

几种新型生物芯片的研究进展

徐炳森 邵健忠¹⁾

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘要 随着生物芯片技术的迅速发展, 一些新型生物芯片, 如生物电子芯片、凝胶元件微阵列芯片、药物控释芯片、毛细管电泳或层析芯片、PCR 芯片及生物传感芯片等应运而生, 这些芯片不同于常规的分子微阵列芯片, 而是以各种结构微阵列为基础, 用于分子杂交与扩增, 以检测突变、分析多态性及测序, 通过电泳及层析分离生物样品, 控制药物释放以治疗疾病, 作为生物传感器检测分子行为等, 具有分析速度快、效率高、样品消耗少等特点, 将成为生命科学与医学领域的新工具。

关键词 新型生物芯片, 结构微阵列, 研究进展

学科分类号 Q52

随着学科交叉的不断深入, 生物芯片已成为国际上的研究前沿和热点。根据目前生物芯片的特点和发展趋势, 可将其分为两类。第一类由高密度分子微阵列构成, 包括 DNA 芯片、肽芯片等, 通过光导原位化学合成或芯片外合成后点样构建而成, 已在基因结构与功能研究中得到应用^[1]。但是, 这类芯片存在操作复杂, 探针合成工作量大, 成本高昂, 依赖分子的杂交, 单块芯片功能较单一等缺点。近年来, 许多研究者纷纷开发的第二类生物芯片以各种结构微阵列为基础, 包括由微电极、凝胶元件、微陷井等构成的元件型微阵列和由微通道或反应池等构成的通道型微阵列, 通过加载生物样品, 进行一种或连续多种反应, 可以达到快速高效分析的目的。相对于第一类芯片, 第二类在结构和功能上比较独特, 是新型的生物芯片, 其发展引人注目。

1 元件型微阵列芯片

1.1 生物电子芯片

由常规分子微阵列构成的芯片, 探针与靶分子被动杂交, 反应得率受分子扩散的限制, 故有学者设想构建微电极阵列, 利用电场增强杂交。Sosnowski等^[2]采用微电子工艺, 在热氧化惰性处理的硅片基上构建了 25 个半径 40 μm 的 Pt-Si₃N₄ 电极阵列, 并在电极上蚀刻出样品池, 其上覆盖带有链霉亲和素的琼脂糖凝胶渗透层。在电场作用下, 生物素标记的探针被转运到特定的电极上与目的片段杂交, 达到了能检测单碱基错配的分辨率。这种杂交不仅反应速度快, 通过改变电场强度还可

控制分子结合的强度。更重要的是, 可在此类芯片上直接制备杂交样品, 克服了常规分子微阵列芯片的制样困难。Cheng 等^[3]把这种由电极微阵列构成的芯片称为生物电子芯片。1998 年, 他们用该芯片首次对病人全血进行分析, 在电场作用下, 血中的 *E. coli* 富集到电极上, 以高压电脉冲裂解菌体, 用蛋白酶 K 消化后得到纯化的核酸, 再转移到另一块芯片上杂交, 证实了 *E. coli* DNA 的存在^[3]。此后, 他们又对其他患者作了类似分析, 以检测溶壁微球菌和表皮葡萄球菌。这类芯片发展迅速, 1999 年, Gilles 等^[4]在硅片上蚀刻出电子回路和电极构成芯片, 经扩增的病人 DNA 样品在芯片上转运、浓缩并吸附到特定电极上形成阵列, 并与荧光标记的探针杂交, 快速精确地区分了人甘露糖结合蛋白基因中复杂的四等位单核苷酸多态性, 并把该方法称为电子点杂交。

