

the most frequent cause of hereditary disease? [J]. FEBS Lett, 2005, 579(9):1900-1903.

[25] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. Nat Genet, 2008, 40(12):1413-1415.

[26] Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(10):749-761.

[27] Cuajungco MP, Leyne M, Mull J, et al. Tissue-specific reduction in splicing efficiency of IKBKAP due to the major mutation associated with familial dysautonomia [J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(3):749-758.

[28] Carmel I, Tal S, Vig I, et al. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions[J]. RNA, 2004, 10(5): 828-840.

[29] Sharp A, Pichert G, Lucassen A, et al. RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1[J]. Hum Mutat, 2004, 24(3):272.

[30] Colapietro P, Gervasini C, Natacci F, et al. NF1 exon 7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis 1 patient [J]. Hum Genet, 2003, 113(6): 551-554.

[31] Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, et al. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes[J]. Nat Genet, 2001, 27(1):55-58.

[32] Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2004, 11(5): 1085-1090.

[33] Ghigna C, Giordano S, Shen H, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene [J]. Mol Cell, 2005, 20(6):881-890.

[34] Pettigrew CA, Brown MA. Pre-mRNA splicing aberrations and cancer[J]. Front Biosci, 2008, 13:1090-1105.

[35] Staalesen V, Falck J, Geisler S, et al. Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(52):8535-8544.

[36] Powlledge TM. Bear market slashes at human genome. The dropping guesses about the number of human genes challenges researchers to explain human complexity with so few genes[J]. EMBO Rep, 2000, 1(3):212-214.

[37] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth[J]. Nature, 2008, 452(7184):230-233.

[38] Wang Y, Cheong CG, Hall TM, et al. Engineering splicing factors with designed specificities [J]. Nat Methods, 2009, 6(11): 825-830.

[39] Durgaprasad Bollina, Lee Bennett TK, Tan TW, et al. ASGS: an alternative splicing graph web service [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:444-447.

[40] Birzele F, Küffner R, Meier F, et al. ProSAS: a database for analyzing alternative splicing in the context of protein structures [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36:63-68.

[41] Stamm S, Riethoven JJ, Texier VL, et al. ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 46-55.

[42] Barash Y, Calarco JA, Gao W, et al. Deciphering the splicing code [J]. Nature, 2010, 465(7294):53-59.

(收稿日期:2012-01-31)

浓度梯度微流控芯片技术研究进展*

蒋丽莉, 邓 均, 方立超, 李 艳, 贺 娟 综述, 郑峻松[△], 黄 辉 审校
(第三军医大学医学检验系临床检验学教研室, 重庆 400038)

关键词:微流控芯片; 浓度梯度; 综述
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 11. 025 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)11-1336-03

微流控芯片技术是由瑞士科学家 Manz 等^[1]在 20 世纪 90 年代提出,该技术通过运用微机械加工(MEMS)技术将生物学和分析化学等领域中所涉及的样品制备、分离、反应、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米的芯片上,通过微通道形成网络,可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室的各种功能,以其微型化、集成化、高通量、高精度的特征在众多生命科学领域显示出巨大的发展潜力和应用价值^[2]。近年来,浓度梯度微流控芯片越来越受到大家的关注。它通过建立内部可控的稳定的浓度梯度,微流控技术和细胞培养、药物筛选等其他技术有机结合起来,广泛地应用于多种细胞生物学研究^[3-4]。本文将从浓度梯度微流控芯片的特点,浓度梯度微流控芯片的设计和制作,浓度梯度微流控芯片的应用三个方面进行综述,最后对浓度梯度微流控芯片在神经微环境中的应用进行展望。

1 浓度梯度微流控芯片的特点

浓度梯度微流控芯片与其他体外研究体系相比有许多独特的优势。首先浓度梯度微流控芯片可以形成精确的浓度梯度,且通过改变网络通道的构型设计及初始液流的浓度和组合顺序,可获得一系列复杂的浓度梯度^[5-6]。这是其他系统难以达到的。其次,与传统的研究体系相比,浓度梯度微流控芯片具有与体内微血管尺寸相近的微通道且采用灌流培养方式,更接近于体内复杂的微环境,能够进行细胞的生长和分化、细胞趋化和胞内物质分析等^[7-9],且在此微小尺寸通道中的流体具有层流特性,当两种或更多种不同试剂流入同一通道时,各试剂流能够保持自身的流型不变,而只在相与相的接触界面上发生反应或分子扩散现象,具有较高的稳定性和重现性。最后根据浓度梯度微流控芯片设计加工灵活的特点,可以实现多种单元操作技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。如

