

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2001年5月25日(25.05.2001)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 01/36667 A1

(51) 国际分类号: C12Q 1/68, 1/24, C12M 1/00

(21) 国际申请号: PCT/CN99/00192

(22) 国际申请日: 1999年11月16日(16.11.1999)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院检验科(MEDICAL LABORATORY CENTER OF SOUTH WESTERN HOSPITAL THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, Chongqing 400038 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 符伟灵(FU, Weiling) [CN/CN]; 汪江华(WANG, Jianghua) [CN/CN]; 刘明华(LIU, Minghua) [CN/CN]; 王颖莹(WANG, Yingying) [CN/CN]; 中国重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, Chongqing 400038 (CN)。

(74) 代理人: 沈阳市专利事务所(SHENYANG PATENT AGENCY); 中国辽宁省沈阳市西顺街66号 60 甲, Liaoning 110013 (CN)。

(81) 指定国(国家): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: COMBINATORIAL AND AUTOMATIC DETECTION METHOD OF TARGET GENE, AND A DETECTOR USING THE METHOD

(54) 发明名称: 组合靶基因自动检测方法及采用该方法的检测仪

(57) Abstract: The present invention is directed to a combinatorial and automatic detection method of target gene, and a detector based on the method. Quartz Crystal Microbalance (QCM) technology in conjunction with gene chip technology is mainly used in the present invention to detect DNA; in a specific method, microfabricating technology is used to etch super-thin quartz resonator array directly on a piezoelectric quartz crystal, then, a number of probes are immobilized, so, a number of DNA or RNA molecule can be detected and analyzed simultaneously. Compared with traditional nucleic acid blot hybridization technique which shortcoming is complex, low automatic degree, less target molecule to be detected; the automatic detection method of target gene and the detector according to present invention can detect in situ without label and obtain detecting information at any time, the detector itself is so small to be carried and can be used conveniently.



WO 01/36667 A1



(57) 摘要

本发明涉及的是一种组合靶基因自动检测方法，以及基于该方法而构造的检测仪；本发明主要应用了石英晶体微天平 QCM 技术并结合基因芯片技术来检测 DNA；具体的方法是利用微细加工技术直接在压电石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，然后固化大量的探针，所以一次可以对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析，从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少等不足；本发明所述的靶基因自动检测方法极其检测仪具备可原位测定、无需标记、随时可获得检测信息、体积较小、便于携带、使用方便、成本低廉等优点。

组合靶基因自动检测方法及采用该方法的检测仪

发明领域

本发明涉及的是一种组合靶基因自动检测方法，以及基于该方法而制造的检测仪。

背景技术

随着人类基因组计划的逐步实施以及分子生物学相关学科的迅猛发展，基因序列数据库正以前所未有的速度迅速增长。

然而，如何研究众多基因的生物信息及其在生命过程中所担负的功能成了本领域研究人员需要解决的课题，这就对大量的脱氧核糖核酸 DNA、核糖核酸 RNA 序列测定及其分析提出了准确快速的要求。

基因芯片又称 DNA 芯片或生物芯片的出现为解决此类课题提供了可能的解决办法。

发明目的

本发明的主要目的在于提供一种利用体外基因芯片技术对人类遗传病、肿瘤和传染性疾病进行基因诊断、基因分型以及法医学和环境分析的靶基因自动检测方法。

本发明的另一个目的是提供一种可供科研、临床使用的并基于上述方法而制造的检测仪。

简要说明

本发明所述的检测方法是利用微细加工技术直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列或单一的石英谐振器，然后在此基础上研制高灵敏、可原位杂交监测的微型石英谐振基因传感器芯片，建立起检测灵敏度与目前标记 DNA 探针技术相当的非标记基因传感器检测技术，同时由于基因传感器芯片上固定有大量的 DNA 探针阵列，因而可解决现有的基因检测技术只能检测少量基因信息的问题。

本发明所述的将压电基因传感器用于靶基因检测的基本工作原理是：将大量探针分子固定于镀有金或银膜层的石英晶体支持物上（晶体两侧通过银电极施加一定的电压），然后在反应池中与样品进行杂交。由于杂交与否会导致石英晶体谐振频率的改变，通过检测石英晶体谐振频率的变化值即可判断样品有无靶分子以及数量多少。