1.2 凝胶元件微阵列芯片

该芯片又称凝胶固化组分微阵列芯片, 由美国能源部阿尔贡国家实验室和俄罗斯恩格哈特分子生物研究所联合研制^[5]。他们先在玻璃片基上制备聚丙烯酰胺凝胶垫板。用划线器雕刻出凝胶元件微阵列, 再用毛细管把 DNA 加载到凝胶元件上形成分子阵列, 并与荧光标记的靶 DNA 杂交。理论上 1 cm^2 片基可容纳 2~3 万个 40 μm × 40 μm 的凝胶元件, 每个元件相当于 20 nl 精密试管, 彼此以疏水玻璃间区分隔^[5,6]。该芯片可直接用于突变检

¹⁾ 通讯联系人, 浙江大学西溪校区生命科学院, 杭州 310012。

Tel: (0571) 8845635, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 1999-12-18, 修回日期: 2000-02-18

测, Yershov 等^[6]用接有十聚核苷酸的凝胶元件阵列, 与 β -地中海贫血病人血液中提取的 DNA 杂交, 成功检测了 β -珠蛋白基因第一外显子和第一内含子间的突变. Vasiliskov 等^[7]改进了上述方法, 采用光共聚合及过硫酸盐介导的共聚反应, 在凝胶垫板上构建出包含寡核苷酸和蛋白质的凝胶元件微阵列, 元件尺寸缩小到 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

另外, 凝胶元件阵列芯片与邻堆杂交技术相结合, 可以很好地解决杂交测序中的困难. 用 DNA 芯片杂交测序时, 需要 N 聚核苷酸的共 4^N 种所有可能探针, 当 $N > 10$ 时, 要合成包含 4^{10} 种以上探针的微阵列是相当困难的, 利用邻堆杂交技术可大大减少所需探针的数量. 1996 年, Parinov 等^[8]合成了 21 碱基的单链 DNA, 分别与固定在凝胶上的八聚和十聚核苷酸杂交, 洗去未结合的 DNA 后与荧光标记的五聚核苷酸杂交, 结果表明, 两寡核苷酸链相邻碱基间的堆积作用增强了双链的稳定性, 相当于延长了芯片上探针的有效长度, 从而提高测序精度和长度. 此外, 应用该芯片进行的杂交测序还可用于多态性及突变分析, 如 Dubiley 等^[9]曾在一个模式系统中鉴定了炭疽热毒素基因的多态性; Maldonado-Rodriguez 等^[10]则进行了点突变检测, 并对检测条件作了优化.

1.3 药物控释芯片

Santini 等^[11]最近研制了首个药物传送微芯片, 虽然它还在动物及人体实验阶段, 但专家们认为它将对未来病人的用药方式产生戏剧性影响, 这项发明被认为是概念上的重大突破. 该芯片是在 $1\ \text{cm}^2$ 的硅片上蚀刻出 34 个微陷井, 每个仅可容纳几纳升液体. 再经沉淀、压模、蚀刻等工序在芯片最上面产生金线电路薄膜层, 每个陷井上方有个电极, 该膜在受到电信号触发后, 电极电离使膜溶解并释放出内容物. 由于在芯片上可集成大量的陷井, 且每个陷井上的电极可被单独连线, 故可以分别控制每个内容物的释放. 若加载有效治疗药物, 该芯片就可长时间地同时控制一种或多种不同药物的释放. 该芯片特别适于释放精确剂量的高效药物, 这种原位多重药物调控系统在治疗帕金森氏综合症或癌症方面很有前途, 硅芯片成了体内药剂师^[12].

2 通道型微阵列芯片

2.1 毛细管电泳芯片

毛细管电泳技术发展起来后, Mathies 等^[13]首先提出毛细管阵列电泳的概念. 随后该研究小组利

用光刻技术, 先在玻璃片基上覆盖一层光刻胶, 使紫外线穿过掩膜图案对片基曝光, 溶去曝光部分, 其余加热变硬, 从而把设计好的泳道图案印刷到片基上, 最后盖上另一玻片形成三夹板结构, 构成毛细管阵列, 并在泳道中加入羟乙基纤维素基质. 他们用该芯片对 $\phi\text{X174 Hae III}$ DNA 限制性酶切片段 (70~100 bp) 进行了高分辨的分离, 所需时间仅 120 s. 另外, Woolley 等^[14]利用类似芯片在 2 min 内完成了 118~1353 bp 的 DNA 片段分离, 并采用单色和四色荧光标记, 在 10 min 内测定了约 433 bp 的 DNA 序列; Yao 等^[15]则进行了蛋白质 SDS-毛细管凝胶电泳, 结合荧光标记及激光诱导的荧光检测技术, 成功进行了六种蛋白质混合物的分离.

