

- (4):648-656.
- [22] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (13): 6092-6099.
- [23] Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (14): 5761-5767.
- [24] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1571-1582.
- [25] Kojima K, Takata A, Vadnais C, et al. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2011, 2(1): 338.
- [26] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (12): 28486-28491.
- [27] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-9807.
- [28] Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M et al. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Biomarkers*, 2009, 14 (7): 529-538.
- [29] Tian Q, Liang L, Ding J, et al. MicroRNA-550a acts as a pro-metastatic gene and directly targets cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48958.
- [30] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45 (4): 355-360.
- [31] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-4788.

(收稿日期: 2012-12-12)

• 综 述 •

蛋白质芯片构建技术的研究进展*

陈艺心 综述, 赵树铭[△] 审校

(第三军医大学西南医院输血科/中国人民解放军重庆血站, 重庆 400038)

关键词: 蛋白质芯片; 构建技术; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0989-03

蛋白质芯片是指将蛋白质或多肽等固定于支持介质表面, 用于样品成分和蛋白质之间相互作用的分析, 亦称蛋白质微阵列。该技术最早是作为基因芯片功能的补充, 用于生物功能基因组学研究。由于其具有高通量平行分析、信噪比高、所需样品量少、可直接关联 DNA 序列和蛋白质信息等特点^[1-2], 逐渐受到生物、医学领域的关注, 现已广泛应用于疾病诊断、药物开发及蛋白质组学等领域的研究。相比 DNA, 蛋白质的结构和功能更为复杂多变, 因而相关的构建技术和芯片检测方法成为研究热点和难点, 发展尤为迅速, 获得很多重大进展。

1 芯片载体的选择

1.1 玻璃载片 玻片具有廉价易得、表面光滑不渗透、性能稳定、荧光背景较低等优点, 广泛应用于生物芯片的制作。为了使蛋白质稳定地固定于玻片载体的表面, 常常需要对玻璃表面进行物理化学修饰。

常用的玻片表面修饰方法包括氨基、醛基、环氧基、聚赖氨酸、链霉亲和素修饰等。这类载体大部分是通过共价键或特殊分子间的高亲和力来固定蛋白质, 结合牢固且构象变化较少, 有利于保持蛋白质的天然活性。醛基修饰玻片是利用醛基和蛋白质上的氨基形成 Schiff 碱而使探针共价结合到玻片表面, 由于蛋白质通常含有多个氨基, 因此这类固定是无序的。MacBeath 等^[3] 在醛基修饰的玻片表面构建蛋白质微阵列, 成功地在 10 799 个 G 蛋白样点中清晰分辨出唯一一个 FKBP12-rapamycin 复合物结合位点 (FRB) 的样点。聚赖氨酸通过 COOH 基团与玻片表面的 Si-OH 发生脱水反应从而连接于玻

片表面, 并且其结构中含有多个氨基可与蛋白质偶联, 因此这类基片具有稳定、点密度高、探针针对性强的特点。Angenendt 等^[4] 通过比较 11 种不同载体及其表面修饰方法发现, 聚赖氨酸修饰玻片上的样点形态比较均一, 点间变异系数 (11%) 较小, 检测限相对较低。环氧基修饰玻片是一种较新的蛋白质芯片载体, 环氧基活性很强, 可以和蛋白质表面的多种基团如羟基、巯基、羧基等反应。Kusnezow 等^[5] 对 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、 γ -巯丙基三甲氧基硅烷 (MPTS)、多聚赖氨酸 (PLL) 和丙基三甲氧基硅烷 (GPTS) 与不同交联剂修饰的 700 多张玻片进行了抗体微阵列的构建, 分析比较了它们的检测效果, 判定经 GPTS 处理的环氧基玻片效果最好。综上所述, 此类二维修饰的玻片载体制作简单, 点样均一, 应用较为广泛, 但对蛋白质固定量仍不理想, 且蛋白质易失活。

与微流控式基因芯片类似, 通过在玻片或硅片上制作各种微泵、微阀、微电泳以及微流路形成的蛋白质微流体芯片, 可将生化实验室的分析功能浓缩固化到蛋白质微阵列中。微流体芯片吸附表面大, 分析敏感度高, 检测速度快, 且可重复多次使用。Gerber 等^[6] 利用原位微流亲和实验技术和自组装蛋白质合成技术等, 建立了一种体外高通量筛选蛋白质相互作用的微流实验平台, 并成功构建出肺炎链球菌 43 个蛋白质的相互作用网。

