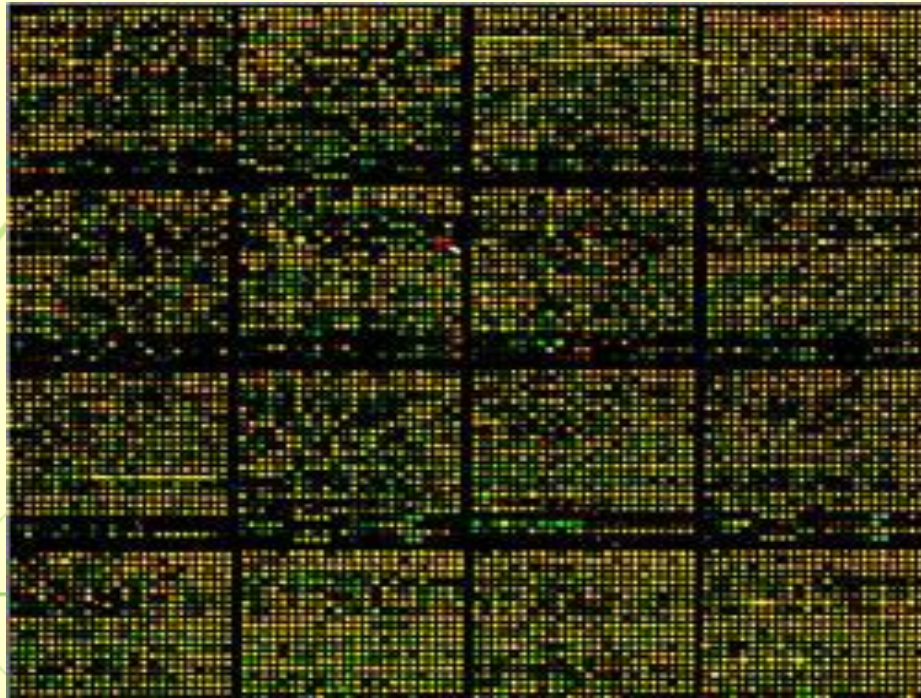
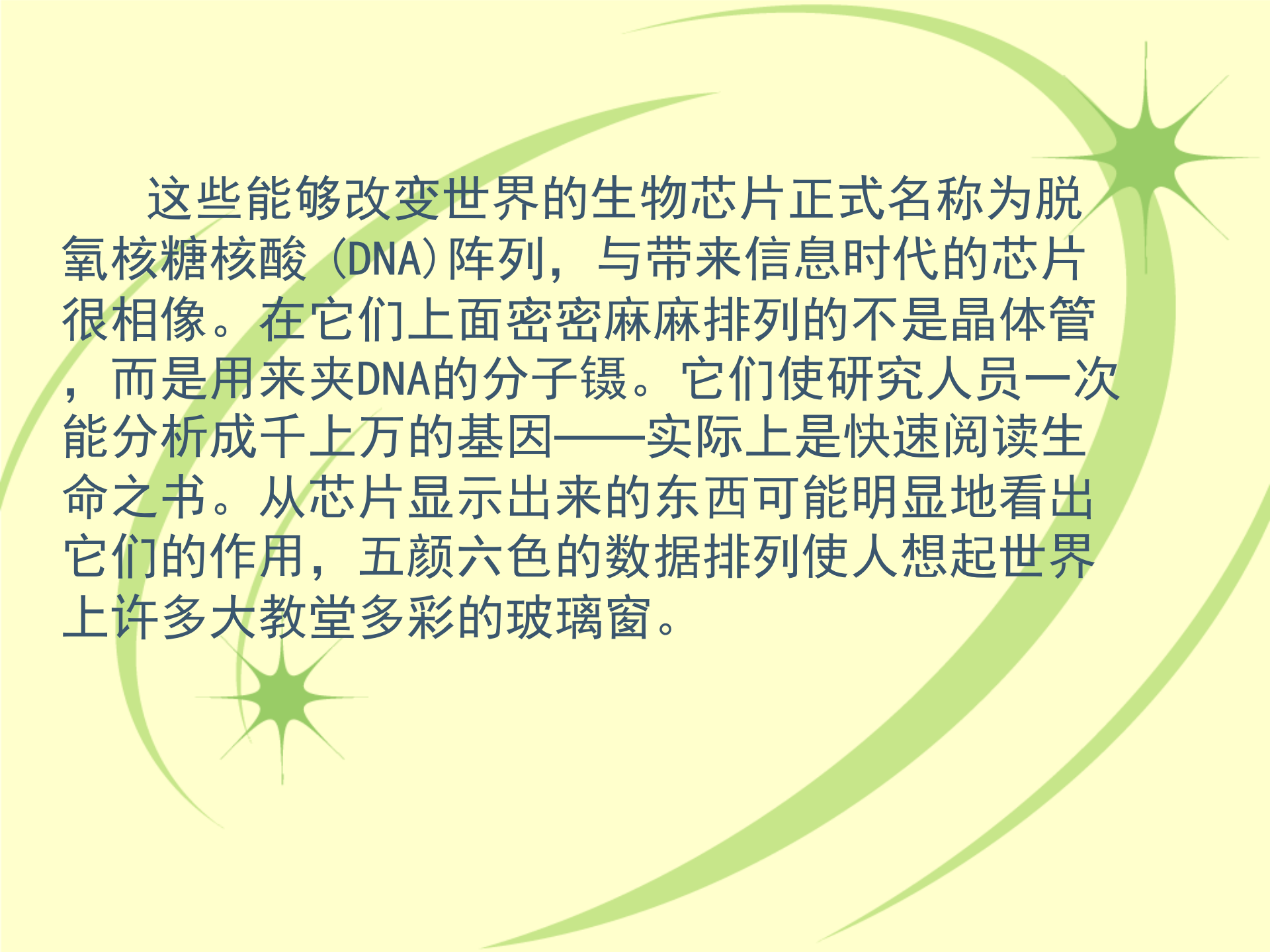