2.2 PCR 扩增芯片

常规 PCR 需要制样、扩增及检测等步骤, 费时费力. 用生物芯片进行 PCR 扩增及相关检测, 则可简化操作、提高效率. 1994 年, Wilding 等^[16]首先开展了这方面研究. 他们在玻璃片基上蚀刻出 40~80 μm 深、可容纳 5~10 μl 样品的微通道和反应室, 构成一次性 PCR 芯片, 在热循环仪中达到了扩增目的. 以后, Shoffner 等^[17]发现用加热法在片基上生成惰性氧化层能提高实验成功率; Taylor 等^[18]设计的芯片扩增体积只要 0.5 μl , 热循环时间比常规 PCR 少 5 倍而得率及特异性保持不变; 而在 Kopp 等^[19]的芯片中, 样品可在不同温度的恒温区间内流动, 经 20 个循环, 扩增了淋病奈瑟球菌 176 bp 的 DNA. 另外, PCR 芯片可用通道与毛细管电泳芯片相连, 使扩增产物得到快速高分辨的分离. 如 Cheng 等^[20]应用此类装置进行了人基因组随机扩增, 产物转移到另一芯片, 进行位点特异的人肌营养不良蛋白基因外显子多重 PCR 扩增, 产物用毛细管电泳分离, 其结果与常规方法相一致. Wilding 等^[21]则把硅基显微滤器反应室用于细胞分离与 PCR 扩增, 他们利用蚀刻在硅片上的一系列 3.5 μm 大小的水坝式微过滤器, 从全血细胞中分离出白细胞, 直接在芯片上加热裂解, 释放 DNA, 扩增出肌营养不良蛋白基因外显子 6 的 202 bp 序列. 这是典型的细胞分离和 PCR 扩增双功能微芯片.

2.3 集成 DNA 分析芯片

在各种基于芯片的分析装置中, Burns 等^[22]研制的集成纳升 DNA 分析芯片融合了多项技术, 具有较高智能度和集成度. 该装置大小为 $47\ \text{mm} \times 5\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$, 采用标准光蚀刻和显微加工工艺,

在硅片基上构建显微通道及各种复杂装置, 在计算机控制下, 由芯片外微空气泵驱动载有反应物、缓冲液及 DNA 样品的纳升级小液滴——“微射流”在整个芯片上流动. 通道中的疏水微区可把小液滴隔开, 而埋有聚丙烯基质的区域可进行原位电泳. 用裂解液释放细胞中的 DNA 后, 混合物注入反应室, 其中的一块玻璃墙靠电荷相互作用, 吸附样品中的核酸, 经清洗、重溶后流到扩增室, 由微加热器提供温度循环进行扩增, 然后把 DNA 转录成 RNA 并带上荧光标记, 送到 DNA 微阵列进行杂交. 这种整合了纳升进样器、温控反应室、样品混合及定位、电泳分离和荧光检测等系统的高度集成装置的出现, 表明复杂系统可缩微到纳米大小, 推动了实验室的微型化、芯片化.

