

## DNA 芯片制作原理及其杂交信号检测方法

张天浩 张春平 张光寅

(南开大学光子中心, 天津 300071)

陈瑞阳

(南开大学生命科学院, 天津 300071)

**摘要** 文章讨论了 DNA 芯片的制作原理和杂交信号的检测方法。依其结构, DNA 芯片可分为两种形式, DNA 阵列和寡核苷酸微芯片。DNA 芯片的制作方法主要有光导原位合成法和自动化点样法。DNA 芯片与标记的探针或 DNA 样品杂交, 并通过探测杂交信号谱型来实现 DNA 序列或基因表达的分析。适应于 DNA 芯片的发展, 同时出现了许多新型的杂交信号检测方法。主要有激光荧光扫描显微镜、激光扫描共焦显微镜、结合使用 CCD 相机的荧光显微镜、光纤生物传感器、化学发生法、光激发磷光物质存储屏法、光散射法等。

**关键词** DNA 芯片 分子杂交 信号检测

DNA 芯片 (DNA Chip) 又被称为生物芯片 (biological chip)、DNA 阵列 (DNA array) 或寡核苷酸微芯片 (oligonucleotide microchip) 等。这项技术是由美国旧金山以南的 Santa clara 的一个新兴生物公司 Affymetrix 首先发展起来的<sup>[1]</sup>。S. P. A Forder (现为 Affymetrix 公司总裁) 及其同事于 90 年代初发明了一种利用光刻技术在固相支持物上光导合成多肽的方法<sup>[2]</sup>, 并在此基础上于 1993 年设计了一种寡核苷酸生物芯片<sup>[3]</sup>, 直至 1996 年制造出世界上第一块商业化的 DNA 芯片<sup>[1]</sup>。在此期间国际上掀起了一片 DNA 芯片设计的热潮, 出现了多种类型的 DNA 芯片技术。DNA 芯片在产生的短短几年时间内技术不断完善, 现已经显现出在基因序列分析、基因诊断、基因表达研究、基因组研究、发现新基因及各种病原体的诊断等生物学领域中的应用价值<sup>[4-8]</sup>。DNA 芯片制造技术充分结合并灵活运用了寡核苷酸合成、固相合成、PCR 技术、探针标记、分子杂交、大规模集成电路制造技术、荧光显微探测、生物传感器及计算机控制和图象处理等多种技术, 充分体现了生物技术与其他学科相结合的巨大潜力。随着 DNA 芯片制造技术的蓬勃发展, 与之相适和的杂交信号检测方法也迅速发展起来并有力地推动了 DNA 芯片的完善和实际应用。

### DNA 芯片的制作原理

DNA 芯片是利用核酸杂交原理检测未知分子

的, 将核酸或核酸片段按照一定顺序排列在固相支持物上组成密集分子阵列。按照其结构基本上可分为两种类型<sup>[9]</sup>: 型, 将待测 DNA 分子样品固定在固相支持物上并与一系列游离的标记探针杂交, 杂交探针或是单一的或是混合的; 型, 按照预先设定顺序将寡核苷酸固定于固相支持物上再与标记的 DNA 样品进行杂交, 由已知的寡核苷酸序列确定被检测的 DNA 样品。通过检测标记信号的分布谱型 (Pattern) 得到分子杂交情况, 并由计算机分析处理。DNA 芯片一般只有 1-2 平方厘米, 在这样大小的空间内需要排列几百甚至上百万个单元。因而 DNA 芯片制作是一个复杂而精密的过程, 主要有两种方法。

第一种方法是光导原位合成法<sup>[3]</sup>。具体方法是在经过处理的载玻片表面铺上一层连接分子 (linker), 其羟基上加有光敏保护基团, 可用光照除去, 用特制的光刻掩膜 (photolithographic mask) 保护不需要合成的部位, 而暴露合成部位, 在光作用下去除羟基上的保护基团, 游离羟基, 利用化学反应加上第一个核苷酸, 所加核苷酸种类及在芯片上的部位预先设定, 所引入的核苷酸带有光敏保护基团, 以便下一步合成。然后按上述方法在其它位点加上另外三种核苷酸完成第一位核苷酸的合成, 因而 N 个核苷酸长的芯片需要 4N 个步骤。每一个独特序列的探针称为一个“feature”, 这样的芯片便具有  $4^N$  个“feature”, 包含了全部长度为 N 的核苷酸序列。这

