protein[J]. EMBO J,1994,13(10):2273-2279.
[5] Ostapchuk P,Hearing P,Ganem D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis[J]. EMBO J,1994,13:1048-1057.
[6] Prange R,Streek G. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins[J]. EMBO J,1995,14(2):247-256.
[7] Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation[J]. J Virol,1997,71(12):9350-9357.
[8] Bruss V,Thomssen R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis Bvirion maturation[J]. J Virol,1994,68(3):1643-1650.
[9] Ishikawa T,Kuroki K,Lenhoff R,et al. Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the pre-S protein of duck hepatitis B virus[J]. Virology,1994,202(2):1061-1064.
[10] Hildt E,Saher G,Bruss V,et al . The Hepatitis B Virus Large Surface Protein (LHBs) Is a Transcriptional Activator[J]. Virol,1996,225(1):235-239.
[11] Bang G,Kim KH,Guarnieri M,et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. Virology,2005,332(1):216-224.
[12] Bruns M,Miska S,Chassot S,et al. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles[J]. J Virol,1998,72(2):1462-1468.
[13] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus Res,2004,106(2):199-209.
[14] Chen K,Han BG,Ma XK,et al. Establishment and preliminary use of hepatitis B virus preS1/2 antigen assay[J]. World J Gastroenterol,1999,5(6): 550-552.
[15] Lambert C,Mann S,Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol,2004,85(Pt 5):1221-1225.
[16] 王永忠,吴国祥,秦有来,等. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白血清学检测及临床意义[J]. 中华传染病杂志,2007,25(4):244-245.
[17] 魏红山,黄玉波,宋淑静,等. e 抗原阴性慢性乙型肝炎患者血清表面抗原大蛋白水平与乙型肝炎病毒 DNA 之间的关系[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14(7):543-544.
[18] 黎广益,盛江来,黄海军. 乙型肝炎病毒大蛋白检测在拉米夫定抗病毒治疗中的应用研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2008,22(2):133-135
[19] 王爱霞,张定凤. 2000 年拉米夫定临床应用指导意见[J]. 中华肝脏病杂志,2000. 8(4): 249-250.

(收稿日期:2010-05-04)

・综　　述・

悬浮式点阵与肿瘤研究

戎彪学 综述,杨拴盈[△] 审校
(西安交通大学第二附属医院,陕西 西安 710004)

关键词:核酸类;　蛋白质类;　肿瘤;　悬浮式点阵;　液态芯片
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.042　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2011)02-0227-03

生物芯片技术(biochip,BC)融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体,具有重大的基础研究价值,又具有明显的产业化前景。悬浮式点阵(suspension array,SA)是生物芯片技术领域又创新,由于检测过程中分子杂交在悬浮液体中,故又被称之为液态芯片(liquid chip,LC)。

1　LC 的一般特点

1.1　传统 BC 与 LC 的区别　传统 BC 是指包被在硅片、尼龙膜等固相支持物上的高密度的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类以及其他生物组分的微点阵,通过检测芯片与标记样品的杂交信号即可实现对生物样品的分析。常见生物芯片主要有基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等。LC 将激光技术、应用流体学、高速数字信号处理器和计算机法则整合在一起,在特制的微球上包被抗体、抗原或核酸探针等,可同时检测液相中多种成分,如细胞因子、自身抗体、特定核酸序列等[1-2]。

1.2　LC 的原理　采用荧光编码技术,对液相体系中的微球(直径 5.6 μm 聚苯乙烯小球)用不同比例的红色分类荧光标记地址,通过 2 种荧光染料对微球染色,调节荧光染料的比例可获得 100 种不同颜色的微球,每种荧光的浓度又分为 10 个等级。将每种颜色的微球交联上针对特定检测物的生物探针(探针通过羧基结合到微球表面),将编码微球混合后加入微量待检样本,悬液中靶分子与微球表面的探针进行特异性结合。以激光流式细胞仪作为分析平台,当微球通过激光流式仪时,两束不同波长的激光(635 nm 和 532 nm)对微球颜色进行鉴定,同时通过靶分子上的报告分子完成定量分析。其检测原理是让单个微球通过检测区域,再使用不同波长的激光同时对微球探针上的红色分类荧光和报告分子上的绿色标记荧光进行检测,一束激光激发微球探针上的红色分类荧光,根据不同的分类荧光信号和荧光浓度等级将微球探针进行分类(寻址),从而寻找到各个不同的反应分子类型,另一束激光激发绿色标记荧光,以微球探针上结合的报告分子标记荧光数量反映微球探针上结合的待测分子的数量[3]。LC 具有高通量、高敏感性等特点,与平板式芯片(planar microarrays)相比使用更方便、成本更低、统计学处理更快,在杂交动力学增速以及阵列准备等方面具有更高的灵活性和可塑性[4]。以 LC 技术检测 5 637 例血液标本中的 β-地中海贫血常见类型,发现 132 例携带 β-地中海贫血突变基因,携带率为 2.34%,检测结果准确、快速,且成本较低[5]。

