



评述

军事医学科学院生物芯片研究进展

军事医学科学院

收稿日期: 2011-07-17; 接受日期: 2011-08-28

doi: 10.1360/052011-590

摘要 生物芯片技术是 20 世纪末兴起的以微加工技术、化学和生物技术为依托的一项综合性高新技术, 它是目前高新科技水平的代表之一. 该技术根据分子间特异性相互作用的原理, 将生命科学领域中不连续的分析过程集成于平方厘米大小的固相介质表面或液相介质中构建微分析系统, 以实现蛋白质和核酸等分子的准确、快速、高通量、平行化、自动化及大信息量的检测. 基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片和芯片实验室都属于生物芯片的范畴. 与传统的检测技术相比, 生物芯片具有准确、快速和高通量的优势. 生物芯片根据其用途可分为实验室研究用和临床体外诊断用两大类. 目前, 生物芯片技术已广泛应用于疾病分子诊断、药物筛选、食品卫生安全、传染病预防控制、生物反恐和司法鉴定等领域. 本文主要从疾病体外诊断的角度对生物芯片技术和产品进行综述.

关键词生物芯片
分子诊断
个体化医疗
骨髓移植配型

1991 年, Fodor 提出生物芯片的概念, 最初的生物芯片仅是指基因芯片. 1995 年, 美国斯坦福大学成功研制了第一块以玻璃为载体的基因芯片. 目前许多生物芯片已经商业化, 国际上已有十几家从事生物芯片研究开发的知名公司, 如 Affymetrix, Illumina 和 Agilent Technologies 等, 上述企业主要研发高密度表达谱芯片用于实验室研究. 国内一些科研院所如军事医学科学院、清华大学、东南大学、南方医科大学等较早地开展了生物芯片研究. 在国家发改委和科技部的支持下, 中国先后在北京和上海成立了两个生物芯片国家工程研究中心. 一些企业也与科研院所合作开发体外诊断用生物芯片产品, 如深圳益生堂生物企业有限公司、北京博奥生物有限公司、上海铭源数康生物芯片有限公司、上海裕隆生物科技有限公司、上海百傲科技有限公司等. 基于生物芯片技术的体外诊断产品在美国食品与药品监督管理局(FDA)获准数量较少, 目前为止仅有 3 个产品获批. 2004 年, FDA 批准 Roche Molecular Systems 公

司制造的 AmpliChip Cytochrome P450 Genotyping Test, 这是首个获得 FDA 批准的 DNA 微阵列产品, 它能够为医生提供心脏病、精神病及癌症病人用药种类及剂量参考; 2007 年, FDA 批准了荷兰 Agendia 公司的 MammaPrint 基因表达谱芯片, 这是世界上首个被 FDA 批准上市的基因表达谱分子诊断芯片产品; 2008 年, FDA 审核认可美国 Pathwork Diagnostics of Sunnyvale 公司的产品 PathChip, 该芯片可以辅助医务人员确定恶性肿瘤细胞类型.

虽然中国生物芯片技术的研究起步较国外稍晚, 但经过从事该项研究的科研院所及企业的共同努力, 中国在体外诊断用生物芯片技术和产品研发方面也取得了突出的成绩. 表 1 概括了中国国家食品药品监督管理局批准的体外诊断用生物芯片相关产品.

军事医学科学院在国内较早地开展了生物芯片新技术和新产品的深入研究, 是生物芯片北京国家工程研究中心的 4 家发起单位之一. 1998 年, 军事医学科学院启动“创新基金”进行生物芯片技术和产品

研发; 1999 年, 负责生物芯片技术开发的王升启研究员申请的国家自然科学基金重点项目“基因组研究与基因分离中的 DNA 芯片技术研究”(39889001, 1999-2001)获准立项; 同年, 军事医学科学院与深圳益生堂生物企业有限公司签署了临床诊断用生物芯片产品研发的风险投资合作协议, 并被国家发改委批准为中国生物芯片领域第一个产业化示范工程项目. 经过十几年的发展, 军事医学科学院在生物芯片领域先后承担了科研课题 20 余项, 与深圳益生堂生物企业有限公司和深圳市普瑞康生物技术有限公司等企业先后签署了生物芯片产品合作开发协议. 目前已有 4 个生物芯片产品获得国家新药证书. 成功研制上述产品的实验室是“传染病诊断试剂产业技术创新战略联盟”的参加单位, 研究成果于 2006 年获得生物芯片领域第一个国家科技进步二等奖.