种原位直接合成的方法无须制备处理克隆和 PCR 产物,但是每轮反应所需设计的光栅则是主要的经费消耗。运用这种方法制作的芯片密度可高达  $10^{-6}$  探针/平方厘米,即探针间隔为 5 - 10 $\mu\text{m}$ ,但只能制作 型 DNA 芯片。

第二种方法是自动化分区点样法。点样分子可以是核酸也可以是寡核苷酸。一些研究者采用人工点样的方法将寡核苷酸分子点样于化学处理后的载玻片上,经一定的化学方法处理并干燥后,寡核苷酸分子即固定于载玻片上,制备好的 DNA 芯片可置于缓冲液中保存<sup>[10]</sup>。由于方法费时费力,不适于大规模 DNA 芯片制作,因而实现自动化点样就显得尤为重要。有的研究者用多聚赖氨酸包被固相支持物玻片,经过分区后用计算机控制的微阵列点样机按照预先设计顺序点上核酸分子,点样量很小,约为 5nl<sup>[11]</sup>。大规模 cDNA 芯片多采用这种方法,与其寡核苷酸微芯片相比 cDNA 芯片的潜在优越性是具有更强的亲和力和特异性杂交,但是需要大量制备、纯化、量化、分类 PCR 产物<sup>[12]</sup>。有的研究者将玻片上覆盖 20 $\mu\text{m}$  厚薄层聚丙烯酰胺凝胶作为支持物,采用机械刻写或光刻的方法在其表面划上网格,并用激光照射蒸发掉单元间隙的多余凝胶,以实现 DNA 芯片分区,单元大小为 40  $\times$  40 $\mu\text{m}$  或 100  $\times$  100 $\mu\text{m}$  间隔分别为 50 $\mu\text{m}$  和 100 $\mu\text{m}$ 。然后将化学方法合成的寡核苷酸探针自动化点样于各个单元内而制成 DNA 芯片,点样速度可达 2000 单元/秒<sup>[13]</sup>。

## 杂交信号的检测

杂交信号的检测是 DNA 芯片技术中的重要组成部分。以往的研究中已形成许多种探测分子杂交的方法,如荧光显微镜、隐逝波传感器<sup>[14-17]</sup>、光散射<sup>[10]</sup>、表面共振<sup>[16,18]</sup>、电化传感器<sup>[19-21]</sup>、化学发光<sup>[22]</sup>、荧光各向异性<sup>[23]</sup>等等,但并非每种方法都适用于 DNA 芯片。由于 DNA 芯片本身的结构及性质,需要确定杂交信号在芯片上的位置,尤其是大规模 DNA 芯片由于其面积小,密度大,点样量很少,所以杂交信号较弱,需要使用光电倍增管或冷却的 CCD 机相等弱光信号探测装置<sup>[3]</sup>。此外,大多数 DNA 芯片杂交信号谱型除了分布位点以外还需要确定每一点上的信号强度,以确定是完全杂交还是不完全杂交,因而探测方法的灵敏度及线性响应也是非常重要的。杂交信号探测系统主要包括杂交信号产生、信号收集及传输和信号处理及成像三个部分组成。

由于所使用的标记物不同,因而相应的探测方法也各具特色。大多数研究者使用荧光标记物,也有一些研究者使用生物素标记,联合抗生物素结合物检测 DNA 化学发光。通过检测标记信号来确定 DNA 芯片杂交谱型。

## 1 荧光标记杂交信号的检测方法

使用荧光标记物的研究者最多,因而相应的探测方法也就最多、最成熟。由于荧光显微镜可以选择性地激发和探测样品中的混合荧光标记物,并具有很好的空间分辨率和热分辨率,特别是当荧光显微镜中使用了共焦激光扫描时,分辨能力在实际应用中可接近由数值孔径和光波长决定的空间分辨率,而在传统的显微镜是很难做到的,这便为 DNA 芯片进一步微型化提供了重要的检测方法的基础。大多数方法都是在入射照明式荧光显微镜(epifluorescence microscope)基础上发展起来的,包括激光扫描荧光显微镜、激光共焦扫描显微镜、使用了 CCD 相机的改进的荧光显微镜以及将 DNA 芯片直接制作在光纤维束切面上并结合荧光显微镜的光纤传感器微阵列。这些方法基本上都是将待杂交对象以荧光物质标记,如荧光素或丽丝胺(lissamine)等,杂交后经过 SSC 和 SDS 的混合溶液或 SSPE 等缓冲液清洗。

