

# 微型全分析系统在肝功能荧光检测中的应用

邓国庆, 方晓东, 贺龙海, 朱志强 (中国科学院 安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 生物芯片中的微型全分析系统( $\mu$ -TAS)的研究和应用,近年有了很快的进展。本文对 $\mu$ -TAS技术做了简要的介绍,并对其在肝功能荧光标记检测方面的应用做了阐述。

**关键词:** 生物芯片; 微型全分析系统; 肝功能检测

**中图分类号:** R914.5; Q78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-202X(2005)04-0610-02

## Applications of $\mu$ -TAS in Liver Function Fluorescence Diagnosis

DENG Guo-qing, FANG Xiao-dong, HE Long-hai, ZHU Zhi-qiang

(Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Science, Hefei Anhui 230031, China)

**Abstract:** Micro total analytical system ( $\mu$ -TAS) of biological chip has made great progress in terms of research and applications in recent years. The technology of  $\mu$ -TAS was introduced briefly and its applications in liver function diagnosis based on fluorescence marker were elaborated.

**Key words:** biological chip; micro total analytical system ( $\mu$ -TAS); liver function diagnosis

### 前言

从80年代杂交测序(sequencing by hybridization, SBH)概念的提出,到1996年底美国加州AFFYMATRIS公司的Steven Fodor等人充分结合并灵活运用照相平板印刷、计算机、半导体、激光共聚焦扫描、寡核苷酸DNA合成、荧光标记探针杂交及分子生物学的其它技术,创造了世界上第一块基因芯片(DNA chip)<sup>[1]</sup>,并由此引发90年代以来的各种生物芯片的研制热潮。芯片技术在包括中国在内的众多国家得到了重视,获得了迅速发展。现阶段该技术的应用领域主要有基因表达谱分析、新基因发现、基因突变及多态性分析、基因组文库作图、疾病诊断、药物筛选、基因测序等。但到目前为止,研究开发出的系统依然对实验室规模和仪器设备的要求高、依赖性强,存在如芯片的特异性差、信号检测的灵敏度低、样品制备和标记操作的一体化性能欠佳等问题,使得这一技术作为实验室研究或临床普遍采用的常规方法仍有障碍。解决这些难题的一种方法是研究和开发高度集成化的综合样品制备标记及检测为一体的便携式生物医学分析系统,即所谓的微型全分析系统(micro total analytical system,  $\mu$ -TAS);或者更形象地称为缩微芯片实验室(laboratory on chip, LOC)<sup>[2,3]</sup>。这种新技术的出现代表了微加工技术(特别是过去40年中由半导体工业发展起来的现已较成熟的微加工技术)、有机化学、分子生物学和遗传学等学科完美的相互结合、相互渗透。

$\mu$ -TAS是生物芯片技术发展的趋势。它将样品制备、生化

反应以及检测分析的整个过程集约化形成微型分析系统。现在已有山加热器、微泵、微阀、微流量控制器、微电极、电子化学和电子发光探测器等组成的 $\mu$ -TAS问世,并出现了将生化反应、样品制备、检测和分析等部分集成的生物芯片。本文将对 $\mu$ -TAS技术做简要的介绍,并对其在肝功能荧光标记检测方面的应用做了阐述。

### 1 $\mu$ -TAS技术简介

#### 1.1 $\mu$ -TAS概念及发展历史

$\mu$ -TAS的概念最先是于80年代后期由瑞士Ciba-Geigy分析实验室的H. M. Widmer和A. Manz等提出。最初的想法是发展一种可把作一个化学分析所用的全部部件和操作过程集成在一起的微型器件,所以从这个意义上讲,可以把 $\mu$ -TAS看作是传统化学分析仪器的微型集成化,所以也称为缩微芯片实验室(laboratory on chip, LOC)<sup>[4]</sup>。Widmer和Manz把 $\mu$ -TAS看成是1950年开始的集成电路发展的一个合乎逻辑的结果,集成电路的经验被用于 $\mu$ -TAS中的微传感器、微传动部件和微流控器件的制造。而早期的 $\mu$ -TAS的很多工作是集中在其微结构中操作控制液微量体流向用的微型泵及阀上,第一个成功的 $\mu$ -TAS器件是借电渗流实现混合荧光染料样品注入和电泳分离单元。随着纳米技术(nanotechnology)和微电子机械系统(microelectromechanical system, MEMS)技术的研究发展,这种微型全分析系统近年来得到了快速发展。 $\mu$ -TAS芯片大小一般在厘米量级,采用nanotechnology和MEMS技术在基片通常是硅片、玻璃和有机聚合物塑料上制造出微驱动泵、微控制阀、反应通道、样品处理器、混合池、扩增器、反应器、分离器以及检测器等功能元器件,以实现微量样品的采样、稀释、添加试剂、混合、反应、分离、检测和后期处理等分析全过程,从而把传统