基因芯片

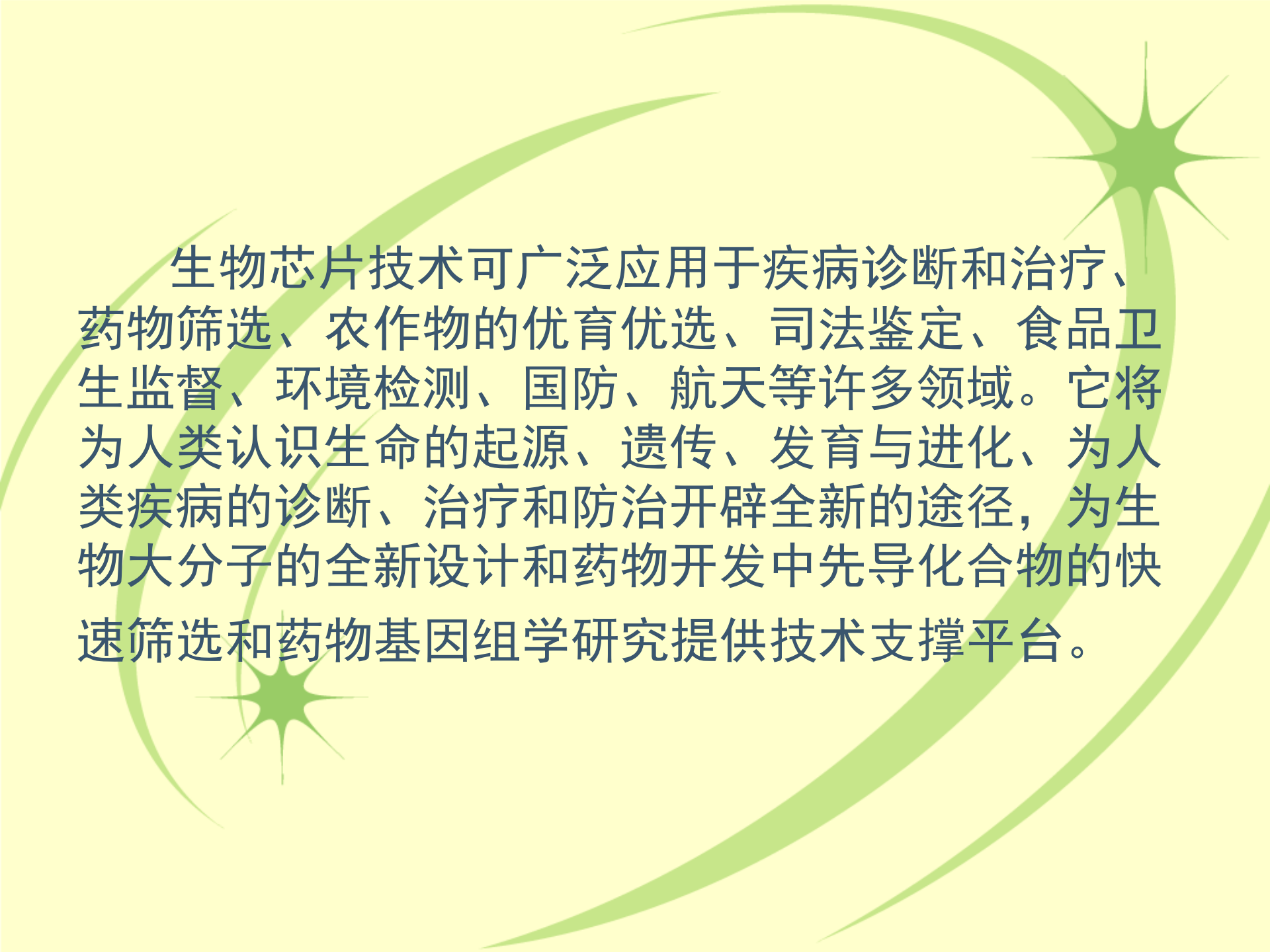
21世纪生物技术的革命

什么是基因芯片？

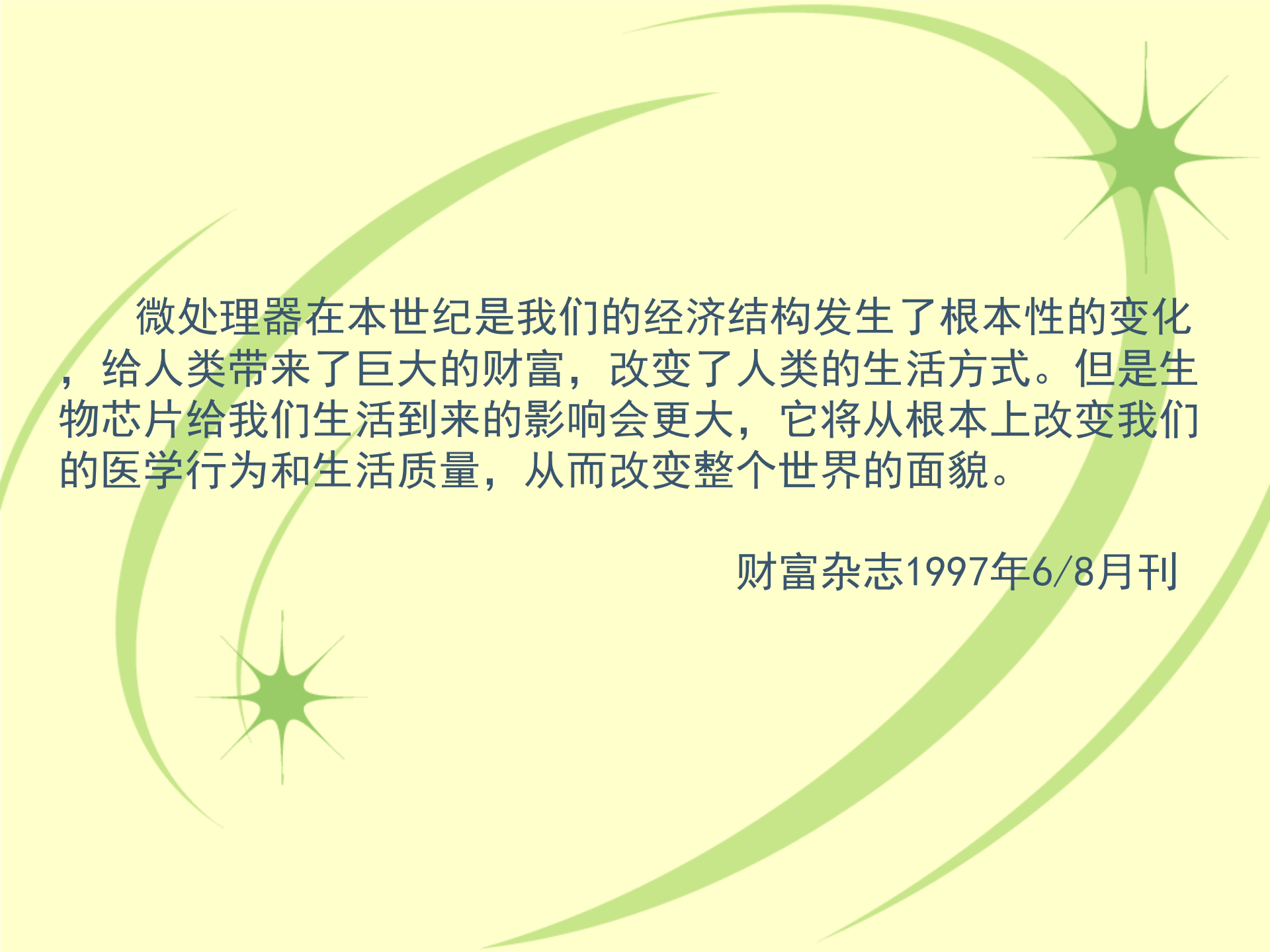




这些能够改变世界的生物芯片正式名称为脱氧核糖核酸 (DNA) 阵列，与带来信息时代的芯片很相像。在它们上面密密麻麻排列的不是晶体管，而是用来夹DNA的分子镊。它们使研究人员一次能分析成千上万的基因——实际上是快速阅读生命之书。从芯片显示出来的东西可能明显地看出它们的作用，五颜六色的数据排列使人想起世界上许多大教堂多彩的玻璃窗。