1 军事医学科学院主要研究成果

1.1 提出了一种基于生物芯片的第二代基因序列分析新技术

军事医学科学院提出了一种基于生物芯片技术的固相逐个碱基核酸分析方法. 其特征在于, 将已与测序引物结合的待测序模板固定在一块固相材料上, 依次加入含有酶、酶反应缓冲液及荧光或同位素标记的 dNTPs 的 A/G/C/T 四种反应池中分别进行延伸反应, 每次更换反应池后对延伸后的模板进行洗涤并

分析信号强度, 根据检测信号的变化即可分析出待测模板的序列, 原理见图 1. 与以往技术相比, 具有原理新、灵敏度高、规模大、使用范围广和便于自动化的优点. 该技术与新近推出的第二代基因测序技术核心原理基本一致.

1.2 系统地建立了生物芯片新技术平台

经过十几年的发展, 目前已建立了包括生物芯片制备、目标分子扩增、芯片信号放大、检测和分析等一整套的生物芯片新技术平台. 建立了一种新的“氨一溴”法芯片制备工艺, 显著提高了探针的结合效率及芯片的检测灵敏度; 发明了一种多标本检测芯片卡盒并研制了配套的洗片机, 提高了芯片的检测效率及临床实用价值; 此外, 建立了多基因突变比例的分析方法.

生物芯片的信号采集和分析方法是近年来芯片研究领域的热点. 当前, 大多数芯片的显像和分析方法都是基于有机荧光染料的激发荧光, 方法成熟、简便, 能够达到一般的检测要求. 但有机荧光染料有自身难以克服的缺点: 光淬灭、信号强度低等. 另外, 有机荧光染料并不是在各种环境中都稳定, 会影响检测信号的均一性和实验重现性, 且芯片的制作以及后续检测都有较高的仪器设备要求.

为了进一步提高芯片检测灵敏度和产品的可推广性, 军事医学科学院研究者发展了一种利用新型纳米金标底物信号放大技术替代传统的荧光标记技

表 1 中国国家食品药品监督管理局批准的体外诊断用生物芯片相关产品

企业名称	产品名称	批准文号
军事医学科学院放射与辐射医学研究所/深圳益生堂生物企业有限公司	丙型肝炎病毒分片段抗体检测试剂盒(蛋白芯片)	国药准字 S20050055
	HLA-AB 基因分型试剂盒	国药准字 S20060079
	HLA-DRB1 基因分型(13 个型)试剂盒	国药准字 S20050085
	HLA-DQB1 基因分型试剂盒	国药准字 S20060075
	乙型肝炎病毒核酸及 YMDD 变异检测试剂盒	国药准字 S20050086
博奥生物有限公司	九项遗传性耳聋基因检测试剂盒(微阵列芯片法)	国食药监械(准)字 2009 第 3400725 号
	分枝杆菌菌种鉴定试剂盒(DNA 微阵列芯片法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400384 号
	结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒(DNA 微阵列芯片法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400383 号
上海铭源数康生物芯片有限公司	多肿瘤标志物(12 种)检测试剂盒(蛋白芯片-化学发光法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400213 号
	多肿瘤标志物定量检测试剂盒(蛋白芯片-化学发光法)	国食药监械(准)字 2009 第 3400877 号
南京大渊生物技术工程有限责任公司	结核分枝杆菌 IgG 抗体检测试剂盒(蛋白芯片)	国食药监械(准)字 2011 第 3400173 号
上海百微科技有限公司	CYP2C19 基因检测试剂盒(DNA 微阵列芯片法)	国食药监械(准)字 2009 第 3400723 号
	ALDH2 (Glu504Lys)基因检测试剂盒(DNA 微阵列芯片法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400615 号
上海裕隆生物科技有限公司	多肿瘤标志物(男)定量检测试剂盒(蛋白芯片-化学发光法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400946 号
	多肿瘤标志物(女)定量检测试剂盒(蛋白芯片-化学发光法)	国食药监械(准)字 2010 第 3400945 号