收稿日期:2004-12-20

作者简介:邓国庆,男,四川人,中国科学院安徽光学精密机械研究所博士。Tel:0551-5591543, E-mail:lerc@aiofm.ac.cn

的一个化学分析实验室的功能微缩到一个芯片中。一般  $\mu$ -TAS 系统由样品采集、微流控制、检测系统和微电子控制等四个子系统构成(参见图1)<sup>[5]</sup>。

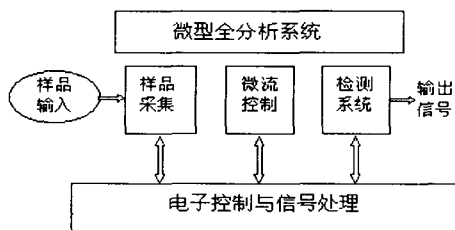


图1 微型全分析系统组成  
Fig.1 Elements of a micro total analytical system

### 1.2 $\mu$ -TAS 的应用

$\mu$ -TAS 主要应用领域是在生命科学,例如用于多聚酶链反应技术(PCR)和 PELP 切片、总 RNA、m-RNA 及许多蛋白质样品的分析;用于分子生物学的许多领域,如 PCR 反应的优化、DNA 阵列的性能优化、总 RNA 和 m-RNA 制备中的质量控制、生物化学中基因表达的研究、蛋白制备的质量控制、纯度监测;用于化学和生物战剂、环境污染物的监测等;在生物医学领域,则可以用于监控胎儿的健康状况、用于药物的输送以提高化疗的安全性;高速  $\mu$ -TAS 则是超高速开发药物的有用工具;还可以用于监控微妙量级的化学和生物化学反应动力学。当然这种微型芯片以用于许多合成反应的研究,这对组合化学研究来说无疑是一个极强有力的工具<sup>[6-8]</sup>。

## 2 荧光检测肝功能 $\mu$ -TAS 系统

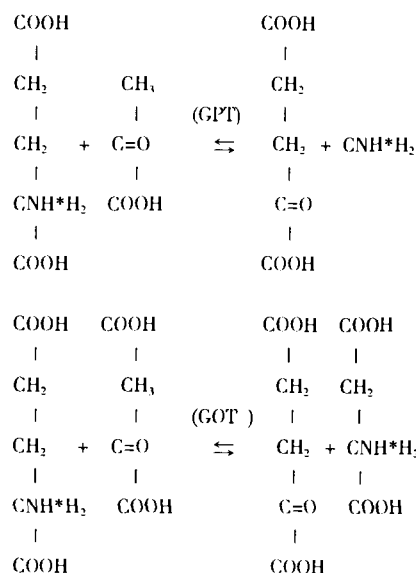
### 2.1 荧光分析原理

用一种短波长的光照射到某种物质时,这个物质会在极短的时间内,发射出比照射波长长的光,随着照射光的消失,这种发射光也随之消失,这种光即称为荧光。物质的大多数分子在室温时均处于基态的最低振动能级,当物质被光线照射时,该物质的分子吸收了和它所具有的特征频率相一致的光线,由原来的能级跃迁至第一电子激发态或第二电子激发态中各个不同的振动能级和转动能级,在这一过程中它们和同类分子或其它分子撞击而消耗了相当于这些能级之间的能量,因而不发光。由第一电子激发态的最低振动能级继续往下降落至基态的各个不同振动能级时,则以光的形式释放能量,所发出的光即是荧光。由于荧光的发生是从第一电子激发态的最低振动能级开始的,而和荧光物质分子被激发到哪一个能级无关,因此荧光光谱的形状和激发光的波长无关,实际取决于该物质基态中的能级分部情况。不论激励荧光谱还是发射荧光谱都直接同物质的分子结构相关,因此物质的荧光谱是物质分析的一个重要手段。

