

生物芯片及其应用进展

杜金伟综述, 朱 平审校

关键词: 生物芯片; 微阵列; 进展

中图分类号: R394 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)06-0374-03

0 引言

生物芯片是世纪之交发展起来的一项分子生物学新技术。它是将生物分子有序地固定于支持物(如硅片、玻片、聚丙烯酰胺凝胶、塑料、尼龙膜等)的表面,形成高密度的点阵,与样品中的靶分子作用后,对杂交或反应信号进行检测,从而对样品中的靶分子进行定性或/和定量。该技术不仅可以显著提高实验室的工作效率,更重要的是,它可以同时对一个生物体的多个基因甚至全部基因进行分析检测,研究生物分子之间的相互作用。

1 生物芯片的种类

根据目前生物芯片的特点和发展趋势,可以将其分为四类,即基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片和 PCR 芯片。把寡核苷酸、DNA 或 cDNA 固定在芯片载体上,这样的芯片被称为基因芯片(GeneChip)。蛋白质芯片上固定的探针分子为多肽或蛋白,包括抗原、抗体、受体、酶等。组织芯片采用了与基因芯片、蛋白质芯片完全不同的设计策略,它是针对在原位检测不同样本中同一个实验指标而设计。将几十到几百个小组织样本以规则的阵列方式包埋于同一蜡块后,进行切片制作而成。用生物芯片进行 PCR 扩增及相关检测,即在芯片上同时进行大量的 PCR 反应,这就是 PCR 芯片。本研究室和北大微电子所合作,用聚二甲基硅氧烷(PDMS)设计制作了一种含有 1064 个微反应池的 PCR 基因芯片, Taqman 和 SYBR 荧光 PCR 反应均能够在 PCR 芯片上进行^[1]。

2 生物芯片的制作方法

DNA 微阵列的制作工艺已经比较成熟,典型的有四种方法:光引导原位合成法,打印原位合成法,分子印章原位合成法,点样法。针对 DNA 的二级结构会导致失真的杂交结果(链内杂交问题),人们研发出了通过使用肽核酸(Peptide Nucleic Acids, PNA)探针解决该问题的新方案。PNA 与互补的

DNA 或 RNA 序列有更强的亲和性及特异性,杂交后更加稳定,并且 PNA 探针比 DNA 探针更容易接近靶序列。Henrik Stender 等^[2]采用荧光原位杂交(FISH)法,通过 PNA 探针检测、计数大肠杆菌,与传统的方法相比,不但提高了灵敏度,而且更加快速便捷。值得特别提出的是,最近国内东南大学^[3]研制出了双链 DNA 探针芯片:把 3' 端具有反向互补序列的单链寡核苷酸点到玻片上,“退火”使反向互补序列形成“发卡”结构,充当引物,最后经 Klenow 酶延伸形成完整的双链。该种芯片为序列特异性 DNA-蛋白质相互作用的研究提供了一种新的技术平台。

蛋白质芯片比基因芯片难于制作,且定位于载体表面的蛋白质分子易于改变空间构象而失去原有的生物活性。故而,目前研究热点集中在如何在保持蛋白质功能的前提下,将其固定于载体表面。R. Bashir 小组^[4]在硅片表面热氧化形成 SiO₂ 层,通过射频溅射(radio-frequency sputtering)覆盖铂于 SiO₂ 层上,然后把硅片置于抗生物素蛋白(Avidin)反应液,缓冲液冲洗后,用生物素与芯片上的 Avidin 反应,证明 Avidin 仍保持生物活性。凝胶也是一种较好的载体,Argonne 实验室^[5]在玻片上刻出小方孔,向里面加入含丙烯酰胺的反应液,紫外光照射使丙烯酰胺聚合。最后向凝胶块中加入蛋白溶液,利用戊二醛活化凝胶使其与蛋白连结。他们利用此类芯片进行了抗原抗体的检测和酶促反应动力学研究。