2　LC 在肿瘤研究中的应用

目前主要通过血液中肿瘤标志物的检测对被检测者作出诊断或疗效及预后判断。普遍使用的放射免疫分析、酶免疫分

△　通讯作者,E-mail:yangshuanying66@163.com。

析、化学发光免疫分析等方法，这些方法都是单指标检测，存在特异性弱、灵敏度低等不足，特别是对早期肿瘤的检出率不高，易出现漏诊。LC 与上述检测方法和固态芯片检测技术相比，在精确度、及时性以及肿瘤早期发现等方面都具有更加优越的性能。

2.1　基于 LC 技术的核酸分析与肿瘤研究　LC 技术通过将人工合成的寡核苷酸探针连接于微球表面，可进行核酸研究。除具有一般固相基因芯片或寡核苷酸微阵列的功能(如核苷酸测序、SNP 检测、基因表达谱分析、基因作图等)[6]，同时也能实现精确定性、定量分析。以生物素标记引物进行 PCR 反应可获得带有生物素标记的 PCR 产物，将其与微球上的特异性探针进行杂交，并加入链亲和素藻红蛋白与生物素结合，激光激发此荧光标记即可实现对目标核酸的检测。通常捕获探针长度为 18～24 bp，G+C 含量为 40%，Tm 值高于 50℃，且目的和非目的序列间的不匹配碱基尽量位于探针中央区域时可获得更好的特异性[7-8]。目前基于 LC 技术的核酸检测已成功应用于囊性纤维化穿膜传导调节因子突变、人类白细胞抗原分型、激素表达谱、病毒分型、乳腺癌相关基因、抗原加工相关转运子、肺癌相关基因、信号转导通路相关基因等方面的研究，均证实 LC 技术与传统检测技术相比，在灵敏度、准确度、稳定性、检测速度、成本消耗等方面具有更高的优越性，可广泛应用于疾病大规模筛查，肿瘤早期诊断、疗效及预后判断，介入治疗监测以及疫苗效果评价等方面[9-16]。

2.2　基于 LC 的免疫学分析与肿瘤研究　LC 技术克服了传统免疫学方法检测效率低下的不足，更适合于同时进行多指标检测。应用 LC 技术检测患者体内某种抗体的浓度时所需反应体积小，不需去除过量的荧光标记抗体，以每类微球上的绿色荧光信号作为平均荧光强度进行报告，与所结合的抗体量相符，应用适当的定标器即可进行定量分析。LC 技术拥有常规免疫学检测方法难以媲美的优点，即通量大，可同时分析多种目的分子，不仅提高了工作效率，而且液态环境更有利于保持生物大分子的天然构象，有利于反应的进行，故灵敏度、准确性、重复性、灵活性更好，且只需要微量的样品即可进行检测[17-18]。以检测细胞因子为例，酶联免疫吸附法(ELISA)的检测范围仅 1～2 个数量级，而 LC 最高检测浓度为 16 000～32 000 pg/mL，达到 3～4 个数量级，灵敏度也远胜于 ELISA，为 2～4 pg/mL，且二者检测结果相关性极高，因此 LC 有可能成为 ELISA 的替代方法[19-20]。其在免疫学领域的缺陷是人血清中存在的一些天然抗体会直接结合在微球表面，形成非特异性背景，对检测结果产生干扰[21]。Avaniss-Aghajani 等[22]将 LC 应用于抗 SSA、SSB、Sm、RNP、Scl-70、dsDNA 和着丝粒蛋白 B (CENP-B)抗体的检测，并与免疫荧光检测(IFA)和酶免疫检测(EIA)进行比较，结果显示 3 种方法平均一致性为 91%，最低为 81%(抗 dsDNA)，最高为 97%(抗 CENP-B)。研究证实，LC 技术也可应用于头颈部鳞状细胞癌早期诊断和非小细胞肺癌预后判断[23-24]。Linkov 等[25]采用 LC 技术研究肿瘤标记物、化学增活素和转移相关分子等在持续过度捐血多年的健康妇女体内的水平，结果显示 LC 技术可以作为一种前瞻性的流行病学研究方法。Zhao[26]和 Ko[27]等分别应用基于微球技术(SCCBs)的化学发光免疫分析法和以 LC 技术为基础的电免疫传感系统检测肿瘤标记物，也证实 LC 技术具有高稳定性、高精确性、高敏感性和低耗性(时间和材料)。