(1)激光扫描荧光显微镜 这种荧光杂交信号探测装置比较典型<sup>[11,24]</sup>。方法是将杂交后的芯片经处理后固定在计算机控制的二维传动平台上,并将一物镜置于其上方,由氩离子激光器产生激发光经滤波后通过物镜聚焦到芯片表面,激发荧光标记物产生荧光,光斑半径约为 5-10 $\mu\text{m}$ 。同时通过同一物镜收集荧光信号经另一滤波片滤波后,由冷却的光电倍增管探测,经模数转换板转换为数字信号。通过计算机控制传动平台 x-y 方向上步进平移, DNA 芯片被逐点照射,所采集荧光信号构成杂交信号谱型,送计算机分析处理,最后形成 20 $\mu\text{m}$  像素的图像。这种方法分辨率高、图像质量较好,适用于各种主要类型的 DNA 芯片及大规模 DNA 芯片杂交信号检测,广泛应用于基因表达、基因诊断等方面研究<sup>[7,8]</sup>。

(2)激光扫描共焦显微镜 激光扫描共焦显微镜与激光扫描荧光显微镜结构非常相似,但是由于采用了共焦技术因而更具优越性。这种方法可以在荧光标记分子与 DNA 芯片杂交的同时进行杂交信号的探测,而无须清洗掉未杂交分子,从而简化了操

作步骤大大提高了工作效率。Affymetrix 公司的 S. P. A. Forder 等人设计的 DNA 芯片即利用此方法<sup>[3]</sup>。其方法是将靶 DNA 分子溶液放在样品池中,芯片上合成寡核苷酸阵列的一面向下,与样品池溶液直接接触,并与 DNA 样品杂交。当用激发光照射使荧光标记物产生荧光时,既有芯片上杂交的 DNA 样品所发出的荧光,也有样品池中 DNA 所发出的荧光,如何将两者分离开来是一个非常重要的问题。而共焦显微镜具有非常好的纵向分辨率,可以在接受芯片表面荧光信号的同时,避开样品池中荧光信号的影响。一般采用氩离子激光器(488nm)作为激发光源,经物镜聚焦,从芯片背面入射,聚集于芯片与靶分子溶液接触面。杂交分子所发的荧光再经同一物镜收集,并经滤波片滤波,被冷却的光电倍增管在光子计数的模式下接收。经模数转换反转换为数字信号送微机处理,成像分析。在光电倍增管前放置一共焦小孔,用于阻挡大部分激发光焦平面以外的来自样品池的未杂交分子荧光信号,避免其对探测结果的影响。激光器前也放置一个小孔光阑以尽量缩小聚焦点处光斑半径,使之能够只照射在单个探针上。通过计算机控制激光束或样品池的移动,便可实现对芯片的二维扫描,移动步长与芯片上寡核苷酸的间距匹配,在几分钟至几十分钟内即可获得荧光标记杂交信号图谱。现在 Affymetrix 公司已推出商业化样机,整套系统约 12 万美元<sup>[1]</sup>。

(3) 采用了 CCD 相机的荧光显微镜 这种探测装置与以上的扫描方法都是基于荧光显微镜,但是以 CCD 相机作为信号接收器而不是光电倍增管,因而无须扫描传动平台。由于不是逐点激发探测,因而激发光照射光场为整个芯片区域,由 CCD 相机获得整个 DNA 芯片的杂交谱型。这种方法一般不采用激光器作为激发光源,由于激光束光强的高斯分布,会使得光场光强度分布不均,而荧光信号的强度与激发光的强度密切相关,因而不利于信号采集的线性响应。为保证激发光匀场照射,有的学者使用高压汞灯经滤波片滤波,通过传统的光学物镜将激发光投射到芯片上,照明面积可通过更换物镜来调整<sup>[13]</sup>;也有的研究者使用大功率弧形探照灯作为光源,使用光纤束与透镜结合传输激发光,并与芯片表面呈 50°角入射<sup>[25]</sup>。由于采用了 CCD 相机,因而大大提高了获取荧光图像的速度,曝光时间可缩短至零点几秒至十几秒。