生物芯片技术可广泛应用于疾病诊断和治疗、药物筛选、农作物的优育优选、司法鉴定、食品卫生监督、环境检测、国防、航天等许多领域。它将为人类认识生命的起源、遗传、发育与进化、为人类疾病的诊断、治疗和防治开辟全新的途径，为生物大分子的全新设计和药物开发中先导化合物的快速筛选和药物基因组学研究提供技术支撑平台。



微处理器在本世纪是我们的经济结构发生了根本性的变化，给人类带来了巨大的财富，改变了人类的生活方式。但是生物芯片给我们生活到来的影响会更大，它将从根本上改变我们的医学行为和生活质量，从而改变整个世界的面貌。

财富杂志1997年6/8月刊

生物芯片技术的发展最初得益于 Southern提出的核酸杂交理论，即标记的核酸分子能够与被固化的与之互补配对的核酸分子杂交。从这一角度而言，Southern blot可以被看作是生物芯片的雏形。

Fred Sanger和Walter Gilbert发明了现在广泛使用的DNA测序方法，并由此在1980年获得了诺贝尔奖。另一个诺贝尔奖获得者Mullis在1983年首先发明了PCR法，以及后来再此基础上的一系列研究使得微量的DNA可以放大，并能用实验方法进行检测。

八十年代初期Bains W. 等人创造性的将短的DNA片断（30bp以下）固定到支持物上，借助杂交方式进行序列测定。

而后为了提高效率，借鉴集成电路制造的技术发明了一种生物芯片，自然成为大规模杂交测序技术的发展方向。

Affymetrix公司在1991年原位合成世界上第一张寡核苷酸基因芯片
1995年斯坦福大学P. O. Brown实验室制造出世界上第一块以玻璃为基底的cDNA芯片
标志着基因芯片技术进入了成熟应用的时期

基因芯片具有无可比拟优点和划时代意义

基因芯片是一种先进的、大规模、高通量检测技术，应用于疾病的诊断具有高度的灵敏性和准确性，操作快速简便，可同时检测多种疾病

原来应用的southern杂交或核苷酸限制性酶切位点多态性分析技术(RFLP)，一次只能进行一个基因片段的检测，如果需要大规模的分析则费时费力。而基因芯片则可同时将待测片段的分子探针固定在一个基底上，达到并行性的高效率检测

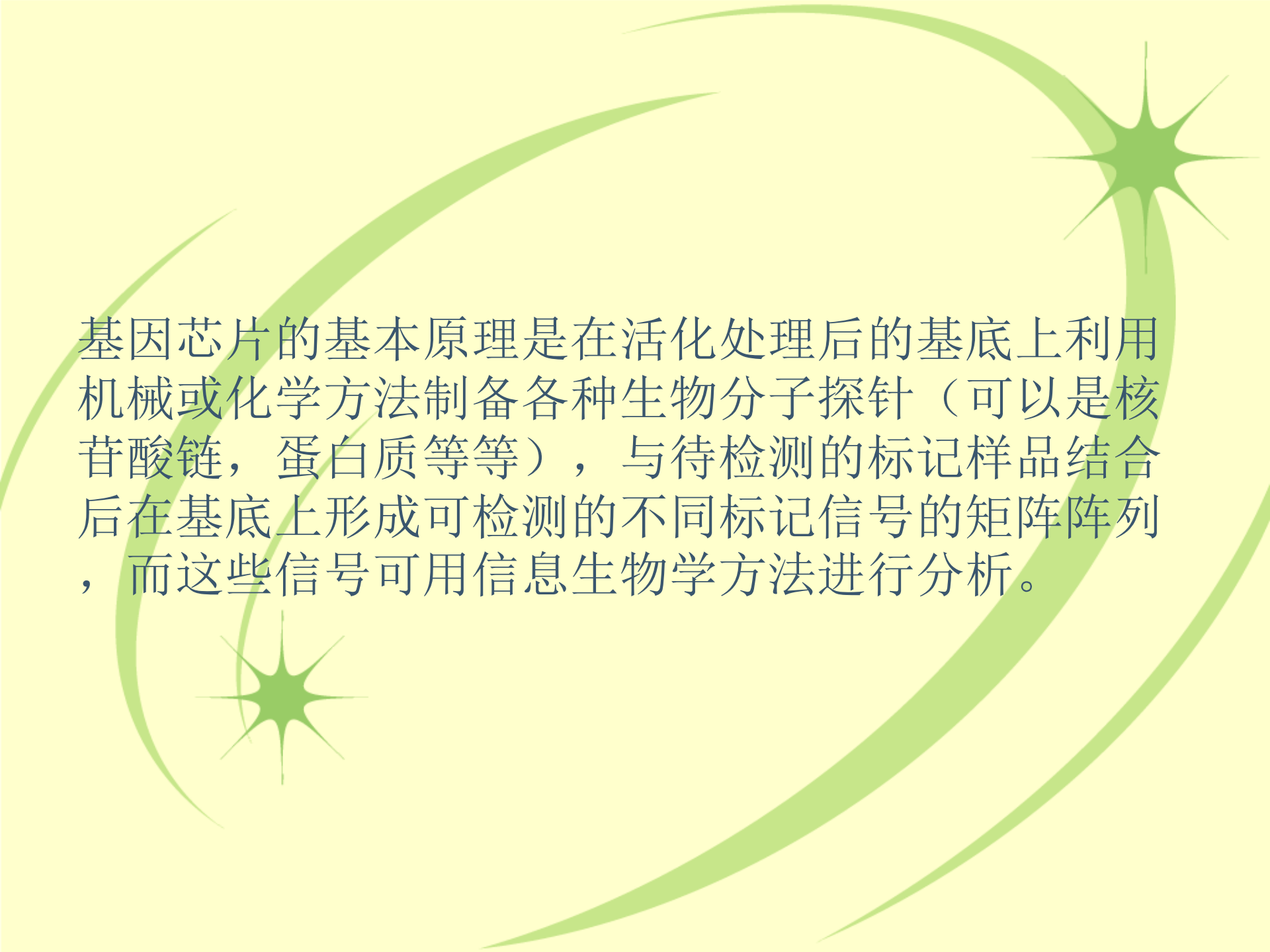
基因芯片具有高通量的特点，以affymetrix公司生产的微阵列芯片为例每一个我们所看到的彩色小方格里面可以有20个左右的核苷酸的片段，而这样的方格在1平方厘米上可以有上百万个。

基因芯片的原理简要介绍

抽象的来讲，基因芯片就是一个信息转换的工具，将核酸中碱基对的排列顺序这种信号转换成光电信号的转换器，正如有无电流通过可用1，0表示然后转换为计算机语言一样，基因芯片将生命自身的编译密码转换成光电信号是我们能方便的检测基因中所蕴含的大量信息。

而所有的基因芯片都是由生物探针和生物传感器构成的，生物探针用于与原始的DNA材料接触结合，相当于将接受第一手的原始信息并且变成易于处理的形式，而传感器部分则是将这种形式的信息转换为计算机可识别的信号

DNA片段首先通过PCR扩增，将荧光物质标记核酸序列上，然后与探针序列进行杂交。完全匹配的DNA序列能够更有效地与其相应的探针结合，相比较不匹配的探针，它所产生的荧光信号也会更强，荧光的强度可以反映待测基因和探针之间的匹配程度。杂交产生的荧光量通过高分辨率荧光扫描并通过计算机软件进行分析。DNA的改变，如碱基突变、插入和删除等便能够确定下来。