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2009BB5335)。 [△] 通讯作者, E-mail: zhengalpha@yahoo. com。

可以与电阻、电阀等其他模块组合,以得到所需的任意的浓度梯度,而且所得的梯度具有实时可变性。

2 浓度梯度微流控芯片的设计和制作

浓度梯度微流控芯片的设计原则是依赖不同的浓度并列入口,通过流体驱动装置控制流速和流量,使液体以层流的方式流动,并且通过扩散的方式经过多层次的分流、汇流逐渐混合,流经不同的芯片网络形成复杂的浓度梯度,只要溶液的流动保持一个恒定的流速,就能很好地控制浓度梯度。且能长时间保持稳定。芯片网络的设计具有很大的灵活性,可以有不同的形态和空间构型^[10-11]。而通过改变通道的长度及网络构型,可获得各种不同的浓度梯度。

浓度梯度微流控芯片传统的制作材料主要有单晶硅、玻璃、石英等,通过光刻和蚀刻技术进行加工,然后可以获得精度很高的微流控芯片,但是这种方法存在对加工条件要求高、加工周期长、加工成本贵等缺陷。近年来,高分子聚合物材料如聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等因具有优良的光学特性、很高的生物兼容性和气体通透性,而且原材料价格便宜、制作周期短、耐用性好、封装方法灵活,得到了广泛的应用。通过浇注的方法制作 PDMS 或 PMMA 器件,再将其与其他材料如玻璃等进行封接就制成了微流控芯片,这种芯片微加工方法对加工设备要求低、加工周期短,成本低,是一种较好的微流控芯片快速加工技术。

3 浓度梯度微流控芯片的应用

浓度梯度微流控芯片能够精确地控制化学引诱剂浓度梯度的形成和方向^[12]。许多的内因子信号,特别是和趋化相关的,通过有两个进口的微流控网络能够在内环境中获得浓度梯度,Jeon 等^[13]利用浓度梯度微流控芯片多层次的分流、汇流混合方式,即先将初始液分流,而后再与其他相邻初始液流的分流混合,此混合液流再进行下一步分流及与相邻液流的汇流,如此循环往复操作,众多浓度不同的分支液流并行汇合,形成浓度梯度,而且这种连续流动的浓度梯度可以稳定的保持一段时间。他研究了在白细胞介素-8 形成的梯度下主要中性粒细胞的迁移,并且观察了中性粒细胞在一个浓度梯度急剧下降的梯度空间里的不同的敏感度。Wang 等^[14]运用集成细胞水平的浓度梯度微流控芯片研究了 MDA-MB-231 细胞在表皮生长因子(EGF)形成的线性浓度梯度中的反应,MDA-MB-231 细胞没有表现出趋化现象,但当它们暴露在不同的浓度梯度中时,表现出显著的定向移动。

在另一个中性粒细胞迁移的时间方面的探索中,Irimia 等^[15]采用一种浓度梯度转换芯片以研究中性粒细胞对时间依赖逐步升高,逐步降低的反应,以及白细胞介素-8 浓度梯度反向后的反应。有趣的是,当浓度梯度逐渐降低到初始浓度一半时,作者观察到了去极化后的复极化时期,由此揭示出以前从没被报道过的动力学。Mao 等^[16]在浓度梯度微流控芯片中采用一个非常低的流速(314 nL/min),量化了大肠杆菌的迁移,与之前关于哺乳细胞的研究工作相比,大肠杆菌悬浮在通道中,并且聚集在不同通道的下游,而这主要取决于它们在层流中的位置。当浓度梯度消失时,细菌在中央通道周围呈对称分布。作者还成功地指出了野生型和趋化突变株针对几种不同浓度梯度的反应特点,得出的结论符合菌株的已知特性。

上述提及的获得浓度梯度的方法都依靠液体在微流控芯片通道中持续的流动来保持。Walker 等^[17]发现,尽管总的迁移距离并不被流速影响,但依赖一定的方法迁移的方向会随着一定的流速流动的方向发生偏向。