(4) 光纤传感器<sup>[26]</sup> 有的研究者将 DNA 芯片直接做在光纤束的切面上(远端),光纤束的另

一端(近端)经特制的耦合装置耦合到荧光显微镜中。光纤束由 7 根单模光纤组成。每根光纤的直径为 200 $\mu$ m,两端均经化学方法抛光清洁。化学方法合成的寡核苷酸探针共价结合于每根光纤的远端组成寡核苷酸阵列。将光纤远端浸入到荧光标记的靶分子溶液中与靶分子杂交,通过光纤束传导来自荧光显微镜的激光(490nm),激发荧光标记物产生荧光,仍用光纤束传导荧光信号返回到荧光显微镜,由 CCD 相机接收。每根光纤单独作用互不干扰,而溶液中的荧光信号基本不会传播到光纤中,杂交到光纤远端的靶分子可在 90%的甲酰胺(formamide)和 TE 缓冲液中浸泡 10 秒钟去除,进而反复使用。这种方法快速、便捷,可实时检测 DNA 微阵列杂交情况而且具有较高的灵敏度,但由于光纤束所含光纤数目有限,因而不便于制备大规模 DNA 芯片,有一定的应用局限性。

需要指出的是,以上这几种探测方法都是基于照明入射式荧光显微镜的,因而激发光光路与荧光信号光路有部分重叠,因而二向色性反射镜(dichroic mirror)或二向色性分束器(chromultic beam splitter)是不可缺少的元件,用以反射激发光的同时,使荧光信号透射至探测装置。由于荧光显微镜可选择性激发和探测荧光信号,因而,在实际应用中,可用 DNA 芯片探测两种以上荧光标记物标记的混合样品,这在第一型 DNA 芯片中尤为重要。有的研究者使氩离子激光器工作在多谱线模式上,或者通过更换滤波片分别检测不同的荧光杂交信号<sup>[5]</sup>,或者使用双波带滤波片产生双波长激发光,同时使用二向色分光镜将荧光光束分为两路,由两个光电倍增管分别接收,然后送入微机综合分析<sup>[11]</sup>。也有的研究者如莫斯科的 Yershov 等人使用高压汞灯,由于高压汞灯可产生 366nm、405nm、436nm、546nm 和 578nm 五条谱线,结合滤波片选择合适的波长激发不同的荧光标记物,并使用相匹配的滤波片分别选择不同的荧光信号<sup>[13]</sup>。在他们所使用的装置中两套不同的滤波片可迅速更换,并且他们还设想进一步在此基础上构造一种四波长的荧光显微镜。使用多波长的荧光探测系统不仅提高了 DNA 芯片的工作能力和工作效率,同时扩大了其应用范围。

## 2 生物素标记方法中的杂交信号探测

以生物素(biotin)标记样品的方法由来已久,通常都要联合使用其它大分子与抗生物素的结合物

(如结合化学发光底物酶、荧光素等),再利用所结合大分子的特殊性质得到最初的杂交信号,由于所选用的与抗生物素结合的分子种类繁多,因而检测方法也更趋多样化。特别是如果采用尼龙膜作为固相支持物,直接以荧光标记的探针用于 DNA 芯片杂交将受到很大的限制,因为在尼龙膜上荧光标记信号信噪比较低<sup>[27]</sup>。因而使用尼龙膜作为固相支持物的这些研究者大多是采用生物素标记的。

按照与抗生物素结合的不同分子主要分为以下三类。

(1) 荧光素结合物 使用这种方法的研究者一般所选用的固相支持物多为载波片。当生物素标记的靶分子与 DNA 芯片杂交并经缓冲液清洗后,用抗生物素-异硫氰酸盐(FITC)或抗生物素-藻红蛋白等抗生物素-荧光携带物进行染色。由于抗生物素与生物素结合的作用使荧光携带物定位于 DNA 芯片上发生杂交的位点,由此便可通过前面所述荧光标记杂交信号检测方法检测。有些研究者联合使用荧光素直接标记方法,可得到多波长的荧光杂交信号图谱。