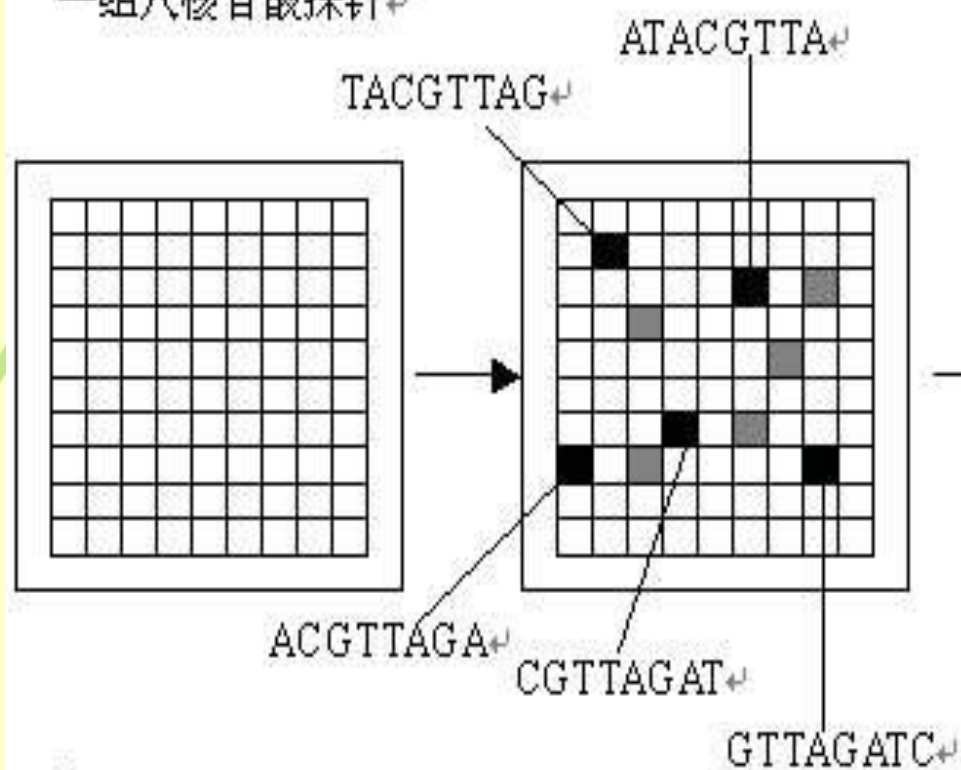
基因芯片的基本原理是在活化处理后的基底上利用机械或化学方法制备各种生物分子探针（可以是核苷酸链，蛋白质等等），与待检测的标记样品结合后在基底上形成可检测的不同标记信号的矩阵阵列，而这些信号可用信息生物学方法进行分析。

基因芯片试剂应用举例

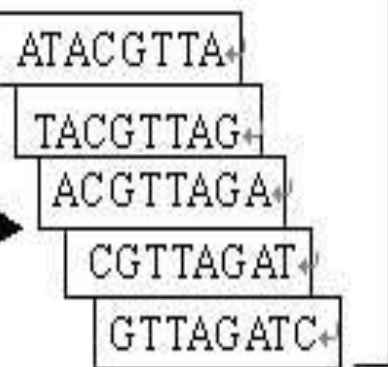
1. 基因芯片进行杂交测序

通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法，可以用下图来说明。在一块基片表面固定了序列已知的八核苷酸的探针。当溶液中带有荧光标记的核酸序列TATGCAATCTAG，与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时，通过确定荧光强度最强的探针位置，获得一组序列完全互补的探针序列。据此可重组出靶核酸的序列。

一组八核苷酸探针



由杂交位置确定的一组核酸探针序列



杂交探针组

ATACGTTAGATC+

重组的互补序列

TATGCAATCTAG+

靶序列

⑤ P₁ - TATGCAATCTAG+

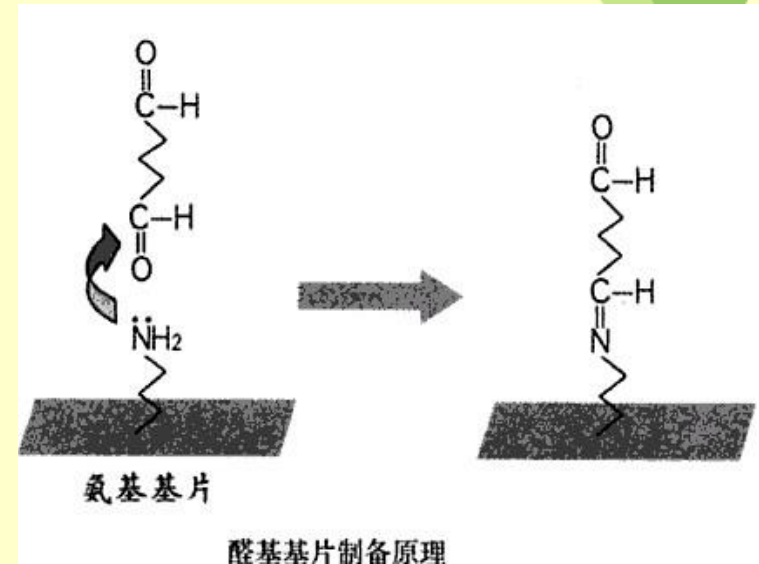
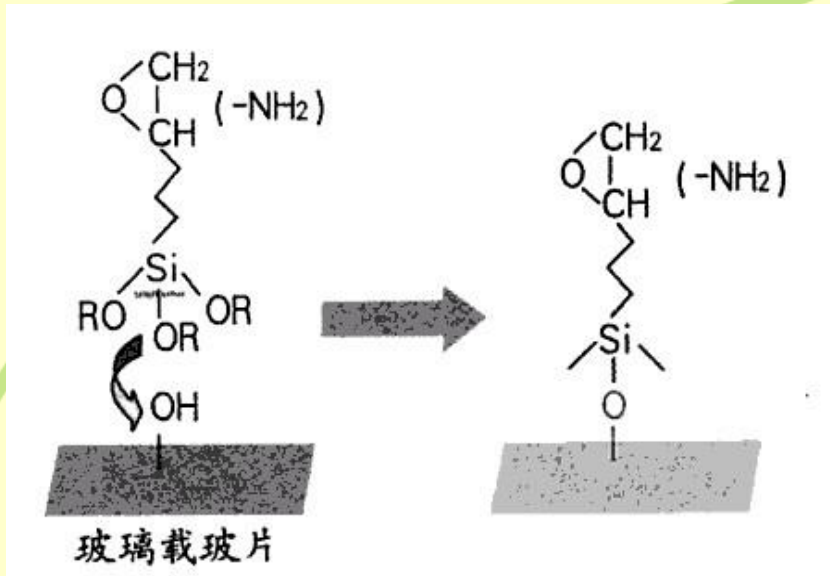
2. 利用基因芯片进行针对性的基因检测