3 生物芯片的检测

目前,大多数生物芯片采用的是荧光检测。另外,还有以质谱分析为基础的直接检测技术,如表面增强激光离子化解析-飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)。Obeid^[6]报道了激光诱导荧光检测系统应用于连续流动 DNA/RNA 扩增芯片的检测,在反应中引入染料 SYBR Green I(SGI),荧光强度与 DNA 量呈线性关系。

同时,人们在积极建立其他的检测方法,如基于导电性变化的 DNA 阵列检测^[7]。Gannett PM 等^[8]研究了一种利用电子顺磁共振(EPR)的 DNA 阵列

收稿日期:2004-02-17;修回日期:2004-04-14
作者单位:100034 北京大学第一医院血液科

检测方法,他们使用硝基氧自旋标记物,探讨了该方法是否能够鉴别与芯片杂交的 DNA 和溶液中的未杂交的 DNA,获得了肯定结果。

4 生物芯片的应用

4.1 基因结构与功能研究

4.1.1 基因测序 DNA 微阵列中的杂交测序是一种高效快速的测序方法。德国一所大学^[9]成功地利用肽核酸生物传感器芯片进行 DNA 测序,通过检测 DNA 上的磷酸基团,证实使用时间飞行二次离子质谱(TOF-SIMS)技术可以很容易地鉴别杂交到肽核酸生物传感器芯片上的 DNA。研究还显示,该技术在基因诊断方面具有很大的应用潜力。

4.1.2 基因表达分析 功能基因组学研究的是在特定组织中发育的不同阶段,或者是疾病的不同时期基因的表达情况,需要在同一时刻获得多个分子遗传学的分析结果,生物芯片技术很好地满足了这一要求。Cloud PP 等^[10]利用激光捕捉显微切割技术(Laser capture microdissection, LCM),联合蛋白质芯片研究了正常人、结肠癌病人、癌转移病人结肠组织蛋白的表达情况,发现了不同的表达图谱。Tarui T 等^[11]用 DNA 芯片分析了烧伤病人淋巴细胞中细胞因子基因的表达情况,发现 IFN R1, IL-1R1, -2Ra, -2Rh, -2R, -6Ra, 和-7R 降低,IFN-, IL-1, -13, 和-15 表达升高,从而为烧伤病人的治疗提供依据。Song J H 等^[12]绘制了早幼粒细胞性白血病 HL-60 细胞向单核细胞或者粒细胞分化过程中一些肿瘤相关基因的表达谱。

4.1.3 基因突变和多态性检测 基因组水平 DNA 序列变化-基因突变和单核苷酸多态性(SNP),正受到人们的重视,分析 SNP 最有效、应用最广泛的方法是用等位基因特异的寡核苷酸探针进行示差杂交。Weidong Du 所在的研究小组^[13]报道了一种分析人线粒体 tRNA 单核苷酸多态性的方法,他们采用一种称为“XNA on Gold Chip”的技术平台,把一系列各含有一个碱基突变的等位基因特异性探针固定于芯片上,分别与荧光标记的参考核酸及样本扩增产物杂交,通过分析杂交信号进行 SNP 的检测。

4.2 生物分子间作用的研究

传统的酵母双杂交系统研究蛋白质间作用有很多局限,如未正确折叠的蛋白质不易检测,不能控制蛋白质的翻译后修饰,易产生假阴性等。日本^[14]研制了一种基于表面等离子体共振(SPR)的生物芯片,用于研究与蛋白质结合的特异 DNA 序列。他们把转录因子 NtERF2 的 DNA 结合结构域固定于芯片上,用大量的随机寡核苷酸与之反应,由此筛选

结合的特异 DNA 分子。

组蛋白的甲基化和乙酰化影响体内许多基因的活性,美国加州大学的研究人员^[15]把染色质免疫沉淀和 DNA 微阵列技术联合起来,设计了一种研究组蛋白修饰的快速方法,可以在全基因组水平研究组蛋白的修饰活动以及各种不同的修饰之间的关系。