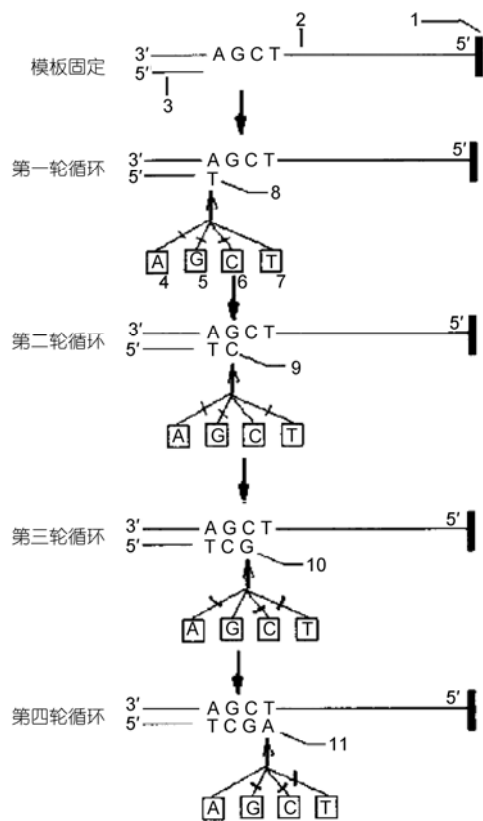


图1 固相逐个碱基核酸分析方法原理示意图

术, 为生物芯片的信号放大研究开辟了一个新的领域. 在传统金标银染(gold label silver stain, GLSS)技术基础上, 完善了一种酪胺信号放大金标银染(TSA-

GLSS)的方法(原理见图 2), 该方法的原理是将待检测物标记生物素分子, 使其与亲和素特异性结合, 亲和素分子上连有的辣根过氧化物酶(HRP)可以催化酪胺分子大量地沉积在 HRP 分子表面, 起到级联放大的作用, 将酪胺分子标记生物素分子, 进而可以对结果进行分析. 与常规的方法相比, 检测的灵敏度可提高 10~100 倍, 且结果肉眼可见.

在上述研究基础上, 军事医学科学院研究者进一步发明了一种新的纳米金复合底物 Nanogold-DAB, HRP 能够直接催化此复合底物反应导致大量纳米金颗粒特异沉积, 从而建立起一种生物芯片的纳米金复合底物高灵敏可视化检测方法, 该方法已经申请了国家专利. 图 3 表示了新型底物 Nanogold-DAB 的反应原理: 纳米金 NHS 基团与 DAB 的氨基缩合反应形成酰胺键而得到 Nanogold-DAB 产物. 基于该底物研制的可视化基因芯片系统与 GLSS 及 TSA-GLSS 法进行了比较, 结果显示 Nanogold-DAB 检测法与 TSA-GLSS 的灵敏度相当, 均比 GLSS 法高一个数量级. 而 Nanogold-DAB 检测比 TSA-GLSS 法操作省略一步, 简化了检测过程, 因此 Nanogold-DAB 检测可以取代 TSA-GLSS 方法, 在生物芯片的高灵敏可视化检测中具有更广阔的应用前景. 以上述新型纳米金底物为基础, 建立了高灵敏度可视化生物芯片技术平台, 并研制了“重要致病菌核酸高通量快速筛查基因芯片”和“重要呼吸道病毒检测基因芯片”等系列产品.