在帕洛阿尔托的研究基因组学的Incyte制药公司的总裁兰迪•斯科特说：“比如说你发现2000个基因与前列腺癌有关系。你可以设计一种芯片，花不多的钱对2000个前列腺癌患者的那些基因进行扫描，以发现关系最大的15个基因。”最近Incyte公司与Affymetrix公司决定联合生产针对各种疾病的芯片供研究药品之用。

用2000个可能的基因互补的核苷酸链作为探针，前列腺病人的基因样本作为待测的材料，则可以筛选出那些结合信号强的基因探针，对应的就是关系最大的基因。

生物芯片的制备流程

1基片处理，制备基片的材料有玻璃，硅，金，聚合物材料等等。目前采用最多的是玻璃。要求基片本身必须平整洁净，均一而且自发荧光低。用化学制剂对玻璃表面进行表面修饰或表面涂敷，可以制备表面含活性基团的基片，吸附能力和匹配能力会更强。活性剂通常是硅烷化试剂，戊二醛，多聚赖氨酸等与探针结合性良好的分子。

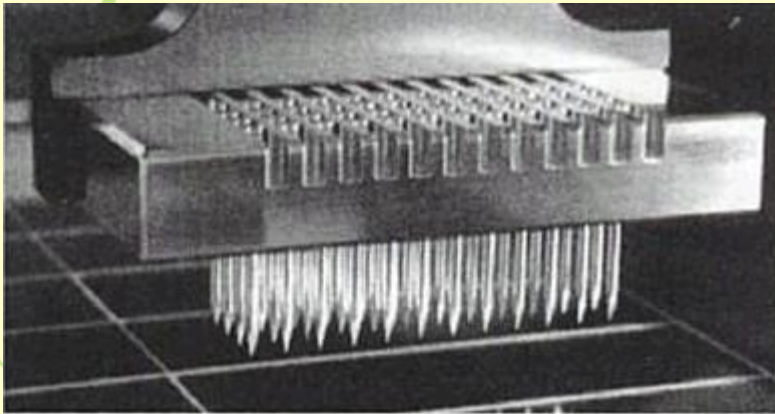


玻璃在酸碱，有机溶液清洗作用下会带上大量氢氧根基团可与活性剂发生亲核作用产生很强的牵引力，将活性剂固定在基底上

2点样

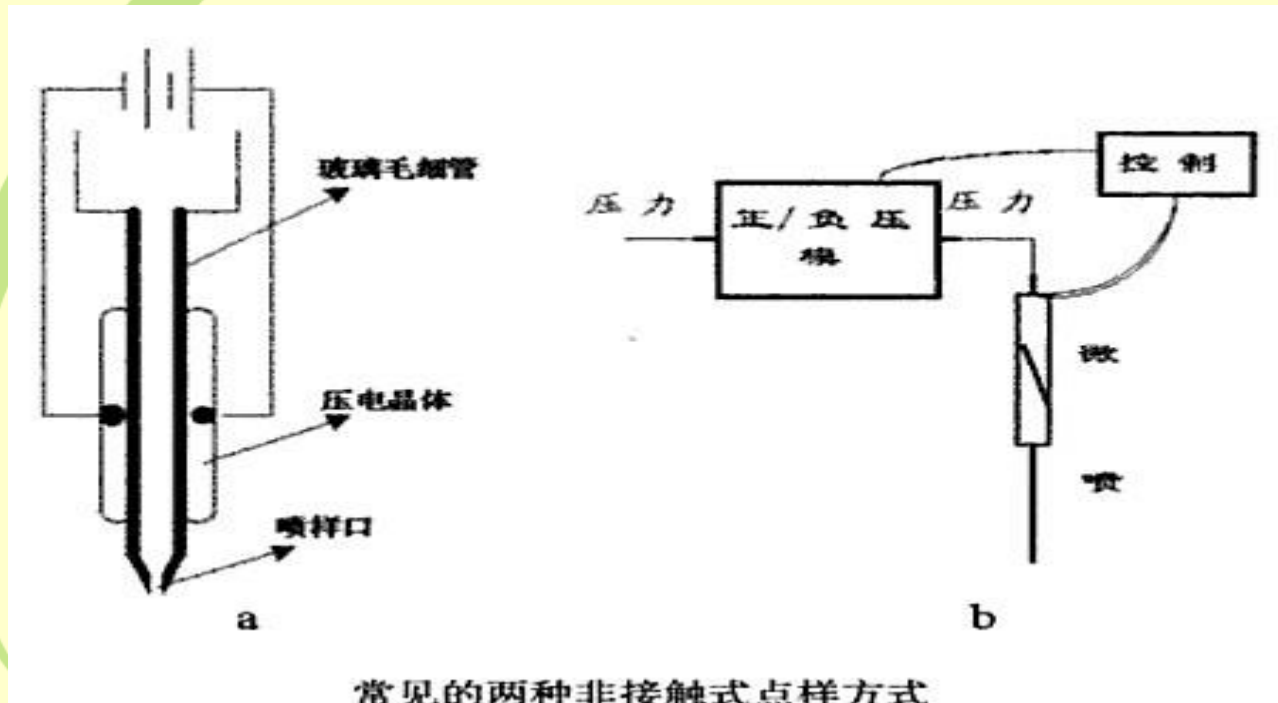
点样的过程就是将生物探针分子结合到处理好的基片上的过程。现代的点样方法主要分三类：接触式点样，非接触式点样和半导体点样技术。

接触式点样：



材料为黄铜的夹具和 48 根钢针

2. 非接触点样技术类似于打印机喷墨技术，点样头始终不与基片接触。非接触式点样机有许多不同的工作原理的分类，有采用压电晶体的，基于微线圈阀的喷涂技术，热气泡喷涂技术等等，非接触式点样的速度是最快的。



3固定和封闭

处理好的基片可以结合各种生物分子，如**DNA**，蛋白质，多肽，甚至细胞等我们将这个过程称为固定。不同种类的基片在固定不同种类的分子时采用的方法也不同。有湿盒培养，烘烤，紫外交联等等。通常结合都是靠物理作用如静电，或共价作用等等

封闭则是洗脱掉没有特异性结合到基底上的分子，防止检测时产生噪音，提高灵敏度。常用的封闭剂有硼氢化钠，三乙酰胺，**BSA**等。

原位合成方法：

原位合成法是在基片上直接完成生物探针分子的合成和固定的技术。这种方法是由Affymetrix公司始创的。这种方法的思路很类似于手工套色的上色方法其余的公司很多采用的是类似于喷墨打印机的喷墨技术，只不过油墨换成了不同种类的生物探针分子。根据事先编好的程序来喷涂到基底上。