另一个令人关注的浓度梯度微流控芯片的应用是可溶性信号分子的扩散^[18]。细胞通常不会单独行动,而是可以很好地通过可溶性信号因子协调一致运动。在流动的条件下,即使是相对缓慢地流动,这些信号分子都能被运送出细胞得到其他细胞的回应。因此,自由流动的浓度梯度芯片能促进微流控细胞培养模型里的细胞间的信号联系。

还有几种报道出来的方法是微流控芯片装置中产生了浓度梯度但没有液体的流动。Abhyankar 等^[19]特别用了一种芯片装置采用一张微孔大小为 0.25 μm 的膜,放在一个体积较大的进口和汇合口之间,以限制液体在狭窄通道里的流动。Wu 等^[20]用一块水凝胶像三明治一样夹在两块 PDMS 之间,其中一块 PDMS 表面有通道网络,以这样的芯片装置证明了浓度梯度的形成。运用凝胶形成三维空间的浓度梯度也报道出来了,Rosoff 等^[21]证明了将三种并行的通道成型在一个凝胶上,可以形成任意的浓度梯度。Cheng 等^[22]在中心通道内形成了一个梯度通过运用两个外边的通道作为趋化的进口和汇合口,研究了大肠杆菌以及 HL-60 细胞暴露在适当的浓度梯度刺激中的反应。微流控芯片还能通过微泵微阀控制流体的速度和方向,实现微通道中流体的操纵。

浓度梯度微流控芯片设计灵活多样,是一个非常大的进步,超过了依赖移液管的方法,如邓恩和博伊登盒,并且在精密度和多样性上是一个巨大的跨越。然而浓度梯度微流控芯片的易操作性和其批量生产能力还需要改进提高。

4 浓度梯度微流控芯片在神经微环境中的应用及展望

近年来,浓度梯度微流控芯片技术作为一个新兴的技术平台已应用于神经科学领域的研究。利用浓度梯度微流控芯片可以研究生长因子、细胞因子以及趋化因子等对单个神经元或胶质细胞的影响;也可以研究单个神经细胞之间的相互作用,如研究突触和髓鞘的形成过程;也可以将浓度梯度微流控芯片技术与微电极阵列或膜片钳等技术结合研究神经细胞的一些电生理参数。Yuta 和 Takashi^[23]通过在芯片上构建纳米大小的孔阵列,以微阀控制纳米孔中的神经生长因子(NGF)的释放,观察其对神经轴突生长的影响。随着微流控芯片技术的不断成熟,微流控芯片的应用也会不断扩展,有望成为神经生长锥导向研究的又一个平台。

参考文献

- [1] Manz A, Graber N, Widmer HM. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing[J]. *Sensor Actuators B*, 1990, 1(1): 244-248.
- [2] Wang J, Ren L, Li L, et al. Microfluidics: a new cosset for neurobiology[J]. *Lab Chip*, 2009, 9(5): 644-652.
- [3] Park ES, Brown AC, DiFeo MA, et al. Continuously perfused, non-crosscontaminating microfluidic chamber array for studying cellular responses to orthogonal combinations of matrix and soluble signals[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(5): 571-580.
- [4] Ota S, Yoshizawa S, Takeuchi S. Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(35): 6533-6537.
- [5] Jeon NL, Dertinger SKW, Chiu DT, et al. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems[J]. *Langmuir*, 2000, 16(22): 8311-8316.
- [6] Dertinger SK, Chiu DT, Jeon NL, et al. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(6): 1240-1246.

[7] Englert DL, Manson MD, Jayaraman A. Investigation of bacterial chemotaxis in flow-based microfluidic devices[J]. Nat Protoc, 2010, 5(5):864-872.

[8] Saadi W, Wang SJ, Lin F, et al. Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 8(2):109-118.

[9] Haessler U, Kalinin Y, Swartz MA, et al. An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies[J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(4):827-835.

[10] Clausell-Tormos J, Griffiths AD, Merten CA. An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries[J]. Lab Chip, 2010, 10(10):1302-1307.

[11] Chapin SC, Pregibon DC, Doyle PS. High-throughput flow alignment of barcoded hydrogel microparticles[J]. Lab Chip, 2009, 9(21):3100-3109.

[12] Chung S, Sudo R, Vickerman V, et al. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions[J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(3):1164-1177.

[13] Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SK, et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a micro-fabricated device[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(8):826-830.