### 2.2 肝功能检测方法

根据中国卫生部最近两年公布的全国 25 种乙类传染病的发病和死亡报告情况,其中肝炎的发病与死亡数字都排在首位。此外,随着人们生活方式和饮食结构的变化,脂肪肝、酒精肝、药肝等其他肝脏疾病的发病率却在逐渐上升,成为严重威

胁人们生命健康的疾病。众所周知,肝脏具有合成、排泄和代谢转化功能。常规肝功能检查,一般为血清转氨酶、碱性磷酸酶、胆红素、凝血酶原时间等的常规试验,目的是探测肝病、鉴别黄疸和判断预后。在此基础上,根据临床需要,加用其他试验检测各种疾病标志,例如病毒性肝炎时,可检测相应的抗原、抗体以及病毒基因;肝细胞性肝癌时检测血清甲胎蛋白;原发性胆汁性肝硬化时检测线粒体抗体等。常规肝功能检查中,利用对血液中的活性酶、蛋白质、血脂和血糖等的含量及变化的检测来判断肝脏功能及肝病变。如检测项目和肝功能存在下列关系: GOT/GPT 出现及浓度—肝细胞损害,TTT/ALT—慢性肝炎, T. Bil—肝排泄功能(黄疸),ChE—肝合成功能, oGTT—耐糖功能, CEA, AFP—肝癌等。现在临床上应用的肝功能检查是通过对这些项目的生化检测,它需要在专门的分析室或类似的条件(如大型检测分析设备)下进行,检查结果要几小时到几周的时间才能得到。另外,检查用血液用量相对较多,需要到医院抽血。所以,采血、检测都需要专门的人员、地点或设备,时间和费用相对较高。我们提出可以将现在的生化方法进行的肝功能检查项目用激光荧光法进行,并将现在的检测方法的全过程集成到一块芯片上进行,最终实现一个临床肝功能检测的微型全分析系统。肝功能检测项目中活性酶的检测为主要内容,以促进代谢的转氨酶为例,其作用可由下列的典型实验方程表示:



作为反应介质的 GPT(ALT)丙氨酸转氨酶, GOT(AST)门冬氨酸转氨酶通常在血液中几乎不出现, 主要含于肝细胞内。肝细胞损伤变性时,肝内酶释放进血液,引起血清中转氨酶活力升高。只要有 1%的肝细胞破坏,其所释放的转氨酶即足以使血清中转氨酶水平升 1 倍。迄今,血清转氨酶测定仍被认为是反映肝细胞损害的标准试验。

通过实验用荧光方法对这些活性酶的存在及浓度进行检测,以肝功能中检测项目  $\gamma$ -GTP 酶为例,在血液和试剂的混合液中,由于  $\gamma$ -GTP 的存在和作用会生成 5 氨基 2 硝基安息香酸。这种物质在 405 nm 波长处有很强的光吸收峰,并发射出荧光,通过对其荧光光谱测量和定标可确定 5 氨基 2 硝基安息香酸浓度,再由 5 氨基 2 硝基安息香酸和  $\gamma$ -GTP 的对应关系可

## 参考文献:

- [1] 章玉珠,刘德立. 直流负高压静电液体灭菌技术研究[J]. 高电压技术, 2000,26(6):34-35.
- [2] 刘玉庆,张玉忠,颜世敬,等. 大肠杆菌和益生菌对抗生素和化学药物的敏感性试验[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003,34(2):181-184.
- [3] 罗跃辉,杨兰均,冯允平,等. 放电等离子体空气灭菌净化技术的研究[J]. 高电压技术, 2001,27(5):39-40.
- [4] 郭世宜,沈星灿. 纳米 TiO<sub>2</sub> 光催化杀灭大肠杆菌的超微结构研究[J]. 电子显微学报, 2004,23(2):107-111.
- [5] 段学峰,李刚, Matthias Groszer,等. 小鼠 pdd87 基因在大肠杆菌中

的表达与纯化[J]. 生物技术通讯, 2004,15(4):330-332.