4.3 疾病的诊断

已知细菌、病毒等病原微生物的部分核酸序列,设计相应的引物及探针,用杂交的方法检测,或者直接检测是否有目的 PCR 产物,可以用来诊断感染性疾病。许多遗传病,如血友病、地中海贫血、苯丙酮尿症等,都已发现相应的基因异常,肿瘤的发生发展也往往涉及许多基因异常,例如慢性粒细胞性白血病会检测到融合基因 bcr-abl,急性早幼粒性白血病可检测到融合基因 pml-rara 等,可以同时检测大量基因异常的芯片技术势必大力推动临床疾病的诊断。Grubor NM^[16]介绍了一种单克隆抗体芯片,采用 dithiobis succinimidyl propionate (DSP)作为蛋白的连结臂,把单抗固定于芯片上,可以同时检测 DNA-carcinogen adducts。

5 展望

生物芯片涉及生物、医学、化学、物理、材料学、微电子技术、精密仪器等各领域,虽然已有长足发展,但一些技术瓶颈和昂贵的成本仍在制约它的进一步发展和应用。目前,人们正在努力解决以下几个问题:不需要标记的杂交信号检测方法;自动化流动系统;有效的数据采集和分析;芯片的标准化;降低成本等。总的发展趋势应该是从现在较为成熟的基因芯片向蛋白芯片、细胞芯片发展,同时会发展出基于多种用途的高度集成的微型化学和生物分析装置,如毛细管电泳微阵列、介电电泳芯片、信号传递芯片、药物筛选芯片,甚至还可能会出现人体内置芯片。可以相信,生物芯片技术将会在生命科学、医学、药学、环境、法医学等学科领域发挥不可替代的作用。

参考文献:

- [1] Yu X, Zhang D, Li T, et al. 3-D microarrays biochip for DNA amplification in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Sens [J]. Actuators A*, 2003, 108 (1-3) : 103-107.
- [2] Stender H, Oliveira K, Rigby S, et al. Rapid detection, identification, and enumeration of Escherichia Coli by fluorescence in situ hybridization using an array scanner [J]. *J Microbiol Methods*, 2001, 45(1) : 31-39.
- [3] Wang J, Bai Y, Li T, et al. DNA microarrays with unimolecular hairpin double-stranded DNA probes: fabrication and exploration

of sequence-specific DNA/protein interactions. *J Biochem Biophys [J]*. *Methods*, 2003, 55(3):215-232.

[4] R Bashir, R Gomez, A Sarikaya, et al. Adsorption of avidin on microfabricated surfaces for protein biochip applications [J]. *Biotechnol and Bioeng*, 2001, 73(4):324-328.

[5] Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions[J]. *Anal Biochem*, 2000, 278(2):123-131.

[6] Obeid PJ, Christopoulos TK. Continuous-flow DNA and RNA amplification chip combined with laser-induced fluorescence detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494(1):1-9.

[7] Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes[J]. *Science*, 2002, 295(5559):1503-1506.

[8] Cannett PM, Powell JH, Johnson II EM, et al. Solid-phase DNA binding detection by EPR spectroscopy [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(11):1931-1933.

[9] Arlinghaus HF, Ostrop M, Friedrichs O, et al. Genome diagnostics with TOF-SIMS Appl Surf [J]. *Sci*, 2003, 203-204:689-692.

[10] Cloud PP, John WG, David KO, et al. Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip[J]. *Drug Dev Res*, 2000, 49(1):34-42.

[11] Tarui T, Murata A, Yoshie R, et al. Alteration of the cytokine-related gene expression levels in lymphocytes observed in thermally injured patients estimated by the DNA chip technology[J]. *International Congress Series*, 2003, 1255:79-85.

[12] Song JH, Kim JM, Kim SH, et al. Comparison of the gene expression profiles of monocytic versus granulocytic lineages of HL-60 leukemia cell differentiation by DNA microarray analysis[J]. *Life Sci*, 2003, 73(13):1705-1719.

