知结构进行了对比。这证明了 cDNA 微型阵列能够快速地为基因表达和生化途径间的联系提供数据。

此项技术还被用来对风湿性关节炎(RA)和肠炎(IBD)两种炎症进行了基因表达研究^[9]。从 RA 组织或 IBD 粘液中得来的探针用 Cyt 3 或 Cyt 5 荧光物质进行了标记,与包含从已知与上述疾病有关的基因得来的 cDNA 微型序列进行了杂交。观察到了已知在炎症中会出现的基因如肿瘤坏死因子、白介素和粒细胞生长因子。有些以前未曾与炎症相联系的基因也得到了表达,如金属弹性蛋白酶(HME)和色素生长刺激因子,它们将被作为治疗的目标。这表明 cDNA 芯片能够快速提供疾病基因基础的有关信息。

De Risi 等^[8]用两种颜色的荧光研究了致瘤性的基因基础。人类黑色素细胞株 UACC-903 的致瘤性可通过插入人类染色体 6 来转变,从两种细胞中制得的探针用两种荧光物质标记。这些探针混合后加到含有挑选来研究肿瘤抑制作用的 1 161 个 cDNA 的微型阵列上,差异表达的结果提供了有关这种肿瘤的分子病理的有用信息。

包含有 *S. cerevisiae* 所有基因的 cDNA 微型阵列已被制造出^[23],可广泛研究在限制葡萄糖的提供量时,从厌氧到有氧代谢的二次生长的效应及其带来的将乙醇作为碳源的转变。这个研究的意义在于将已知功能的基因的表达变化与代谢途径对应起来,生动的表明了移动中哪一个代谢途径被重新安排了。例如,当酵母细胞转而将乙醇作为碳源时,将对基因编码乙醇脱氢酶产生很大诱导作用,而相应的,乙醛脱氢酶的编码则被强烈抑制了。另外,还获得了许多以前未知的基因的表达型。

Shalon 等制造了已绘制出基因图谱的 *S. cerevisiae* 的基因组 DNA 片段阵列,并将它们与从 6 个最大的染色体或 10 个最小的染色体上得来的、并用丽丝胺或荧光素标记了的染色体探针进行了杂交^[12]。通过每一组的颜色是红还是绿来指示靶 DNA 是否与 6 个最大的或 10 个最小的染色体结合,得到了这 16 种染色体的染色体组型。95% 的阵列克隆与以前发布的图谱位点吻合。

Drmanac 等^[25]使用相对含较多数目 cDNA 单元的微型阵列对婴儿脑组织进行了大范围的基因发现。与 Shalon 等的工作相反,探针是每次加一个,而不是混合在一起加上去的。将克隆用统计学的方法分类成簇,每簇包括一个表达基因,从婴儿脑组织

中得到的73 536个 cDNA 克隆与 200 ~ 320 个探针进行了杂交,对簇的情况进行了分析后,有19 726个基因得到了确认,且结果表明另外还有20 000个可能以较低水平进行了表达。这种方法能够用来进行大范围的商业性的基因筛选,含5 500个 cDNA 的微型阵列每月可以筛选800 000个克隆。

与此类似, Milosavljevic 等^[26]使用基因芯片对 *Escherichia coli* 基因组进行了大范围的基因辨别。997个短寡聚核苷酸探针与15 328个随机筛选的基因组克隆进行了杂交。结果根据探针进行了编辑分析,与 *E. Coli* 的序列数据库进行了比较,在一次实验中14.6 Mb的序列结构得到了辨别。

3.2 在基因发现和表达方面使用寡聚核苷酸阵列

与 De Risi 等^[23]使用 cDNA 微型阵列对整个 *S. cerevisiae* 基因组进行研究的同时, Wodicka 等^[3]用寡聚核苷酸阵列对同一课题进行了探索。包含260 000个 25-mer 的寡聚核苷酸探针的4个基因芯片涵盖了酵母基因组的每个开放读框(ORF)。每个芯片包含65 000个探针位点。为了使结果更为准确,合成时设计为每个基因与其邻位只相差一个中心碱基,将非配对探针的信号从完全配对了的探针的信号中进行扣除,从而对非特异性结合和背景荧光进行了补偿。酵母细胞在营养或贫瘠介质中进行培养,90%的基因在两种不同环境中生长起来的细胞中都得到了表达,包括结构蛋白和核糖体蛋白。灵敏度和线性都很好,线性范围从每个细胞0.05到6个拷贝。有36种 mRNA 在营养介质培养的细胞中含量较多,而有140种在贫瘠介质中培养的细胞中含量较多,除了已知功能的基因外,还检测到了以前未曾研究过特性的基因。