2.3　基于 LC 的蛋白质分析与肿瘤研究　LC 提供的高通量药物筛选平台可直接从蛋白水平寻找靶标，解释药物的作用机理、毒副作用，并提高了药物筛选速度[28]。LC 技术具有常规蛋白质检测方法所不具备的特点：(1)高通量，可同时分析同一样本中的多种不同蛋白质；(2)灵敏度高，检测只需微量的样品，非常适合分析稀有样本；(3)操作简便，耗时短；(4)灵活性好，可自由组合所需检测的多种蛋白质[29]。由于不是固定的平面阵列，LC 技术可以允许根据需要检测的对象有目的地配置微球和探针分子，大大降低了成本，而且信号检测过程中不存在冲洗问题，在蛋白质检测方面应用前景十分广阔。Takamiya 等[30]用 LC 技术对脑外伤恢复期的 27 种细胞因子进行定量检测，证实 LC 技术在脑外伤愈合过程中对血清标本进行多种细胞因子的定量检测有助于判断受伤时间的长短。Lin 等[31]采用 LC 技术结合时间飞行质谱技术研究血清肿瘤标记物，证实该项技术可高效快速区分蛋白质和多肽链，具有对肿瘤进行预测的临床价值。Khan 等[32]利用 LC 技术开发了 3 种复合微珠检测法同时检测乳腺癌细胞系及表皮样癌细胞系中表皮生长因子受体蛋白各亚型的表达、蛋白-蛋白之间的反应及受体酪氨酸激酶的磷酸化反应，研究结果提示该方法在药物筛选和分子信号转导的研究方面显示出高效性。Arellano-Garcia[33]等应用 LC 技术研究唾液中口腔癌蛋白的表达，并与 ELISA 的检测效果进行比较，结论提示 LC 技术与 ELISA 法在定量检测唾液中蛋白质表达时具有同样的效果。

3　LC 研究展望

LC 技术已日趋成熟，彩色微球及配套的检测系统已商品化，使用者既可采用已有的试验方案，亦可自行设计分析方案或使用成套试剂盒。LC 技术整合了多种现代生物学技术，具有较高的特异性与灵敏性，适用于分子水平的各个层次，人力、物力、时间、试剂及样本消耗低，特别适用于流行病学调查、临床诊断及蛋白组学研究，在肿瘤研究中的应用也更加广泛。LC 技术的部分缺陷(免疫学检测时天然抗体产生的荧光背景消除、聚苯乙烯微球与杂交探针交联的稳定性的提高、新型微球材料的开发、基于液态芯片技术的新检测手段的研发等)也将在未来的研究中逐步克服和改进，在后基因组时代的生物学研究领域中，LC 技术将会发挥更大的作用。

参考文献

[1] Jia XC, Raya R, Zhang L, et al. A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies[J]. J Immunol Methods, 2004, 288(1-2): 91-98.

[2] 何英，陆学东. 液相芯片技术及其应用[J]. 国际检验医学杂志，2006, 27(12): 1107-1108.

[3] Dunbar SA, Vander ZA, Oliver KG, et al. Quantitative multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and p rotein application of the Luminex LabMAP system[J]. J Microbiol Methods, 2003, 53(2): 245-252.

[4] Nolan JP, Sklar LA. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(1): 9-12.

[5] 罗史科，张松，邹汉良，等. 应用液态基因芯片技术对 132 例 β-地中海贫血基因检测分析[J]. 国际检验医学杂志，2009, 30(7): 647-650.

[6] Bortolin SM, Black M, Modi H, et al. Analytical validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform: application to the multiplex detection of a panel of

thrombophilia-associated single-nucleotide polymorphisms[J]. Clin Chem, 2004, 50(11): 2028-2036.

[7] Diaz MR, Fell JW. High-throughput detection of pathogenic yeasts in the genus Trichosporon[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3696-3706.

[8] Diaz MR, Fell JW. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the cryptococcus neoformans species complex[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3662-3672.

[9] Dunbar SA, Jacobson JW. Rapid screening for 31 mutations and polymorphisms in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by Luminex xMAP suspension array[J]. Methods Mol Med, 2005, 114: 147-171.