2.4 毛细管电层析芯片

Jacobson 等^[23]较早利用微加工芯片进行层析分析. 他们用光蚀刻技术在玻片上制备高 5.6 μm 宽 66 μm 的通道, 表面以十八硅烷修饰后做固定相, 用电渗流转运流动相. 这类液相层析称毛细管电层析 (CEC), 它与 HPLC 很像, 但 CEC 中流动相仅靠电压驱动, 可按各组分的迁移率分离, 且条带扩散较少, 但通道的宽度限制了分辨率的提高. Regnier 等^[24]用深度活性离子蚀刻法, 在石英表面原位蚀刻出单片颗粒状支持结构阵列, 以替代常规层析柱中的微粒. 移动相通过电渗流在 1.5 μm 宽的通道上转运. 这种微加工 CEC 柱的分离效率与颗粒直径 1 μm 的常规填充柱相当. 这类芯片中电渗流的作用值得关注, 它是驱动流体在芯片上运动的新手段.

3 生物传感芯片

3.1 光学纤维阵列芯片

1996 年, Ferguson 等^[25]把一束光学纤维阵列作为 DNA 分子杂交的支持物, 并用灵敏且定量的荧光检测技术监控微量样品的杂交反应. 他们把合成的各种寡核苷酸探针分别共价结合到半径为 200 μm 的光纤末端, 构成传感芯片, 光纤的另一端与特制的落射荧光显微镜相连, 能够探测到探针与荧光标记的靶序列互补配对后增强的荧光, 从而快速 (< 10 min) 灵敏 (10 nmol/L) 地同时监测多重 DNA 序列的杂交. 该芯片的出现, 显示了生物芯片技术正朝着多样性方向发展.

3.2 白光干涉谱传感芯片

1998 年, Lin 等^[26]利用多孔硅表面反射干涉

光谱进行生物分子的检测. 多孔硅表面呈排列紧密的杆状凸起, 可使生物大分子探针附于其上, 当它与靶分子结合后引起芯片表面折射特性的改变, 这可通过反射干涉光谱分析探测. 这种生物传感芯片具有超高灵敏度, 可检测到飞克 (10^{-15} g) 的靶分子. 该芯片还可用于检测各种生物大分子如抗原-抗体、酶-底物等的相互作用. 这些用作生物传感器的芯片不仅为微量检测提供了新工具, 也给生物芯片的发展开辟了新的方向.

4 展 望

随着新兴缩微技术与构思的不断产生, 各种新型生物芯片层出不穷. 它们的发展与完善将对生命科学与应用产生深远影响.

参 考 文 献

- 1 Schena M, Shalon D, Davis W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (5235): 467~470
- 2 Sosnowski R G, William E T, James F B, *et al.* Rapid determination of single base mismatch mutation in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (4): 1119~1123
- 3 Cheng J, Sheldon E L, Wu L, *et al.* Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (6): 541~546
- 4 Gilles P N, Wu D J, Foster C B, *et al.* Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nature Biotechnology*, 1999, **17** (4): 365~370
- 5 Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A. Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips. *Anal Biochem*, 1998, **259** (1): 34~41
- 6 Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, *et al.* DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 4913~4918
- 7 Vasiliskov A V, Timofeev E N, Surzhikov S A, *et al.* Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization. *Biotechniques*, 1999, **27** (3): 592~594
- 8 Parinov S, Barsky V, Yershov G, *et al.* DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24** (15): 2998~3004
- 9 Dubiley S, Kirillov E, Mirzabekov A. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27** (18): 19
- 10 Maldonado-Rodriguez R, Espinosa-Lara M, Loyola-Abitia P, *et al.* Mutation detection by stacking hybridization on genosensor arrays. *Molecular Biotechnology*, 1999, **11** (1): 13~25
- 11 Santini J T, Cima M J, Langer R, *et al.* A controlled-release microchip. *Nature*, 1999, **397** (9): 335~338
- 12 Service R F. Silicon chips find role as *in vivo* pharmacist. *Science*, 1999, **283** (5402): 619