(2) 化学发光底物酶结合物 许多研究者采用抗生物素-化学发光底物酶(如抗生蛋白链霉素/streptavidin-alkaline phosphatase 等)结合物的方法。化学发光底物可选用鲁米诺(Lumino)和 1,2-dioxetane 等,相应的酶为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)和碱性磷酸酯酶(Alkaline phosphatase)等。生物素标记的样品与芯片杂交并清洗之后,通过抗生物素与生物素结合,将化学发光底物酶-抗生物素结合物结合于杂交部位。随即在芯片表面均匀喷涂化学发光底物,由于杂交部位含有化学发光底物酶可激活化学发光底物发光,便可通过探测化学发光束得知芯片上分子杂交情况。曾有研究者使用传统的探测方法,即 X 射线胶片直接曝光,这种方法虽然简便,但由于化学发光光强较弱,因而不适合高密度的 DNA 芯片<sup>[22]</sup>。因而许多学者将探测方法加以改进,并取得较好的效果。

Nguyen 等人设计了一种光激发磷光物质屏(CH screen)存储的方法探测化学发光取代 X 射线胶片<sup>[28]</sup>。其机理是利用光激发可使磷光物质中低能级电子激发至较高能级稳态,这样便可将化学发光信号存储于磷光物质中,再用红外激光诱导磷光物质使较高能级稳态电子返回基态发出可见光。CH 屏是有由铝基板上包覆混合有铈和钐的磷光物质硫化铽制成,由于这种磷光物质具有吸湿性而失

去活性,因而再铺上一层聚酯薄膜。当按照前面所述方法将 DNA 芯片与靶分子杂交并经化学发光底物处理后,立即将 CH 屏覆盖在 DNA 芯片上曝光一个多小时,然后将 CH 屏在红外脉冲激光扫描装置上扫描。由半导体激光器产生的 910nm 的激光由光纤传导至扫描探头上,并聚焦在 CH 屏上,产生直径为 100 $\mu$ m 的光斑。磷光物质受激产生 500nm 的可见光,被连接于扫描探头上的光纤维束收集,经滤波后传入光电倍增管送计算机处理。计算机控制传动臂使探头以 50 $\mu$ m 步长在 x-y 平面上扫描,分辨率可达 100 $\mu$ m。这种装置与激光扫描荧光显微镜结构上非常相似,也具有较高的灵敏度和分辨率,并且具有非常好的线性响应( $\pm 1.32\%$ )和信噪比。比 X 胶片曝光检测化学发光杂交信号的方法有了很大改进。

Elmar Maier 等人设计了一种以荧光底物 Attophos<sup>TM</sup>代替化学发光底物的方法<sup>[27]</sup>。Attophos<sup>TM</sup>在化学发光底物酶催化下,受激发射荧光可被显著放大(激发光 420nm,发射荧光 560nm)。其发光强度较高,因而可适用于高密度 DNA 芯片中。其方法与前面所述方法类似,只是在最后一步以 Attophos<sup>TM</sup>代替化学发光底物,喷涂在 DNA 芯片上,然后将其置于标准的 302nm 或 365nm 紫外平台上,由紫外光激发 Attophos<sup>TM</sup>产生荧光,并经 550nm 的截止型滤波片滤波后,用宝丽来胶片曝光 0.5 秒,由于结合有化学发光底物酶的部位发光较强,可被探测,而其它部位光强较弱,几乎不能被探测到。这种方法虽有很大改进,但其线性响应不是很好,他们进而还想设计一种结合 CCD 相机或扫描探测的装置,以提高这种方法的自动化程度。