1.2 凝胶膜 将聚丙烯酰胺或琼脂糖等凝胶包被于玻片或滤膜表面, 再引入可与蛋白质结合的活性基团, 从而形成一种三维立体结构的载体。聚丙烯酰胺和琼脂糖都是有孔的亲水性

* 基金项目: 重庆市科委攻关课题资助项目 (CSTC, 2011AC5039)。 作者简介: 陈艺心, 女, 在读研究生, 主要从事输血相关研究。

[△] 通讯作者, E-mail: shumingzhao@yahoo.com。

材料,核酸或蛋白质探针能够扩散到孔内,与载体的接触面积大大增加,对探针的固定能力远大于二维平面。此外,凝胶的亲水性使探针处于湿润的环境,能够更好地保持蛋白质的活性。因此,这类载体常用于酶动力学反应、蛋白质相互作用及抗原抗体反应等研究。Mirzabekov 等^[7]在硅烷化玻片表面构建了聚丙烯酰胺凝胶微阵列,将凝胶设计为 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, 间隔 $200\ \mu\text{m}$ 的小块,既利用了凝胶三维结构的优点,又可避免不同凝胶块中样品的交叉反应。

1.3 金膜 采用金膜作为蛋白质芯片的载体主要是通过表面分子自组装技术进行抗体固定。所谓分子自组装就是分子与分子在一定条件下依赖非共价键分子间作用力(氢键、范德华力、静电力、疏水作用力、 π - π 堆积作用、阳离子- π 吸附作用等)自发连接成结构稳定、高度有序分子聚集体^[8]。这一类载体通过膜上功能分子的活性基团与蛋白质的活性基团共价结合来固定蛋白质,加之金膜性能稳定、方便制作,并且能引入不同的功能分子来满足不同蛋白质的结合需求,因而广泛应用于分子自组装技术。此外,由于金具有良好的导电性,还被广泛用于电化学和表面等离子共振技术(SPR)检测方法中^[9]。近年来有研究将分子自组装技术与凝胶等三维载体结合,解决了蛋白质探针容易变性的问题,取得较好效果^[10-11]。

1.4 液相载体 20 世纪 90 年代中期发展起来的液相芯片是以美国 Luminex 公司的 xMAP 技术为基础的新型生物芯片技术平台。液相芯片可以进行蛋白质、核酸等生物大分子的检测及酶学、受体和配体识别的分析研究,且具有通量高、灵敏度和准确度高、信噪比好、操作简便、重复性好等优点^[12],得到越来越广泛的应用。Avaniss-Aghajani 等^[13]用液态芯片技术检测了 984 份标本中的 SSA、SSB、Sm、RNP、Scl270、dsDNA 和抗着丝粒蛋白 B 抗体,其结果与 ELISA 和免疫荧光技术具有可比性。Lud 等^[14]将液态生物芯片技术用于多种癌症的 miRNA 表达谱检测,结果显示该方法在准确性、抗交叉反应性、线性范围等方面均优于固相芯片,是目前研究 miRNA 的最好方法。也有报道将液态芯片技术用于多种病原微生物的检测^[15],均比常规方法更快速、灵敏、准确。

2 固定方法的类型

由于蛋白质的物理结构和化学性质都比 DNA 更复杂,在固定到载体表面的过程中容易失活,而且不同蛋白质的性质千差万别,其活性与空间结构密切相关,因而发展一种稳定、通用且尽量保持蛋白质构象的固定方法是蛋白质芯片研制的难点之一。

2.1 物理吸附 物理吸附是指通过分子间作用力将蛋白质固定到载体表面。该方法常用的载体一般为三维多孔材料,如聚丙烯膜和凝胶等。物理吸附是最经典的抗体固定方式,具有价格低廉、操作简便的优点。但物理吸附的蛋白质朝向不一致,探针层有差异,且蛋白质固定量较小、结合力较弱。

2.2 共价结合 共价结合是指用功能基团修饰原本惰性的载体,通过与氨基酸的支链基团共价连接形成不可逆的探针表面。常用的蛋白质侧链功能基团如氨基、羧基、醛基等修饰的载体都已实现商业化。但由于蛋白质表面的基团不止一个,载体上固定的蛋白质形态不一,芯片表面一致性仍然不理想。