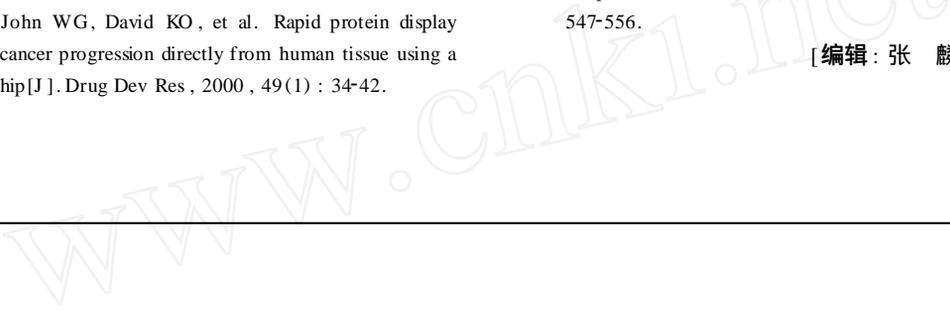
[13] Weidong D, Marsac C, Kruschina M, et al. Functionalized self-assembled monolayer on gold for detection of human mitochondrial tRNA gene mutations[J]. *Anal Biochem*, 2003, 322(1):14-25.

[14] Hao D, Ohme-Takagi M, Yamasaki K. A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins [J]. *FEBS Lett*, 2003, 536(1-3):151-156.

[15] Robyr D, Grunstein M. Genomewide histone acetylation microarrays[J]. *Methods*, 2003, 31(1):83-89.

[16] Grubor NM, Shinar R, Jankowiak R, et al. Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(6):547-556.

[编辑:张麟;校对:安凤]



(上接第 355 页)

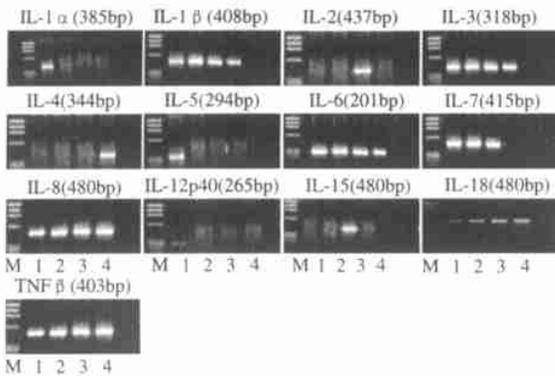


图 1 4个巨核细胞白血病细胞株的细胞因子基因表达

较少表达在分化程度最差的 M-07e 细胞株中。

研究发现,许多实体肿瘤和白血病存在自分泌/旁分泌调节机制,涉及了大量的细胞因子^[1,3]。本研究结果与其他相关报道同样也显示了巨核细胞白血病存在多个正调节的自分泌生长因子,如 IL-1、IL-3、IL-6 等。

巨核细胞在免疫网络中的作用和地位,近年来逐步得到认识^[5]。我们与其他学者的研究显示,巨核细胞能够合成和表达黏附蛋白和细胞因子,参与免疫反应,对机体具有一定的保护作用。本实验结

果显示,涉及免疫炎症反应的细胞因子 IL-1、IL-5 和 IL-12p40 仅在细胞分化程度高的 Meg-01 中表达,而在分化程度最差的 M-07e 细胞株中则很少表达。这提示了巨核细胞白血病发生过程中,可能存在巨核细胞的免疫调节功能受损。

由此可见,巨核细胞白血病的发生与细胞因子网络的失衡可能具有密切的关联性,值得今后在巨核细胞白血病病人的临床诊疗过程中进一步关注。

参考文献:

[1] Wickenhauser C, Lorenzen J, Thiele J, et al. Secretion of cytokines (interleukin-1, -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor) by normal bone marrow megakaryocytes [J]. *Blood*, 1995, 85(3):685-691.

[2] Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2002, 99(12):4283-4297.

[3] Yang M, Li K, Chui CM, et al. Expression of interleukin-1 type I and type II receptors in megakaryocytic cells and enhancing effects of IL-1 on megakaryocytopoiesis and NF- κ B expression[J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(1):371-380.

[4] 杨默,李桂霞,戚其威,等. 巨核细胞的免疫学研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2000, 8(1):5-9.

[编辑:张麟;校对:刘红武]