这个实验得到的丰富数据,尤其是所分析的基因数目表明这种方法能够有效地对含有高达1 kb的 ORF 的复杂样品进行重新测序。至于观察到的在两种介质培养下不同的表达水平是否象前边对 *S. cerevisiae* 二次生长研究^[23]那样与代谢途径联系起来还有待探索。

在以前的工作中, Lockhart 等^[7]使用寡聚核苷酸阵列,对用激态 4-phorbol-12-myristate-1,3-acetate 刺激的鼠 T 细胞中的所有细胞质 mRNA 的表达水平作了测定。观察到了高水平的 γ -干扰素和较低水平的细胞因子,且和预料的一致, β -肌动蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的表达水平没有明显变化。在独立的校正实验中,动态范围从1:300 000 000到1:300 w/w 总微型阵列,此检测限可以与 Schena

等用 cRNA 得到的1:500 000 w/w^[6]相比。

寡聚核苷酸阵列已用来对细菌的基因进行表达水平测定^[27]。这项工作的一个重要意义在于无需提纯总 RNA 而可直接表达 mRNA(由于细菌中 mRNA 的含量很低,只占总 DNA 含量的4%,所以提纯 mRNA 重复性很差)。用含64 000个探针的阵列对100个 *Streptococcus pneumoniae* 基因进行了检测,灵敏度要高于 Northern 印迹杂交的结果,相同样品间的偏差为25%或更小。这个阵列已证实了感受态基因 *cin A*, *rec A* 和 *lyt A* 分别诱导至30, 18和10倍的表达水平。与此类似,还测定了 *S. pneumoniae* 在指数期和稳定期的表达差异,在稳定状态下,分别负责多糖荚膜、长链脂肪酸生物合成和细胞分裂的酶的编码基因的表达水平很明显处在较低的水平,并如预料有四个基因被诱导了。这证明只用一个阵列且无需提出 mRNA,就可以检测多对联合调控的细菌基因。

3.3 突变和多态性的检测

Hacia 等^[28]用一个含有96 600个寡聚核苷酸探针的基因芯片对所有可能出现在 BRCA1 乳腺和卵巢癌基因的3.45 kb 长的外显子11中的杂合子进行了检测。控制和样品分别用两种颜色的荧光标记。对15个病人的基因和一个阴性对照进行检测,结果得到了8个单碱基多态性。这些令人振奋的结果还包括在后来的工作中发现在 BRCA1 的基因在22个编码外显子中出现了突变。但这种芯片只含有5 592个碱基对,若是使用已能制造的400 000个探针密度的基因芯片,则可以在一块芯片上对所有的突变进行检测。

Scheemaker 等^[29]用基因芯片技术证明可以用20个碱基的标记物,每种对应一个突变,同时检测在不同条件下培养的11种 *S. cerevisiae* 突变菌株。在缺少腺嘌呤的培养环境中,腺嘌呤突变菌株的出现比较少,表现在微型阵列上信号较弱。类似的,在没有色氨酸的介质中生长起来的菌株没有色氨酸突变。*S. cerevisiae* 基因组目前已完成了测序,需要进一步研究其基因组的生物功能,如制造特异缺失的菌株,在多种选定条件下进行测试等。

Lipshutz 等^[30]证明基因芯片可用来对 HIV-1 病毒中的反转录酶和蛋白酶基因进行突变筛选,而这样的突变是引起对如 AZT 等抗生素抗药性的原因。Kozal 等^[31]对那些还没有使用蛋白酶抑制剂的病人,用基因芯片对其 HIV-1 分枝蛋白酶基因的多态性进行了研究。用 Sanger 法测序的结果对芯片