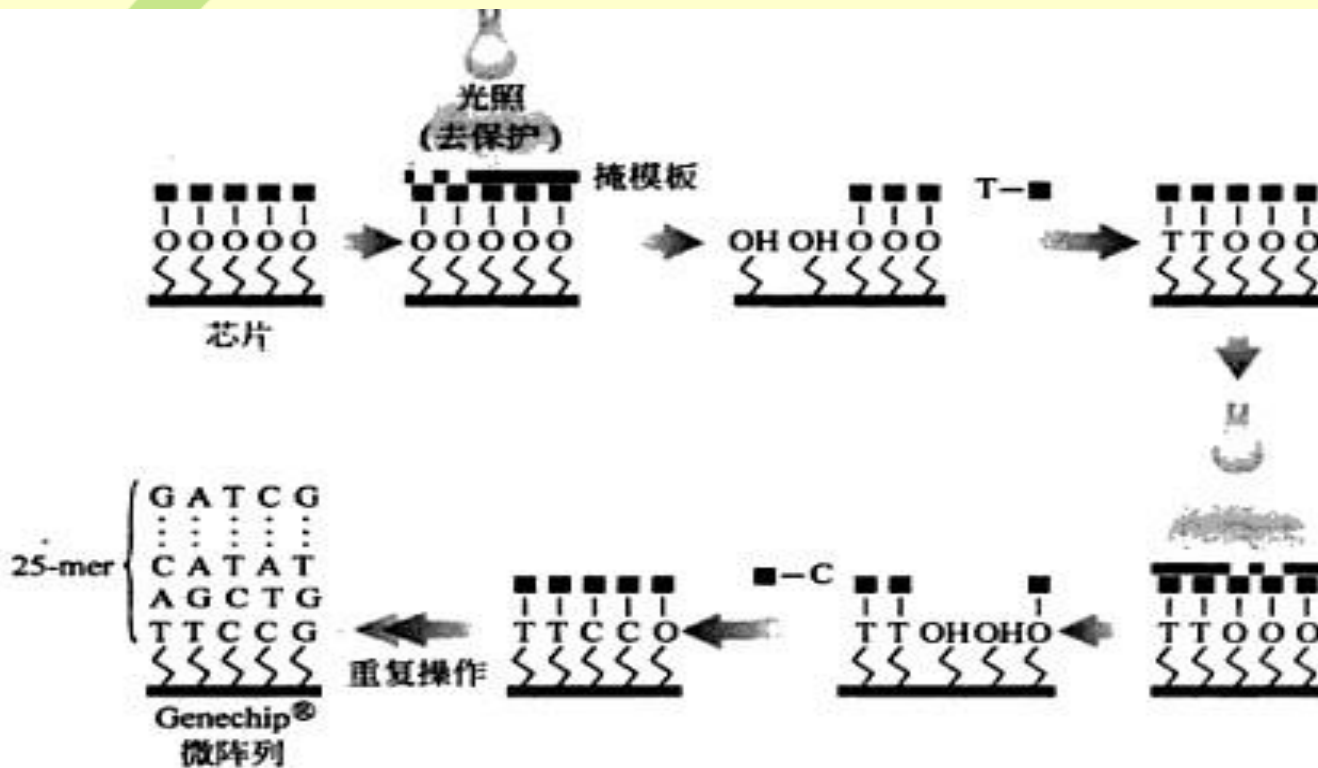
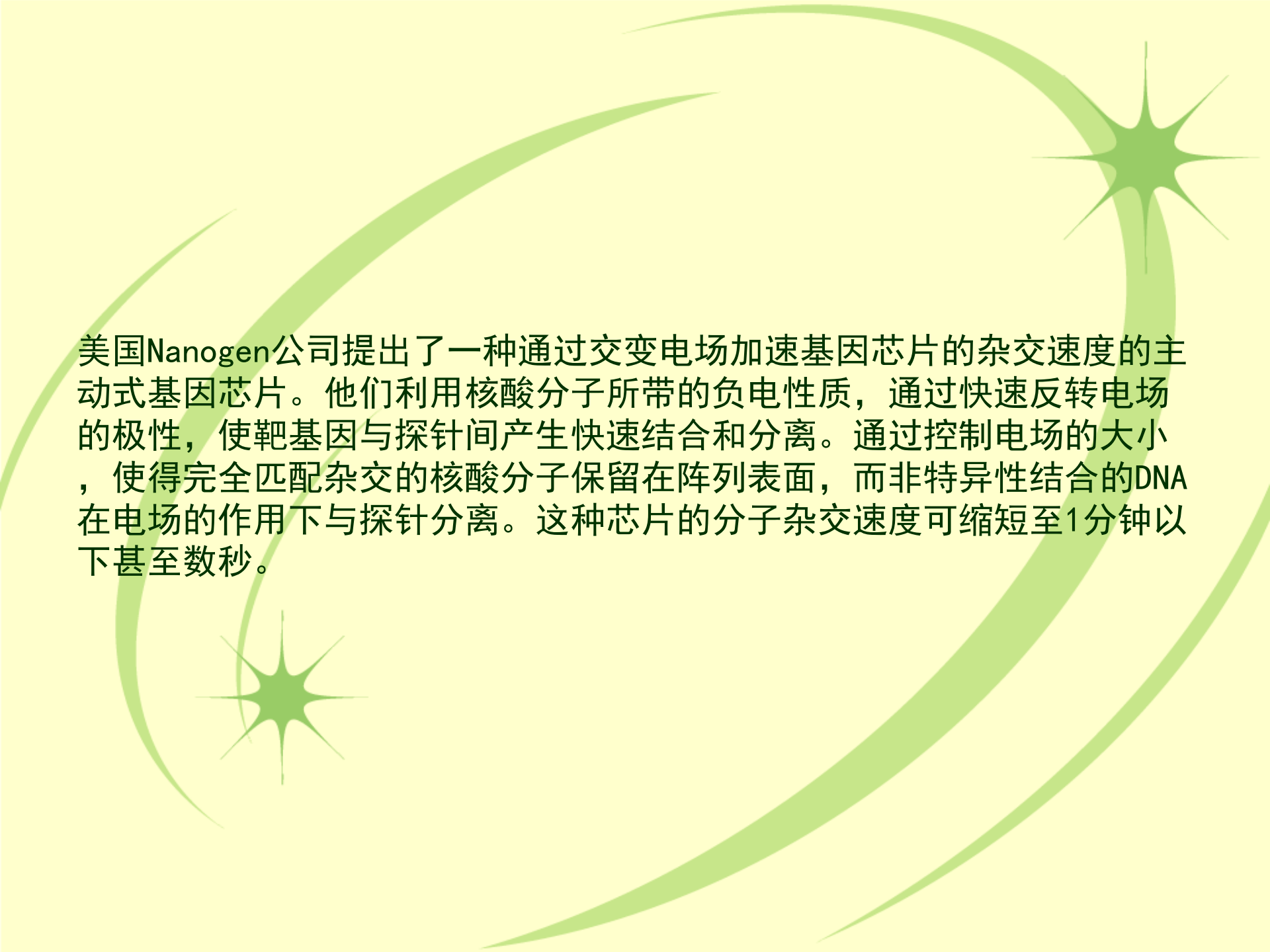
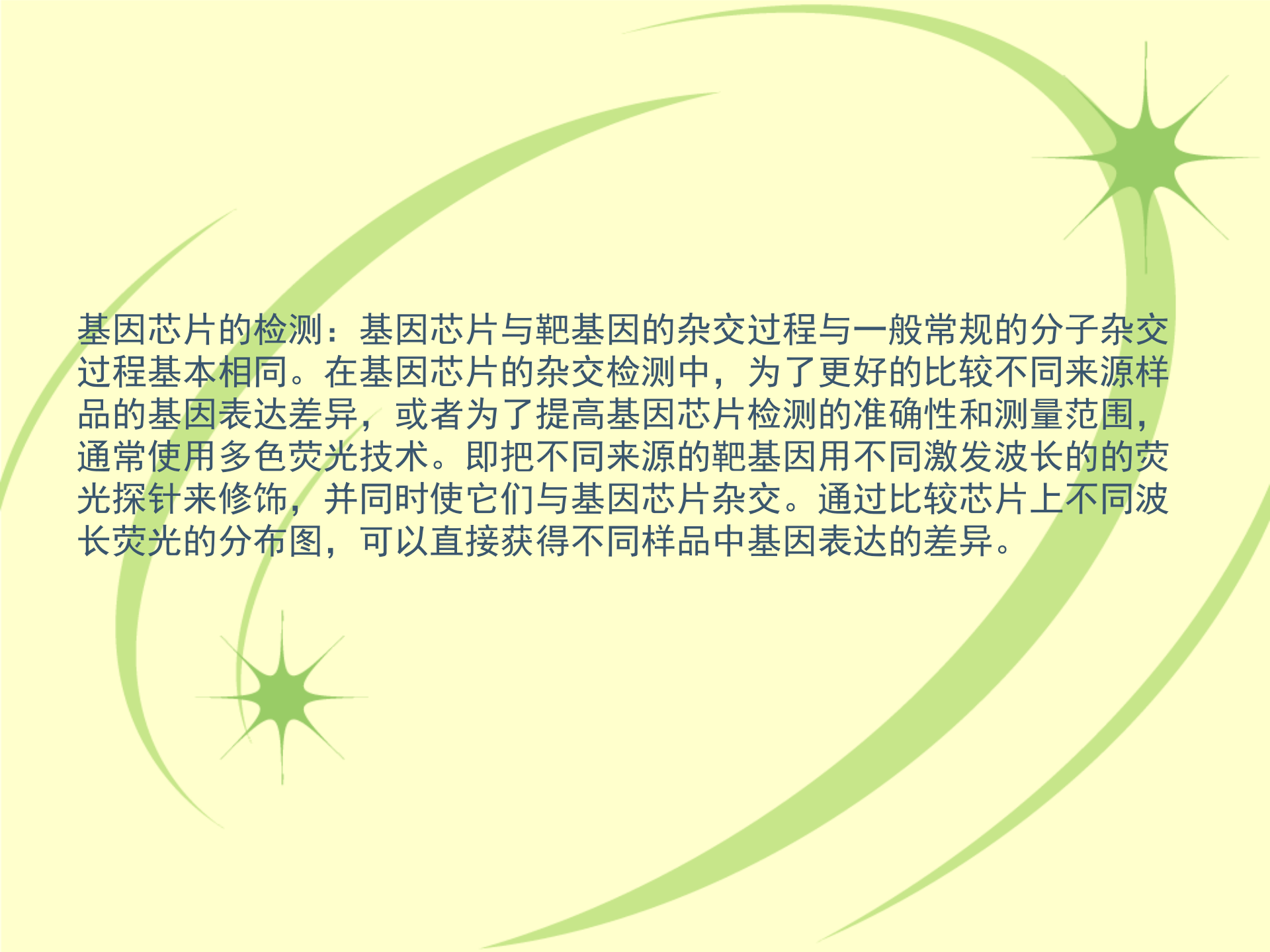