[10] Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, et al. High-throughput DNA typing of HLA2A, 2B, 2C, and 2DRB1 loci by a PCR-SSOP Luminex method in the Japanese population[J]. Immunogenetics, 2005, 57(10): 717-729.

[11] Naciff JM, Richardson BD, Oliver KG, et al. Design of amicrosphere based high throughput gene expression assay to determine estrogenic potential[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(9): 1164-1171.

[12] Oh Y, Bae SM, Kim YW, et al. Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types[J]. Cancer Science 2007, 98(4), 549-554.

[13] Ke F, Wu JM. Application of suspension array assay to detect marker genes expression of circulating tumor cells for early prediction of breast cancer metastasis[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, 87(32): 2257-2261.

[14] Einstein MH, Leanza S, Chiu LG, et al. Genetic variants in TAP are associated with high-grade cervical neoplasia[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(3): 1019-1023.

[15] Paradis FW, Simard R, Gaudet D. et al. Quantitative assay for the detection of the V617F variant in the Janus kinase 2 (JAK2) gene using the Luminex xMAP technology[J/OL]. BMC Med Genet, 2010, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359349.

[16] Ye Y, Wang D, Su C. et al. Combined detection of p53, p16, Rb, and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray[J]. Genet Mol Res, 2009, 8(4): 1509-1518.

[17] Dejager W, Rijkers GT. Solid phase and bead based cytokine immunoassay: a comparison[J]. Methods, 2006, 38(4): 294-303.

[18] Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 36(5): 1037-1044.

[19] Hulse RE, Kunkler PE, Fedynyshyn JP, et al. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue[J]. J Neurosci Methods, 2004, 136(1): 87-98.

[20] de Jager W, Prakken BJ, Bijlsma JWJ, et al. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies[J]. J Immunol Methods, 2005, 300(1-2): 124-135.

[21] Wong SJ, Demarest VL, Boyle RH, et al. Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay[J]. J Clin Microbiol. 2004, 42(1), 65-72.

[22] Avaniss-Aghajani E, Berzon S, Sarkissian A. Clinical value of multiplexed bead-based immunoassays for detection of autoantibodies to nuclear antigens[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(5): 505-509.

[23] Linkov F, Lisovich A, Yurkovetsky Z, et al. Early detection of head and neck cancer: development of a novel screening tool using multiplexed immunobead based biomarker profiling[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16 (1): 102-107.

[24] Shah SA, Spinale FG, Ikonomidis, JS, et al. Differential matrix metalloproteinase levels in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 139 (4): 984-990.

[25] Linkov F. Gu Y. Arslan AA. et al. Reliability of tumor markers, chemokines, and metastasis-related molecules in serum[J]. Eur Cytokine Netw, 2009, 20(1): 21-26.

[26] Zhao YJ, Zhao XW, Pei XP, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 633(1): 103-108.

[27] Ko YJ, Maeng JH, Ahn Y, et al. Microchip-based multiplex electro-immunosensing system for the detection of cancer biomarkers [J]. Electrophoresis, 2008, 29(18): 3466-3476.

[28] Prabhakar U, Eirikis E, Reddy M, et al. Validation and comparative analysis of a multip lexed assay for the simultaneous quantitativemeasurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants[J]. J Immunol Methods, 2004, 291 (122): 27-38.

[29] Dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants[J]. J Reprod Immunol, 2005, 66(2): 175-191.

[30] Takamiya M, Fujita S, Saigusa K, et al. Simultaneous detections of 27 cytokines during cerebral wound healing by multiplexed Bead-based immunoassay forwound age estimation[J]. J Neuro trauma, 2007, 24 (12): 1833-1844.

[31] Lin XL. Yang SY. Du J, et al. Detection of lung adenocarcinoma using magnetic beads based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry serum protein profiling[J]. Chin Med J, 2010, 123(1): 34-39.

[32] Khan IH, Zhao J, Ghosh P, et al. Microbead Arrays for the analysis of ErbB receptor tyrosine kinase activation and dimerization in breast cancer cells[J]. Assay Drug Dev Technol, 2010, 8(1): 27-36.

[33] Arellano-Garcia MT, Hu S, Wang J, et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliv[J]. Oral Diseases, 2008, 14(8): 705-712.

(收稿日期：2010-05-13)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数，通常是未知的，一般用希腊字母表示，如 μ、σ、π 等。描述样本特征的数值为统计量，是已知的或可计算获得的，用英文字母表述，如 S、P 等。从总体中随机抽样可获得样本，以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。