得到的结果进行了检查。考察的 114 个样品中两种方法的符合率高达 98%, 大部分的多态性被观察到了。

用 Affymetrix 芯片对囊性纤维化跨膜传导调节基因(CFTR)进行了研究^[32]。设计了一种芯片对 CFTR 外显子 10 和 11 中已知的缺失、插入和碱基替换进行了检测。分析了 10 个未知病人的样品, 其结果与用 PCR 产物限制酶片段分析的结果相同。

Chee 等^[13]制造了一种包含有 135 000 个 25-mer 的探针的基因芯片, 对 16.6 kb 的人体线粒体基因组进行了检测。为比较突变的线粒体 DNA(mtDNA)和控制 mtDNA, 使用了两种颜色的荧光。分析了 10 个个体的线粒体基因组, 检测到了 505 个多态性。每个样品可在 12 min 内分析完。据此估计, 在一个工作日内, 可以分析 40 个 mtDNA 基因组, 而一个比较先进的凝胶测序仪则只能测两个。

用寡聚核苷酸阵列对血样中的 β -地中海贫血症突变进行了检测, 芯片是由事先合成的 10-mer 固定在铺有凝胶的玻璃片上^[33]。在 β -球蛋白的 3 个位点检测到了突变。然后加入配在溶液中的 5-mer 探针进行接触的累积杂交, 对 IVS-1-1(G → A) 突变进行了进一步的检测。

Heller 及其合作者使用正电场增加带负电的探针的传质速率, 使得杂交速度增加了 10 倍^[34]。样品寡聚核苷酸在正电场的作用下趋向电极 C4, 与链霉亲和素键合。然后用负电场除去未结合的样品, 再用脲氨酸缓冲液冲洗。在电极 C5 重复此过程, 但此处样品寡聚核苷酸有一个碱基不配对。然后用一个正电场加入与 Bodipy Texas Red 结合的探针, 进行杂交, 洗去未结合的探针。电极用电解质覆盖后, 加一个负电场, 之后是一个脉冲电流, 从而分离包含突变的二元复合物。在 15 s 内用荧光检测到了单碱基突变^[20]。

3.4 对基因文库进行图谱绘制

通过确定重复基因的程度, 基因芯片已用来对基因组文库进行图谱绘制^[35]。从 12 个基因组克隆中制备了 *S. cerevisiae* 粘粒 DNA, 并用一种限制酶在 Ear I 位点处固定了 10-mer 微型阵列 r 标记物。在 PCR 扩增、用荧光标记物标记和制得了 ssDNA 之后, 产物与一个 256 单元的阵列进行了杂交。规范了荧光强度后, 用统计分析对每个相邻的克隆对进行了相关分类。10 个信号最强的粘粒划分为一个连续序列。这证明可以用这种方法以非常高的平行度进行克隆基因图绘制。由于每个克隆的所有化学

反应是在一个试管中完成的, 所以可以快速平行地对许多克隆进行分析。进一步说, 所有的分析步骤都适用于自动化, 这就能够得到更高的效率。据作者估计, 每人每天可以对几百个克隆进行基因图谱绘制。

3.5 使用寡聚核苷酸阵列进行测序

在高密度寡聚核苷酸阵列芯片的基础上, 可以对一定长度的靶 DNA 分子进行杂交测序(SBH)。近年来由于引入了磷光成像仪等, 使同位素标记的 DNA 杂交测序变得简单易行, 而荧光显微镜和扫描仪等的使用, 则可对荧光标记的 DNA 杂交测序结果进行高灵敏度和高分辨率的检测。根据计算机模拟实验知道, 6-mer, 7-mer 和 8-mer 的寡聚核苷酸阵列, 能有效测定的靶 DNA 片段的长度为 500, 2 000 和 8 000 bp^[36]。