2.3 间接偶联 物理吸附和共价结合都是将蛋白质探针直接固定于载体表面,这种直接接触可能破坏蛋白质活性,造成蛋白质探针层的不均匀。为了避免这种活性的破坏,可以先在载体表面引入“桥接”分子。生物素-亲和素体系是近年来常用的一种间接偶联方式^[16]。但是将生物素或亲和素共价结合到载体表面可能会使其活性受损,因此有研究采用了“双层桥接”的

方法,即先在载体表面固定生物素,利用亲合作用使亲和素与生物素结合,形成直接与蛋白质探针结合的二层“桥接”分子,二层“桥接”分子未与载体直接接触,活性保持完好,可以与蛋白质探针很好地结合。蛋白质 A/蛋白质 G 能通过与抗体恒定区 Fc 特异度结合来固定蛋白质探针,是目前常用的另外一类“桥接”分子,这种连接方式能保证抗体的定向固定,并且不会影响到抗体发挥功能的高变区 Fab,最大程度地保留了抗体特异结合位点的生物活性和空间取向。另外还有 GST/GSH 和 His6-/Ni-NTA 系统等。

2.4 DNA 引导固定 DNA 引导固定(DDI)是一种新颖的探针固定方式,即将 DNA 连接的蛋白质通过全匹配的 DNA 双链杂交固定到有核苷酸单链修饰的表面^[17-18]。DDI 使蛋白质与载体表面保持一定距离,减少直接接触引起的活性损害。并且蛋白质探针处于液态的三维空间,反应基团完全暴露,解决了其他固定方法中探针方向的问题。有研究显示^[19],用 DDI 方法制作的蛋白质芯片特异度好,并且获得的反应信号值高。

2.5 无细胞原位蛋白质合成技术 无细胞原位蛋白质合成技术是将特定序列的外源性 mRNA 或 DNA 固定于基片表面作为模板,在蛋白质表达体系作用下即时、原位地合成目标蛋白质,避免了蛋白质提取、纯化等繁琐步骤,也解决了蛋白质不易保存的问题。目前常见的无细胞原位蛋白质合成技术主要有蛋白质原位芯片(PISA)^[20]、核酸程序化蛋白质芯片(NAP-PA)^[21]、DNA 芯片到蛋白质芯片(DAPA)^[22]、基于 mRNA 芯片的原位嘌呤捕获技术(ISPCFmA)^[22-23]等。

3 蛋白质芯片的检测

3.1 标记法 基因芯片常用的检测方法是荧光标记检测法,该方法由于原理简单、技术成熟,也沿用于蛋白质芯片的检测。传统的荧光标记法灵敏度较低,近年来出现了许多方法来放大检测信号,如生物素-亲和素放大法、纳米金-银增强法、滚环扩增法^[24]等,显著提高了低丰度蛋白质的检出率。但是,该检测方法仍然存在较多问题,如:标记过程繁琐;试剂价格昂贵;可能影响蛋白质或多肽的结构和功能;不同批次、不同样本间的标记差异较大等。

3.2 非标记法 蛋白质芯片联合表面增强激光解析/电离离子化飞行时间质谱法(SELDI-TOF-MS)和表面等离子共振法(SPR)^[25]是近几年迅速发展起来的非标记检测技术。SELDI-TOF-MS 利用激光脉冲辐射使芯片池中的分析物解析成荷电离子,由于质荷比不同,这些离子在磁场中的飞行时间长短不一,由此绘出质谱图,分析样品中各种蛋白质的含量和分子量信息。而 SPR 是利用全反射入射光与金属表面等离子共振的原理,通过检测受体与配体结合或解离时的共振信号改变,来获得分子间亲和力、特异度以及动力学常数等信息。这类方法都无需对样品进行标记,不会破坏蛋白质的结构和功能,具有高效、快速、灵敏、高通量等优点。

4 问题及展望

继基因芯片以后,蛋白质芯片逐渐受到人们的关注,与其他的分子生物学分析方法相比,具有快速、平行、高通量的优越性,最近几年发展尤为迅速,已广泛应用于疾病诊断、药物开发及蛋白质组学等的研究。但迄今为止,这一崭新的技术仍存在一些缺陷,有待进一步完善和发展,如:高效率地获得天然功能活性的蛋白质分子还比较困难;现有的蛋白固定、点样、标记方式等对蛋白质的功能活性有一定的影响;蛋白质芯片在灵敏度、特异度、可重复性方面还不理想。可喜的是,不断涌现的蛋白分子生产和分离纯化技术、载体修饰方法、蛋白分子的标记及检测新技术等,极大地推动了蛋白质芯片的发展。另外,在

针对局部问题改善技术和方法的同时,蛋白质芯片的构建也应重视各个环节的配合,以实现芯片整体性能的优化。

参考文献

[1] Stoevesandt O, He M, Taussig MJ. Protein microarrays printed from DNA microarrays[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 671(1): 95-106.