(3) 光散射法 Stimpson 等人设计了一种较独特的光散射法<sup>[10]</sup>。在这种方法中使用抗生物素-硒结合物,利用隐失波场中粒子的光散射来探测杂交信号。其方法是在光波导载波片上制成 DNA 芯片,将光波导载波片与另一块载波片叠放在一起,中间形成 175 $\mu$ m 厚、2.54cm 宽的通道,在此通道中含有生物素标记的 DNA 和抗生物素-硒结合物的溶液,可与 DNA 芯片杂交,抗生物素与生物素结合,使硒粒子聚集在 DNA 芯片上的杂交部位。以 150W 灯光经狭缝照射光波导边缘,光线在波导内以全反射方式传播,在溶液中距波导载波片表面 100~300nm 范围内形成隐失波场,而波导表面上聚集的硒粒子可在隐失波场中产生光散射,由 CCD 相机记录下散射光信号的图样,送计算机分析处理。

因为隐失波无法传播到远处,因而在图象中未杂交部位形成暗背景,而杂交部位因光散射而形成亮点。这种方法可实时探测 DNA 芯片的杂交情况,无须杂交后的清洗步骤,因而大大提高了检测速度,而且装置简单,方法便捷。

## 结语

从以上分析可以看出,DNA 芯片的制作方法和杂交信号的检测方法多种多样,各具千秋,DNA 芯片还将朝着更高密度,更大规模的方向发展,近期内可望达到  $1\mu\text{m}$  水平分辨率<sup>[1]</sup>。理论上前面所述许多检测方法可以比较容易获得这一水平分辨率。但目前 DNA 芯片技术还存在一些问题,如寡核苷酸存在高级结构和自身配对,会影响分子杂交;大规模制备中错误的核苷酸和杂质的掺入都会造成错误的分析。尽管如此,DNA 芯片技术的发展和前景仍是很乐观的,并会在生命科学领域取得丰硕的成果。

## 参考文献

- [ 1 ] Editorial. . Nature Genetics ,1996 ,14(4) :367 - 370.
- [ 2 ] Fodor S P A ,Read J L ,et al. Science ,1991 ,251 :767 - 773.
- [ 3 ] Fodor S P A ,Rava R P ,et al. Science ,1993 ,364 :555 - 556.
- [ 4 ] 安海谦,卢圣栋.《生物工程进展》et al. 1998 ,18(2) :37 - 40.
- [ 5 ] Hacia J G,Brody L C ,et al. Nature genetics ,1996 ,14 :441 - 447.
- [ 6 ] Hacia J G ,et al. Nature genetics ,1998 ,18 :155 - 158.
- [ 7 ] Heller R A ,et al. Proc. Natl. sci. USA ,1997 ,94 :2150 - 2155.
- [ 8 ] Lashkari D A ,et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1997 ,94 :13057 - 13062.
- [ 9 ] Ramsay G. Nature Biotechnology ,1998 ,16 :40 - 48.

- [10] Stimpson D L ,Hoijer J V ,et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1995 ,92 :9379 - 6383.
- [11] Shalon D ,Smith S J ,et al. Genome Research ,1996 ,6 :639 - 645.
- [12] Lockhart D J ,et al. Nature biotechnology ,1996 ,14 :1675 - 1680.
- [13] Yershov G ,et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1996 ,93 :4913 - 4918.
- [14] Graham C R ,Leslie D ,et al. Biosen. Bioelectron ,1992 ,7 :487 - 493.
- [15] Strachan N J C ,et al. App. Microbiol ,1995 ,21 :5 - 9.
- [16] Watts H J ,Yeung D ,et al. Anal. Chem. 1995 ,67 :4283 - 4289.
- [17] Piuino P A E ,Krull U J ,et al. Anal. Chim. Acta ,1994 ,288 :205 - 214.
- [18] Yamaguchi S ,shimomura T. Anal. Chem. ,1993 ,65 :1925 - 1927.
- [19] Millan K M ,Saraullo A ,et al. Anal. Chem. ,1994 ,66 :2943 - 294.
- [20] Pandey P C ,et al. Anal. Chem. 1994 ,66 :1236 - 1241.
- [21] Hashimoto K ,Ito K ,and Ishimori Y. Anal. Chim. Acta ,1994 ,286 :219 - 224.
- [22] Zhang Y ,Coyne M ,et al. Nucleic Acids Research ,1991 ,19 (14) :1929 - 3933.
- [23] Kumke M U ,Li G ,et al. Anal. Chem. ,1995 ,67 :3945 - 3951.
- [24] Guo Z ,Guifoyle R A ,et al. Nuc. acids. Res. ,1994 ,22 :5456 - 5465.
- [25] Matson R M ,Rampal J ,et al. Anal. Biochem ,1995 ,224 :110 - 116.
- [26] Feguson J A ,Boles T C ,et al. Nature biotechnology ,1996 ,14 :1681 - 1684.
- [27] Maier E ,Crollius H R ,Lehrach H. Nucleic Acids Reserach ,1994 ,22(16) :3423 - 3424.
- [28] Nguyen Q ,et al. Biochem. ,1995 ,226 :59 - 67.
- [29] Schena M ,Shalon D ,et al. Science ,1995 .270 :467 - 468.