4 结论

DNA 及寡聚核苷酸微型阵列技术正在飞速发展, 并已应用于多种领域。通过为大量的细菌、菌类、植物和动物提供序列蓝图, 基因时代的到来可能会永远地改变生物学。正在迅速发展的基因芯片(DNA 及寡聚核苷酸微型阵列)所具有的或潜在的优点是: 在制造方面, 能够进行高度自动化的大批量生产, 有利于保证芯片的质量和低廉的价格; 在应用方面, 能进行大量的诊断(突变和多态性检测)分析、生物医药研究、基因发现、基因表达、基因图谱绘制和 DNA 片段测序工作和提供许多其他的基因信息。这使得这种技术在今后的研究中仍将继续成为一大热点。基于芯片分析而得来的巨大数据流将由强有力的生物信息工具进行管理和分析。对基因芯片数据库的计算机查询最终将会推动整个生物医学研究。

关键词 DNA 芯片; 微型阵列芯片

参 考 文 献

- 1 De Risi JL, Iyer VR, Brown PO. *Science*, 1997, **278**: 680
- 2 Lashkari DA, McCusker JH, Davis RW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8945
- 3 Wodicka L, Dong H, Mittmann M, et al. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 1
- 4 Fodor SPA. *Science*, 1997, **277**: 393
- 5 Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. *Science*, 1995, **270**: 467
- 6 Schena M, Shalon D, Heller R, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 10614
- 7 Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1675

- 8 DeRisi J, Penland L, Brown PO, *et al.* *Nat Genet*, 1996, **14**: 457
- 9 Heller R, Schena M, Chai A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 2150
- 10 Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, *et al.* *Anal Biochem*, 1997, **250**: 203
- 11 Kallionie mi A, Kallionie mi OP, Sudar D, *et al.* *Science*, 1992, **258**: 818
- 12 Shalon D, Smith JS, Brown PO. *Genome Res*, 1996, **6**: 639
- 13 Chee M, Yang R, Hubbell E, *et al.* *Science*, 1996, **274**: 610
- 14 Fodor SPA, Read LJ, Pirrung MC, *et al.* *Science*, 1991, **251**: 767
- 15 Brennan TM. *US Patent*, 5 474 796, 1995
- 16 Baldeschwieler JK, Gamble RC, Theriault TP. *World Patent Application PCT WO 95/25116*, 1995
- 17 Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. *Biosens Bioelectr*, 1996, **11**: 687
- 18 Eggers M, Hogan M, Reich RK, *et al.* *BioTechniques*, 1994, **17**: 516
- 19 Sosnowski RG, Tu E, Butler WF, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 119
- 20 Schena M, Heller RA, Theriault TP, *et al.* *Trends Biotech*, 1998, **16**: 301
- 21 Schena M. *Bioassays*, 1996, **18**: 427
- 22 DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. *Science*, 1997, **270**: 680
- 23 Iyer VR, DeRisi JL, Eisen M, *et al.* *Fed Am Soc Exp Biol*, 1997, **11**: 1126
- 24 Drmanac S, Stavropoulos NA, Labat I, *et al.* *Genomics*, 1996, **37**: 29
- 25 Milosavljevic A, Savkovic S, Crkvenjakov R, *et al.* *Genomics*, 1996, **37**: 77
- 26 De Saizieu A, Certa U, Warrington J, *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 45
- 27 Stipp K. *Fortune*, 1997, **3/31**: 56
- 28 Shoemaker DD, Lashkari DA, Morris D, *et al.* *Nat Genet*, 1996, **14**: 450
- 29 Lipshutz RJ, Morris D, Cjee M, *et al.* *Biotechniques*, 1995, **19**: 442
- 30 Kozal MJ, Shah N, Shen N, *et al.* *Nat Med*, 1996, **2**: 753
- 31 Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, *et al.* *Hum Mut*, 1996, **7**: 244
- 32 Yershov K, Barsky V, Belgovskiy A, *et al.* *Genetics*, 1996, **93**: 4913
- 33 McIntyre PE. *Trends Biotech*, 1996, **14**: 69
- 34 Sapolsky RJ, Lipshutz RJ. *Genomics*, 1996, **33**: 445
- 35 吴乃虎. 固定 DNA 或寡核苷酸的矩阵芯片. 见: 吴乃虎 编著. 基因工程原理(上), 第二版. 北京: 科学出版社, 1998. 79 ~ 81

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND APPLICATIONS OF MICROARRAYS

Jin Ya and Luo Guoan

(*Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084*)

KEY WORDS DNA chips; microarray