[2] Stoevesandt O, Vetter M, Kastelic D, et al. Cell free expression put on the spot: advances in repeatable protein arraying from DNA (DAPA)[J]. *N Biotechnol*, 2011, 28(3): 282-290.

[3] MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1760-1763.

[4] Angenendt P, Glokler J, Murphy D, et al. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials[J]. *Anal Biochem*, 2002, 309(2): 253-260.

[5] Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, et al. Antibody microarrays: an evaluation of production parameters[J]. *Proteomics*, 2003, 3(3): 254-264.

[6] Gerber D, Maerkl SJ, Quake SR. An in vitro microfluidic approach to generating protein-interaction networks [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 71-74.

[7] Mirzabekov A, Arenkov P, Kukhtin A, et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions[J]. *Anal Biochem*, 2000, 278(2): 123-131.

[8] 王毓德, 孙晓丹, 彭平华, 等. 分子自组装及其在传感器中的应用[J]. *高技术通讯*, 2002, 12(10): 102-107.

[9] 邓橙, 徐书宽, 朱疆, 等. 表面等离子共振成像非标记微阵列芯片检测[J]. *光电子激光*, 2009, 20(3): 366-368.

[10] 虞伟, 廖建辉, 葛存旺, 等. 琼脂糖凝胶基片用于蛋白质与抗原分子的固定研究与表征[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(4): 503-508.

[11] Seo JH, Chen LJ, Verkhoturov SV, et al. The use of glass substrates with bi-functional silanes for designing micropatterned cell-secreted cytokine immunoassays [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(23): 5478-5488.

[12] 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.

[13] Avannis-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.

[14] Lud J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7403): 834-838.

[15] Dunbar SA, Vander zee CA, Oliver KG, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAPTM system[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 245-252.

[16] 于晓波, 赵天明, 孙志丹, 等. 生物素-亲和素偶联探针蛋白芯片检测技术[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 515-520.

[17] Fan R, Vermesh O, Srivastava A, et al. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(12): 1373-1378.

[18] Kwong GA, Radu CG, Hwang K, et al. Modular nucleic acid assembled p/MHC microarrays for multiplexed sorting of antigen-specific T cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(28): 9695-9703.

[19] Wacker R, Schroder H, Niemeyer CM, et al. Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study[J]. *Analyt Biochem*, 2004, 330(2): 281-287.

[20] He M, Stoevesandt O, Taussig MJ. In situ synthesis of protein arrays[J]. *Analyt Biotechnol*, 2008, 19(1): 4-9.

[21] Ramachandran N, Raphael J, Hainsworth E, et al. Next-generation high density self-assembling functional arrays[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 535-538.

[22] Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, et al. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(16): e108.

[23] Tao SC, Zhu H. Protein chip fabrication by capture of nascent polypeptides[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(10): 1253-1254.

[24] Li ZP, Wei L, Cheng YQ, et al. Chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms on a solid surface using target-primed rolling circle amplification[J]. *Analyt*, 2008, 133(9): 1164-1168.

[25] Ray S, Mehta G, Srivastava S, et al. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges [J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 731-748.

(收稿日期: 2013-01-12)

• 综述 •

人巨细胞病毒实验室诊断进展*

夏宇综述, 张波[△]审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学专科中心, 重庆 400038)

关键词: 人巨细胞病毒; 感染; 检测; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 08. 037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0991-04

人巨细胞病毒(HCMV)是一种双螺旋 DNA 病毒,属于疱疹病毒科乙组疱疹亚科,是疱疹病毒家族中的重要成员之一。

HCMV 在世界范围内广泛传播,感染大多数人口,病毒长期潜伏于宿主细胞,呈隐性感染。当妇女妊娠时,造成胎儿宫内感

* 基金项目:重庆市攻关课题资助项目(CSTC2012gg-yyjs10046);第三军医大学回国人员启动基金资助项目(SWH2011LC022);西南医院临床创新基金资助项目(SWH2012LC12)。 作者简介:夏宇,女,主管技师,主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zbcq@yahoo.com.cn。