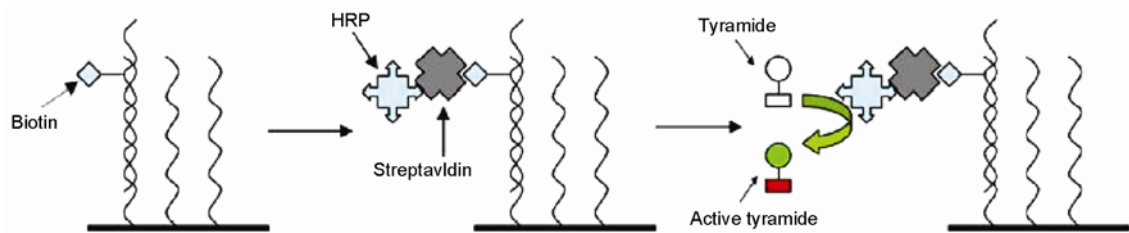


图2 TSA-GLSS 生物芯片检测原理

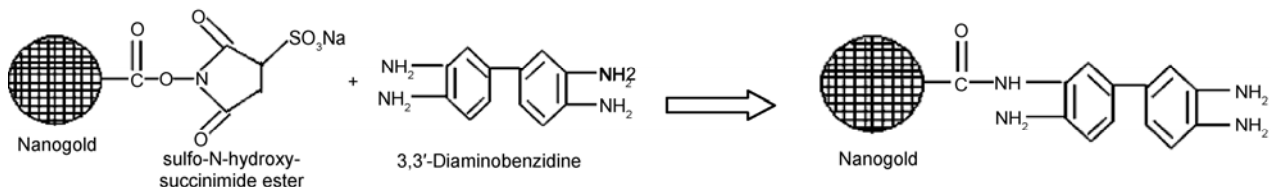


图3 Nanogold-DAB 复合底物反应原理

1.3 研发了系列生物芯片新产品

军事医学科学院研究者研制了系列用于传染病分子诊断、个体化医疗及骨髓移植配型的生物芯片新产品, 与深圳益生堂生物企业有限公司合作研发的 4 个生物芯片产品获得国家新药证书. 通过系列生物芯片产品的研制积累了丰富的产品研发经验, 目前另有“流感病毒核酸甄别检测基因芯片”、“甲型流感病毒耐药检测基因芯片”等多个生物芯片产品处于研发阶段.

1.3.1 传染病分子诊断生物芯片产品

丙型肝炎是一种严重威胁人类健康的血源性传染病, 临床常用的 HCV 检测方法主要是检测 HCV RNA 和 HCV 抗体. 检测 RNA 所要求的实验室条件和操作人员技术水平较高, 且易产生假阳性; 检测 HCV 抗体的 ELISA 方法操作简便快速, 但不足之处是在低危人群中仍发现有无法确定的结果; 而进口的 RIBA 试剂虽可分别对 HCV 核心抗体, NS3, NS4 和 NS5 抗体进行检测, 提高了 HCV 检测的特异性, 但由于其操作繁琐且成本高, 限制了其在临床的推广使用. 军事医学科学院研制的“丙型肝炎分片段抗体检测试剂盒(蛋白芯片)”获批生物制品一类新药证书(国药准字 S20050055). 该产品选取了 HCV 核心抗原/NS3/NS4/NS5 以及嵌合抗原基因片段进行克隆、表达、特异性筛选, 获得各种纯化蛋白特异性抗原. 通过对芯片制备原材料、半成品、成品及反应条件的系统优化, 确定了生产工艺、质检规程及标准. 蛋白芯片经过三家单位临床考核证明, 与 ELISA 方法符合率达 99%, 且准确性高于 ELISA 法, 与 RIBA 试剂符合率为 98%, 可用于 HCV 的感染确证、分型. 这是国际上第一个基于硅基材料的荧光检测生物芯片新药证书.

细菌导致的传染病一直是危害人类健康的主要疾病, 是当前面临的严峻挑战. 病原体检测水平的提高有利于及时、准确、全面地掌握病原谱和疾病流行信息, 提高防控水平; 在临床上, 早期诊断和及时确诊也可以争取宝贵的治疗时间. 不同的致病微生物可能导致不同部位、不同程度的疾病, 因此临床上存在鉴定致病微生物的需求. 根据致病微生物的类型和种属针对性地选择抗感染药物, 可以一定程度上缓解滥用广谱抗生素导致的耐药性等不良后果. 针

对此需求, 研究者开发出“重要致病菌核酸高通量筛查基因芯片”, 可同时筛查 31 属常见致病菌(包括呼吸道细菌 7 属、消化道细菌 8 属、全身疾病细菌 16 属), 芯片检测信号肉眼可见, 整个过程可在 5 h 内完成.

研究者还研制了“流感病毒分型及耐药检测基因芯片”, 使用通用扩增策略, 仅需一次 RT-PCR 反应即可扩增 5 种亚型的流感病毒, 通过一次杂交反应对 5 种流感病毒亚型进行准确分型并检测病毒达菲耐药性突变. 该基因芯片产品成为 2009 年 7 月国家科技部组织的甲型 H1N1 流感病毒核酸类检测试剂比选中唯一获得“国家应对甲型 H1N1 流感防控科技组”推荐的基因芯片类产品.