## DNA Chip :Principle of Fabrication and Detection of Hybridization Signals

Zhang Tianhao Zhang Chunping Zhang Guangyin

(Nankai university ,Photonic center ,Tianjin 300071)

Chen Ruiyang

(Nakai university ,Institute of life sciences ,Tianjin 300071)

**Abstract** The making methods and the detection of hybridization signal are reviewed. According to the structures ,DNA chip can be divided into two variants ,DNA array and oligonucleotide microchip. DNA chips are fabricated either by in situ light-directed combinatorial synthesis or by conventional synthesis followed by Drootically printing on solid substrates. Sample DNA or labeled probes are hybridized to the chips ,and the sequence information or the gene expression is analysed by detecting the hybridization signal pattern. Along with

(下转第 75 页)

influenza viruses are divided into three types: A, B, and C. Influenza A is responsible for the epidemics and infects not only man but also pigs, horses, seals and a large variety of birds. The symptoms of influenza are due to viral destruction of the cells lining the upper respiratory tract, trachea, and bronchi. The symptoms begin suddenly and include malaise, fever, chills, headache, muscle aches, and a feeling of weariness. Acute illness rapidly progresses to a period of prostration lasting 3 to 5 days, characterized by sore throat, dry cough, and some nasal obstruction. Influenza is self-limiting, and most people fully recover and protected by antibody against reinfection by the same strain of virus. Many people die resulting from damage to the mucociliary defenses. Fatal cases are usually associated with secondary bacterial pneumonia. Most of these people were over 65 years old or suffered from heart or kidney disease, diabetes mellitus, severe anemia, or impaired immunologic defenses. During influenza pandemic, schools were closed, factories were shut down, offices were at a standstill, troops were paralysed, all hospital beds were filled with those ill from influenza. Elderly people and any person having a predisposing factor should receive annual vaccination against the prevalent strains of the influenza virus. The vaccine is up to 90 percent effective in reducing death rates when it is directed against the epidemic strain of virus. The disease can also be prevented by administering amantadine, a chemoprophylactic agent that prevents intracellular development of influenza A virus. The most dramatic influenza pandemic in history occurred in 1918-1919. In less than 2 months, more than 20 million people worldwide died of primary influenza, pneumonia, or secondary bacterial infection. Mortality was not limited to high-risk individuals, many of the deaths occurred in healthy people between 20 and 30 years of age. Part of these changes are due to antigenic drift, alterations caused by spontaneous mutation, producing minor changes in the antigenic structure of hemagglutinin. These new viral strains are therefore not recognized at all by the memory cells of the immune systems and establish a new pandemic. The antigenic shift that is responsible for creating these new strains is believed to occur by genetic reassortment of segments of the viral genome when two different strains of influenza viruses coinfect the same cell. The resulting recombinant virus possesses immunologically distinct surface determinants. This coinfection is thought to occur in pigs, ducks, and other animals that serve as reservoirs of the virus. Analysis of the virus's genetic structure, or nucleic acid sequences, supports the hypotheses that mammalian influenza viruses, including those infecting man, may well originate in aquatic birds.

**Key words** Influenza pandemic, Hemagglutinin, Neuraminidase, Antigenic drift, Antigenic shift, Vaccine.

---

(接第 68 页)

the development of DNA chip, new methods for sensitive detection of hybridization have also been developed using laser fluorescent scanner, laser confocal fluorescence scanning microscopy, epifluorescence microscope coupled with a CCD camera, fiber-optic biosensor, chemiluminescence, photoexcitable storage phosphor screen, light scattering.

**Key words** DNA chip, hybridization, signal detection