图 1-2-1 Affymetrix 公司的 Genechip® 制造原理示意图



美国Nanogen公司提出了一种通过交变电场加速基因芯片的杂交速度的主动式基因芯片。他们利用核酸分子所带的负电性质，通过快速反转电场的极性，使靶基因与探针间产生快速结合和分离。通过控制电场的大小，使得完全匹配杂交的核酸分子保留在阵列表面，而非特异性结合的DNA在电场的作用下与探针分离。这种芯片的分子杂交速度可缩短至1分钟以下甚至数秒。



基因芯片的检测：基因芯片与靶基因的杂交过程与一般常规的分子杂交过程基本相同。在基因芯片的杂交检测中，为了更好的比较不同来源样品的基因表达差异，或者为了提高基因芯片检测的准确性和测量范围，通常使用多色荧光技术。即把不同来源的靶基因用不同激发波长的的荧光探针来修饰，并同时使它们与基因芯片杂交。通过比较芯片上不同波长荧光的分布图，可以直接获得不同样品中基因表达的差异。

人们还发展了其它灵敏度高、特异性好的基因芯片杂交检测方法。例如短序列偶联法。该方法首先将非标记的DNA靶序列与基因芯片上探针阵列进行完全杂交，若基因芯片上探针的固定端是5'端时，继续以靶基因为模板，可以在暴露于溶液中的3'-OH上用DNA聚合酶合成上新的带有荧光标记的碱基（ddNTPs）。通过检测ddNTP可以分辨出靶序列的基因。

。

基因芯片的应用和发展前景

1、药物筛选和新药开发

由于所有药物（或兽药）都是直接或间接地通过修饰、改变人类（或相关动物）基因的表达及表达产物的功能而生效，而芯片技术具有高通量、大规模、平行性地分析基因表达或蛋白质状况（蛋白质芯片）的能力，在药物筛选方面具有巨大的优势。用芯片作大规模的筛选研究可以省略大量的动物试验甚至临床，缩短药物筛选所用时间，提高效率，降低风险。

随着人类基因图谱的绘就，基因工程药物将进入一个大发展时期。在基因工程药物的研制和生产中，生物芯片也有着较大的市场。以基因工程胰岛素为例，当我们把人的胰岛素基因转移到大肠杆菌细胞后，我们就需要用某种方法对工程菌的基因型进行分析，以便确证胰岛素基因是否转移成功。过去人们采取的方法叫做“限制性片段长度多态性”（简称RELP），这种方法非常地烦琐复杂，在成本和效率方面都不如基因芯片，今后被芯片技术取代是必然的趋势。通过使用基因芯片筛选药物具有的巨大优势决定它将成为本世纪药物研究的趋势。

2、疾病诊断

基因芯片作为一种先进的、大规模、高通量检测技术，应用于疾病的诊断，其优点有以下几个方面：一是高度的灵敏性和准确性；二是快速简便；三是可同时检测多种疾病。如应用于产前遗传性疾病检查，抽取少许羊水就可以检测出胎儿是否患有遗传性疾病，同时鉴别的疾病可以达到数十种甚至数百种，这是其他方法所无法替代的，非常有助于“优生优育”这一国策的实施。又如对病原微生物感染诊断，目前的实验室诊断技术所需的时间比较长，检查也不全面，医生往往只能根据临床经验做出诊断，降低了诊断的准确率，如果在检查中应用基因芯片技术，医生在短时间内就能知道病人是哪种病原微生物感染；而且能测定病原体是否产生耐药性、对哪种抗生素产生耐药性、对哪种抗生素敏感等等，这样医生就能有的放矢地制定科学的治疗方案；再如对具有高血压、糖尿病等疾病家族史的高危人群普查、接触毒化学物质人群恶性肿瘤普查等等，如采用了基因芯片技术，立即就能得到可靠的结果，其他对心血管疾病、神经系统疾病、内分泌系统疾病、免疫性疾病、代谢性疾病等，如采用了基因芯片技术，其早期诊断率将大大提高，而误诊率会大大降低，同时有利于医生综合地了解各个系统的疾病状况。