此外, 正在研制的“重要肠道病毒检测基因芯片”可同时检测 EV71, CA16, 轮状病毒等 9 种常见的肠道致病病毒; “重要呼吸道病毒检测基因芯片”可同时检测流感病毒、呼吸道合胞体、麻疹、风疹、腮腺炎等 10 种常见的呼吸道致病病毒.

1.3.2 个体化医疗相关生物芯片产品

中国是乙型肝炎病毒(HBV)感染大国, HBV 耐药性是困扰 HBV 感染患者化学药物治疗的关键问题之一. 针对 HBV 耐药监测这一临床难题, 军事医学科学院 2005 年研发出“HBV 核酸及 YMDD 变异检测试剂盒”(国药准字 S20050086), 可同时分析 HBV 多聚酶突变位点 528, 552 及 555 突变(图 4), 共检测了 2425 例血液标本, 芯片结果与测序结果的符合率为 98.1%. 这是国际上第一个获得新药证书的微生物耐药检测基因芯片产品.

药物代谢酶的遗传多态性造成了不同个体间药物代谢反应的差异, 是产生药物毒副作用、药物疗效降低或丧失的主要原因之一. 军事医学科学院研究者研制了一种“人细胞色素 P450 基因多态性检测基因芯片”, 对 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 和 CYP3A5 等多个重要的 CYP450 酶进行基因多态性诊断. 检测 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP3A5 五种酶共 8 个 SNP 位点的基因芯片, 可供科研使用. 针对部分心脑血管药物, PPI, 降糖药等药物开发的“CYP2C9 和 CYP2C19 基因多态性检测基因芯片试剂盒”, 可以通过一次实验同时检测两种酶的 3 个 SNP 位点情况, 与随机选取的 36 份

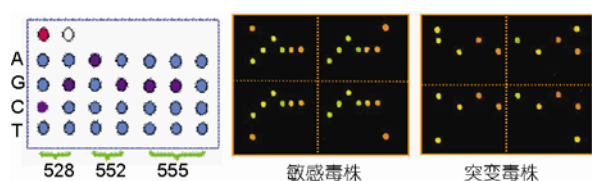


图4 HBV 核酸及 YMDD 变异检测基因芯片

临床血液样本的测序结果相比,符合率 100%. 本研究建立了以基因芯片技术为基础的药物代谢酶基因分型方法,可为指导临床个体化医疗和合理用药提供参考。

目前疫苗技术迅速发展,对控制传染病的传播起到了重要作用。2008 年 2 月 18 日,卫生部公布了《扩大国家免疫规划实施方案》,国家免疫规划病种扩至 15 种,相应疫苗也纳入免疫规划。但目前疫苗的免疫效果、人群的抗体水平等指标均无法进行大规模有效评价,常规的免疫检测方法存在的主要问题是灵敏度不高,平行检测抗体的种类有限等,无法满足新形势的需要。在此背景下,军事医学科学院研究者开发出“常用疫苗抗体水平监测蛋白芯片”,针对国家免疫规划涉及的 14 种病原体疫苗进行抗体水平筛查,包括 7 种病毒:麻疹病毒、风疹病毒、腮腺炎病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、乙脑病毒和脊髓灰质炎病毒;4 种细菌:百日咳杆菌、白喉杆菌、破伤风梭菌和脑膜炎球菌;3 种高危人群预防病种病原体:炭疽杆菌、出血热病毒和钩端螺旋体,选取上述病原体的保护性抗原共 15 种检测相应的保护性抗体;初步制备了国家免疫规划病种抗体筛查蛋白芯片并进行了可视化研究,部分病种的抗体检测结果与 ELISA 的检测结果进行对比,总体符合率达到 90% 以上,该芯片已申请发明专利。通过常用疫苗抗体水平监测蛋白芯片的研制,可对接种人群的抗体水平进行有效筛查,一方面可迅速对免疫水平低下人群个体采取具有针对性的措施,改善免疫效果;另一方面减少盲目复种给接种者带来的疼痛,降低疫苗复种的不良反应风险,并避免疫苗的滥用与浪费,可为国家实施免疫规划提供可靠、高效的评价工具。