- 13 Woolley T A, Mathies R A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (24): 11348~ 11352
- 14 Woolley A T, Mathies R. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal Chem*, 1995, **67** (20): 3676 ~ 3680
- 15 Yao S, Anex D S, Caldwell W B, *et al.* SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (10): 5372~ 5377
- 16 Wilding P, Shoffner M, Kricka L. PCR in a silicon microstructure. *Clinical Chemistry*, 1994, **40** (9): 1815~ 1818
- 17 Shoffner M A, Cheng J, Hvieh G E, *et al.* Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24** (2): 375~ 379
- 18 Taylor T B, Winrdeen E S, Picozza E, *et al.* Optimization of the performance of the polymerase chain reaction in silicon-based microstructures. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (15): 3164~ 3168
- 19 Kopp M U, Andrew J D, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, **280** (5366): 1046~ 1048
- 20 Cheng J, Waters L C, Fortina P, *et al.* Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction and capillary electrophoretic analysis of human DNA on microchip-based devices. *Anal Biochem*, 1998, **257** (2): 101~ 106
- 21 Wilding P, Kricka L J, Cheng J, *et al.* Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers. *Anal Biochem*, 1998, **257** (2): 95~ 100
- 22 Burns M A, Johnson B N, Brahmasandra S N, *et al.* An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, 1998, **282** (5388): 484~ 487
- 23 Jacobson S C, Hergenroder R, Koutny L B. Open channel electrochromatography on a microchip. *Anal Chem*, 1994, **66** (14): 2369~ 2373
- 24 Regnier F E, He B, Lin S, *et al.* Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science. *TIB Tech*, 1999, **17** (3): 101~ 106
- 25 Ferguson J A, Boles T C, Adams C P, *et al.* A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nature Biotechnology*, 1996, **14** (12): 1681~ 1684
- 26 Lin V S, Motesharei K, Dancil K S, *et al.* A porous silicon-based optical interferometric biosensor. *Science*, 1997, **278** (5339): 840~ 843

Advancement of Several New Types of Biochip. XU Bing-Sen, SHAO Jian-Zhong (College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China).

Abstract With the development of biochip techniques, several new types of biochip, such as bioelectronic chip, gel element microarray chip, drug controlled-release chip, capillary electrophoretic or electrochromatographic chip, PCR chip and biosensor chip, had sprung up. These biochips, which were different from typical molecular microarrays such as DNA chip, were based on the microarray of various structures, and have successfully applied to analyze DNA mutations, polymorphisms and sequences, to separate mixtures and monitor biomolecular interactions. Because analyses on these chips have many advantages such as quick detection, high efficiency, little sample consumed and low cost, they will become novel tools in the field of life science and medicine.

Key words new type biochips, microstructure array, advancement

fMRI 在视觉研究中的应用和进展*

倪 睿 吴新年 齐翔林 汪云九

中国科学院生物物理研究所, 视觉信息加工开放研究实验室, 北京 100101
中国科学院“脑-智”科学研究中心, 北京 100101

摘要 视觉研究对于揭示大脑的奥秘有着极其重要的意义。功能性磁共振成像 (functional magnetic resonance imaging, fMRI) 用于研究人脑的功能结构, 主要是基于静脉毛细血管内血氧浓度的变化。fMRI 可以无损伤地在几毫米级的空间分辨率和少于 1 s 的时间分辨率上观察清醒状态下人脑的活动, 因此自 90 年代以来 fMRI 已经成为研究人脑的重要方法。fMRI 在视觉研究中的应用已经使人们对视觉系统的功能性组织有了更好的理解, 并取得了很多成果。今后的研究方向是进一步探讨人脑的意识、注意、记忆等高级功能的神经机制。

关键词 功能性磁共振成像, 视觉通路, 视皮层, 记忆, 运动, 主观轮廓

学科分类号 Q6-33, R339.14

* 国家自然科学基金资助项目 (39710106, 39670186 和 69835002)。

Tel: (010) 64888536, E-mail: qixl@sun5.ibp.ac.cn 收稿日期: 1999-05-07, 修回日期: 1999-10-22