- [6] 陈寅,朱中泽,张志芳,等. 大肠杆菌植酸酶基因 appA 的克隆与高效表达[J]. 微生物学通报, 2004,31(3):74-78.
- [7] 刘树铮. 低剂量辐射兴奋效应发生机理若干问题的探究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003,23(6):393-398.
- [8] 孙迎春,刘晓冬,杨秀兰,等. 高压芒刺静电场对小鼠胸腺细胞和腹腔巨噬细胞中 CD2 及 CD48 表达的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2004,21(6):334-336.
- [9] 孙迎春,严玲玮,金光辉,张羽,等. 高压芒刺静电场对肝癌细胞 SMMC7721 生长的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2005,22(1):391-392.

(上接第 611 页)

确定血液中  $\gamma$ -GTP 的浓度值。由于荧光分析法所需的血液量估算仅约为生化分析用量的 1/60~1/100, 可采用微型采血器直接从人体皮肤中采血。微型采血器的设计方案将采用现在的半导体集成电路工艺中光刻的方法, 在硅片上制作微米量级探针的阵列。采用 MEMS 技术在芯片基板按需要设计制造微型血液流路、微型泵等微流控制元件。采用激光诱导荧光的检测方法, 使肝功能检测从样品采集、血样分离混合、荧光测试和信号输出集成一体构成肝功能荧光检测的完整  $\mu$ -TAS 系统。

### 3 发展前景

生物芯片是近 10 年在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术, 而将样品制备、生化反应以及检测分析的整个过程集成后, 形成微型分析系统的全分析芯片实验室则是生物芯片发展的趋势。利用半导体光刻技术和 MEMS 技术研制微米量级采血器和结合激光诱导荧光光谱法(LIF)<sup>[9]</sup>对肝功能检测和定标技术, 在肝功能检测微型全分析系统芯片实验室中构建微型生物化学分析系统, 替代现有的常规肝功能检查程序(采血、血样处理和检测分析), 以实现对人体内的肝脏细胞组分进行准确、快速、大信息量的检测, 能对各项常规肝功能指标进行准确和快速检验。研制出用于临床乃至家庭的肝功能微型全分析系统芯片, 将对肝病的预防和治疗发挥重要作用, 同时对加速微型分析系统在中国的发展及其在临床上的应用具有重要价值。

## 参考文献:

- [1] Strachan, T. Abitbol, M. Davidson, et al. A new dimension for the human genome project: towards comprehensive expression maps [J]. Nature, 1997, 16:126-131.
- [2] S. J. Lee, S. Y. Lee. Micro total analysis system ( $\mu$ -TAS) in biotechnology [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64:289-299.
- [3] Albert van den Berg, T.S.J. Lammerink. Micro Total Analysis Systems: Microfluidic Aspects, Integration Concept and Applications [J]. Topics in Current Chemistry, 1997, 194:21-49.
- [4] JIN Qin-han. Development of micro-Total Analysis Systems Seen at P ITTCON 2001 [J]. Modern scientific, 2001, 4:7-10.
- [5] Huikko K, Kostainen R, Kotiaho T. Introduction to microanalytical systems bioanalytical and pharmaceutical applications [J]. Eur J Pharm Sci., 2003, 20:149-171.
- [6] Kopp MU, de Mello J, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip [J]. Science, 1998, 280:1046-1048.
- [7] Woolley AT, Mathes RA. Intra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:11348-11352.
- [8] Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device [J]. Anal Chem, 1996, 68:4081-4086.
- [9] Oleschuk RD, Harrison DJ. Analytical microdevices for mass spectrometry [J]. Trends Anal Chem, 2000, 19:379-388.

### 书讯

#### 21 世纪高等院校教材:《现代医学仪器设计原理》

邓亲恺主编 科学出版社 2004.5 定价:59.00 元

本书是由长期从事现代医学仪器研究、设计和教学的专家、教授编写的本科高年级学生和研究生用现代医学仪器设计教材。全书共十章, 重点讲述了四大类医学仪器(生理类、成像类、分析类、治疗类)的设计原理和方法, 以及新兴的虚拟医学仪器、便携式医学仪器和远程医学仪器设计的关键技术, 最后讲述了医学仪器的认证。本书是从事现代医学仪器教学和研究的大专院校师生的高级教材, 同时也是该领域广大科研人员、工程技术人员的一本案头参考书。全书共 82 万字, 大小插图 500 余幅。需要该书的朋友可在当地新华书店购买, 也可联系邮购(免运费), 联系人: 郭劲松; 020-85148278-3, 13660608810, guojis@fimmu.com; 卞辉勇; 020-85148278-4, 13711668988, ihy@fimmu.com。