3、环境保护

在环境保护上，基因芯片也广泛的用途，一方面可以快速检测污染微生物或有机化合物对环境、人体、动植物的污染和危害，同时也能够通过大规模的筛选寻找保护基因，制备防治危害的基因工程药品、或能够治理污染源的基因产品。

6、研究领域

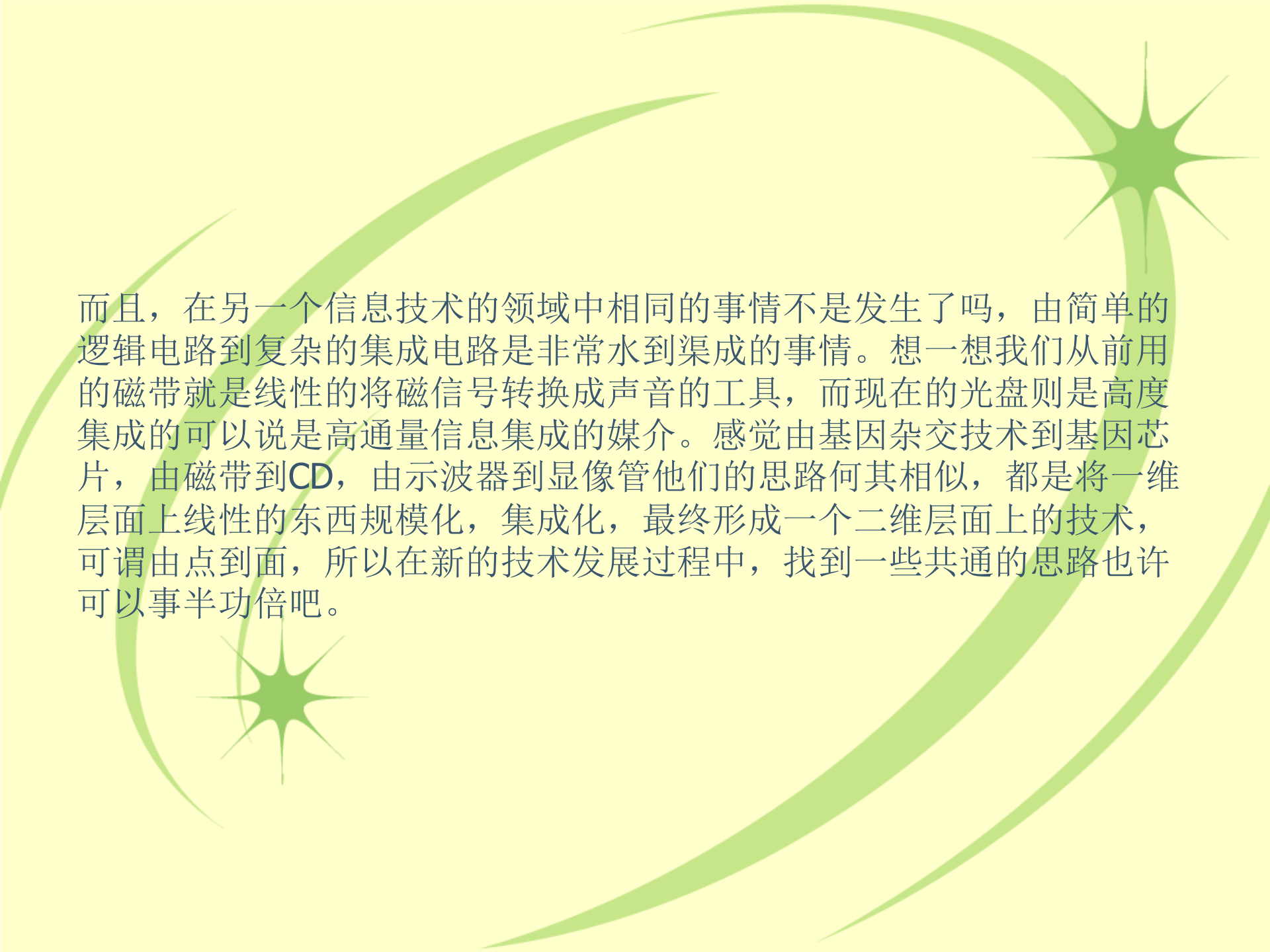
基因表达检测。人类基因组编码大约**10万个**不同的基因，仅掌握基因序列信息资料，要理解其基因功能是远远不够的，因此，具有监测大量**mRNA**（信使RNA，可简单理解为基因表达的中介物）的实验工具很重要。有关对芯片技术检测基因表达及其敏感性、特异性进行的研究实验表明芯片技术易于监测非常大量的**mRNAs**并能敏感地反映基因表达中的微小变化。利用基因芯片技术人们已比较成功地对多种生物包括拟南芥、酵母及人的基因组表达情况进行了研究，并且用该技术（共**157,112**个探针分子）一次性检测了酵母几种不同株间数千个基因表达谱的差异。

DNA测序。人类基因组计划的实施促进了更高效率的、能够自动化操作的测序方法的发展，芯片技术中杂交测序技术及邻堆杂交技术即是一种新的高效快速测序方法。如使用美国**Affymetrix**公司**1998**年生产出的带有**13.5**万个基因探针的芯片就可以使人类**DNA**解码速度提高了**25**倍。

核酸突变的检测及基因组多态性的分析。有关实验结果已经表明**DNA**芯片技术可快速、准确地研究大量患者样品中特定基因所有可能的杂合变异。对人类基因组单核苷酸多态性的鉴定、作图和分型，人线粒体**16.6kb**基因组多态性的研究等。随着遗传病与癌症相关基因发现数量的增加，变异与多态性分析必将越来越重要。

对于生物技术的发展规律的心得：生物技术的发展对生物理论的研究是有帮助的，而且可以将理论成果转化到可应用领域，好的生物技术也会极大地推动理论研究的进步。比如Mullis的PCR技术，以及生物芯片技术就是这样的典范。

而生物技术的进步看起来是由理论研究所推动的，然而我们也不能否认了巧妙地思维方法和独具匠心的设计在其中所起的作用。比如PCR技术就是Mullis在公路上的奇思妙想，这个技术的发现确实是天才的设想，仅仅依靠逻辑思维是没法完成的。而生物芯片技术则不同，我们可以很自然的由现有的技术进行扩展来想到，所欠缺是技术上的难点。Southern杂交发现后，所出现的技术都是一条一条核苷酸链进行杂交的想法。很自然就会考虑到能否打破这种线性的检测模式，将许多不同的基因片段集成到一个芯片上的思路也许很多人都能想到。



而且，在另一个信息技术的领域中相同的事情不是发生了吗，由简单的逻辑电路到复杂的集成电路是非常水到渠成的事情。想一想我们从前用的磁带就是线性的将磁信号转换成声音的工具，而现在的光盘则是高度集成的可以说是高通量信息集成的媒介。感觉由基因杂交技术到基因芯片，由磁带到**CD**，由示波器到显像管他们的思路何其相似，都是将一维层面上线性的东西规模化，集成化，最终形成一个二维层面上的技术，可谓由点到面，所以在新的技术发展过程中，找到一些共通的思路也许可以事半功倍吧。