[14] Wang SJ, Saadi W, Lin F, et al. Differential effect of EGF gradient profiles on breast cancer cell chemotaxis[J]. Exp Cell Res, 2004, 300(1):180-189.

[15] Irimia D, Liu SY, Sharp WG, et al. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients[J]. Lab Chip, 2006, 6(2):191-198.

[16] Mao H, Cremer PS, Manson MD. A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(9):5449-5454.

[17] Walker GM, Sai J, Richmond A, et al. Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator[J]. Lab Chip, 2005, 5(6):611-618.

[18] Chung S, Sudo R, Vickerman V, et al. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions[J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(3):1164-1177.

[19] Abhyankar VV, Lokuta MA, Huttenlocher A, et al. Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies[J]. Lab Chip, 2006, 6(3):389-393.

[20] Wu HK, Huang B, Zare RN. Generation of complex, static solution gradients in microfluidic channels[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(13):4194-4195.

[21] Rosoff WJ, McAllister R, Esrick MA, et al. Generating controlled molecular gradients in 3D gels[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91(6):754-759.

[22] Cheng SY, Heilman S, Wasserman M, et al. A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration[J]. Lab Chip, 2007, 7(6):763-769.

[23] Yuta N, Takashi Y. Cell differentiation guidance using chemical stimulation controlled by a microfluidic device[J]. Sensor Actuator A, 2007, 139(1/2):252-258.

(收稿日期:2012-02-07)

• 综 述 •

miRNA 定量检测中内参基因的选择

陈 旭¹综述, 史 菊², 蒋 敏¹, 顾国浩¹审校

(1. 苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215006; 2. 江苏省宿迁市泗洪县人民医院检验科 223900)

关键词: 微 RNA; 内参基因; 基因芯片; 聚合酶链反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 11. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1338-03

近年来,微小 RNA(miRNA)功能与疾病发生、发展和诊断治疗的关系研究备受关注。miRNA 在体液中可稳定存在,在疾病分类中其表达谱已被证实比 mRNA 的表达谱更准确。然而,至今在有关 miRNA 定量研究的数据分析中缺乏标准化,因而导致研究数据重复性较差、结论不统一,很难真正应用于临床诊疗工作中。为有效解决此类问题,本文就不同样本 miRNA 定量检测中 miRNA 内参基因的选择综述如下。

miRNA 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,其长度约 22 个核苷酸。它通过互补或不完全互补的方式与信使 RNA(mRNA)相应区域结合,抑制蛋白质翻译^[1]。最近有证据表明,miRNA 也可影响 mRNA 的稳定性。miRNA 自身表达具有高度保守性、时序性和组织特异性。研究表明,miRNA 参与了几乎所有生命活动,包括细胞发育、造血、脂肪代谢、器官生成、凋亡和细胞增殖。miRNA 的调节网络既可通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。miRNA 异常表达调控与肿瘤、心脑血管疾病的发生有关。miRNA 既可作为抑癌基因下调原癌基因活性,也可作为癌基因下调抑癌基因活性,还可调节肿瘤相关基因的表达,其自身突变、缺失、易位及相互调控异

常等还可导致相关基因异常表达。准确选定 miRNA 内参基因用于 miRNA 精准定量检测则是研究 miRNA 与疾病发生、发展和临床诊疗等相关性的关键点。

1 miRNA 检测技术与 miRNA 内参基因的选择

目前,用于 miRNA 检测的方法主要有 Northern 印迹、基因芯片、液态生物芯片和实时定量 PCR(qRT-PCR)。

Northern 印迹是首先被用于半定量检测 miRNA 的实验技术,至今仍被视为是检测 miRNA 的金标准^[2]。其原理是通过探针与目标 miRNA 杂交从而检测 miRNA。Northern 印迹的主要缺点是:要求的样本量大、灵敏度低、操作耗时,且不适用于高通量检测。因此在 miRNA 检测时,Northern 印迹通常用于结果的验证。

基因芯片技术又称微阵列(microarray),是当前广泛用于检测 miRNA 水平的高通量技术。该技术也是通过杂交反应检测 miRNA,微阵列可一次性对大量样本进行持续、快速、有效的检测,但同样也存在不足:如检测所需样本量较大,耗费较高,不同实验室之间结果可重复性差等^[3]。这些缺点均限制了基因芯片技术的广泛应用。在科研工作中,基因芯片技术一般多用于 miRNA 的初筛,得到的结果通常需经过 Northern 印迹