1.3.3 骨髓移植配型基因芯片产品

HLA 基因分型在骨髓移植配型、个体识别等领

域具有重要的应用价值。通常使用的 PCR-SSOP 和 PCR-SSP 方法不仅操作繁琐而且成本高。基因芯片技术用于 HLA 分型很好地解决了上述问题。实验室研制了系列 HLA 分型基因芯片,并获得国家新药证书。HLA-DRR1 基因分型(13 个型)试剂盒(国药准字 S20050085),通过 17 条探针可区分 13 个型别。在 3 家验证单位使用该芯片与 PCR-SSP 基因分型试剂盒检测结果的符合率分别为 99%, 97.53% 和 98.25%,总符合率为 98.27%。这是国际上第一个 HLA 配型分析基因芯片产品;HLA-A/B 基因分型试剂盒(国药准字 S20060079),共设计了 117 条寡核苷酸探针,54 条用于 A 座位,63 条用于 B 座位,可进行 A 座位 21 个型别和 B 座位 36 个型别的分型(图 5)。

1.4 生物芯片分析配套仪器

前述的新型纳米金标底物可视化生物芯片系统,显著特点是灵敏度高、结果肉眼可见,可应用于致病微生物的现场检测。肉眼判读有时会受主观因素影响,为了实现可视化信号的客观判读,同时也为了记录芯片的可视化结果,军事医学科学院研究者自行研制了便携式可视化生物芯片扫描仪。该扫描仪在光学分辨率保持在 1200 dpi,全幅扫描速度在 30 s 以下,有效扫描区域范围为 75 mm×25 mm,扫描仪的位数为 24 位,能够区分 256 级灰度,可扫描的动态范围为 $1 \sim 10^5$,检测精度较高,对同一可视化生物芯片不同时间检测,信号强度值变化范围 $\leq 10\%$,对空白可视化生物芯片每个样点检测的信号强度差异 $\leq 5\%$,具有较高的一致性。同时简化了仪器结构、减小了体积和重量(扫描仪重仅 1.7 kg),能同时扫描 4 张可视化生物芯片,并开发了专用的分析软件。该仪器具有扫描速度快、体积小重量轻的优势,价格仅为激光共聚焦扫描仪的 1/10 左右。

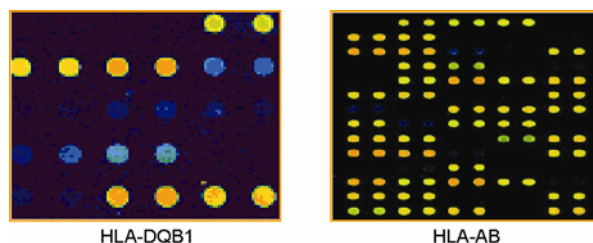


图5 HLA 骨髓移植配型基因芯片

2 结语

生物芯片的发展趋势正向集成化、微型化、微量化、全自动化、定量化和数据库完善化方向发展. 集成性是决定未来生物芯片产品能否发展并成功推广应用的重要因素. 目前的生物芯片产品, 尤其是核酸检测芯片产品存在如下问题: 样品处理、基因扩增和样品检测等步骤是分开的, 操作较复杂, 容易造成交叉污染从而产生假阳性, 用户接受程度低. 因此, 集样品处理、目标分子扩增、信号检测、结果分析和报告于一体的高集成生物芯片技术和产品的研发是临床诊断用生物芯片亟待解决的技术难题. 制约生物芯片广泛应用的另一个关键因素是成本平偏高, 这也是目前仅有的几个商品化产品未能在临床广泛应

用的重要原因之一. 文献报道的生物芯片新技术较多, 但大部分技术还停留在实验室阶段, 真正实现产业化还有很长的路要走. 临床用生物芯片必须将芯片特点和临床需求密切结合才可能占领市场, 个体化医疗生物芯片、耐药分析生物芯片、传染病甄别检测生物芯片等符合上述要求, 具备良好的发展前景. 此外, 疾病预防控制领域用生物芯片产品也是重要的发展方向, 如病原微生物高通量筛查芯片、疫苗免疫效果评价芯片等. 针对上述问题, 军事医学科学院正在与深圳市普瑞康生物技术有限公司等企业合作进行自动化生物芯片工作站、高灵敏度生物芯片成像仪及系列新产品的研究和开发. 不久的将来, 将会有更多灵敏度高、实用性强、成本低、操作简便的生物芯片产品进入临床.

撰稿人: 刘琪琦, 王升启