附图说明

针技术相当的非标记基因传感器检测技术，同时解决了现有基因检测技术只能检测少量基因信息的问题。

附图说明

下面是本发明的附图说明，通过下面的说明并结合以下的详细描述，可以更清楚地理解本发明的原理和构造，其中：

附图 1 是本发明所述的组合靶基因自动检测仪中采用的 DNA 芯片示意图；

附图 2 是附图 1 所述的芯片的 A-A 向剖视图；

附图 3 是本发明所述的组合靶基因自动检测方法中电极表面探针固定情况示意图；

附图 4 本发明所述的组合靶基因检测仪对 HPV 及 LT 检测结果示意图，其中，Y 轴是频率减少值，X 轴是时间；

附图 5 是本发明所述的组合靶基因自动检测方法的流程示意图；

附图 6 是本发明所述的组合靶基因自动检测仪的电路和各部件连接方式示意图。

下面是本发明上述附图的各部件的标号，其中，1 探针层，2 是上金（或银）膜层，3 是石英晶体，4 是下金（或银）膜层，5 基座，6 是银电极，7 是探针（或者称已知基因片断），8 是支撑物。

下面是对本发明所述检测方法和检测仪进行详细描述。

详细说明

本发明所述方法的特点是将基因芯片技术与压电传感器技术结合应用，构成独特的检测方法。

本发明是利用微细加工技术，直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，石英晶体谐振频率对晶体表面质量微细改变十分敏感，因而其质量检出限可达 pg 级。并且由于微细加工技术使石英谐振器阵列易于成批制备，可大大降低成本。

本发明所述方法或检测仪所采用的基本技术原理如下：

1、压电现象及压电原理

晶体受外界机械压力的作用，在其表面上产生电荷的现象，称为压电效应。

早在 1880 年，研究人员就发现石英等一些晶体的压电现象并指出，某些电介质物质，在沿一定方向受到外力的作用变形时，内部会产生极化现象，同时在其表面上产生电荷；当外力去掉以后，又重新回到不带电的状态；而且，晶体表面所形成的电荷和外加压力成正比，现有技术将这种机械能转变为电能的现象，称为“顺压电效应”。

相反，在电介质极化的方向上施加电场，它会产生机械变形；当去掉外加电场时，电介质的变形随之消失，这种将电能转变成机械能的现象，被称为“逆压电效应”；现有技术中将具有压电效应的电介质物质统称为压电材料。

比较常见的压电材料有石英、陶瓷等，其中石英因其良好的机械、电化学和温度等综合性能，成为压电传感，特别是压电化学和压电生物传感的主要元件。

石英是一种各向异性晶体，按不同方向切割晶体，其物理性质（如弹性、压电效应、温度特性等）相差很大。

本发明的研究人员发现，当交变激励电压施加于压电晶体两侧的电极时，晶体会产生机械变形振荡，当交变电压频率达到晶体固有频率时，振幅加大，形成压电谐振，此特定频率称为谐振频率。

依据压电传感的敏感机理，用压电晶体为谐振结构，可以发现其输出信号（谐振频率）与晶体的物理尺寸和性质密切相关。

人们还观察到：当晶体被涂上薄层物质以后，其振荡频率会发生相应变化。

Sauerbrey 通过 AT 切割石英晶体在气相中振动首先推导出来有关晶体表面所载物质质量与谐振频移的关系式（2—1），并以此为依据提出将压电晶体用做灵敏的微天平，故此式常称为 Sauerbrey 方程。

$$\Delta F = -2 \times \frac{F_q^2}{\sqrt{\mu_q \rho_q}} \times \frac{\Delta m}{A} \quad (2-1)$$

ΔF : 由涂层引起的频率变化值(Hz).

$$F_q: \text{基本响应频率.} \quad F_q = \frac{v}{2t_q} = \frac{1}{2t_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}}$$

v : 声波在空气中的传播速度.

t_q : 石英的厚度(cm).

μ_q : AT-cut 石英的剪切模数 ($2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$).

ρ_q : 石英的密度 ($2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Δm : 石英晶片的表面的涂层质量(g).

A : 石英晶片的表面积 (cm^2).

(注意: Δm 是石英晶片两面的涂层总质量, A 是石英晶片的一面的表面积.)

对于 AT 切割的石英晶体，其剪切模数 ($\mu_q = 2.95 \times 10^{11} \text{ dyn/cm}^2$) 和密度 ($\rho_q = 2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) 都是定值，将 μ_q 和 ρ_q 的值代入(2—1)式得到：

$$\Delta F = -2.26 \times 10^{-6} \times \frac{F_q^2}{A} \times \Delta m \quad (2-2)$$

以上两式导出的前提是假定石英晶片上均匀沉积的涂层薄膜等效于增加同样质量的一层石英。即要求薄膜与石英是刚性结合的，也就是说电极表面上的质量在晶体振荡时不经受任何剪切形变，这样便可忽略膜层对于石英晶体密度和弹性的差异。

从 Sauerbrey 等式可以看出，石英晶片在气相中振荡时， Δf 与 Δm 呈简单的线性关系，因此石英晶片可用来做非常敏感的质量检测器，其检测限可以达到 ng 级，甚至 pg 级水平。不过，已经有人证实：将 Sauerbrey 等式应用于“刚性”涂

层的研究时, $\Delta m/m$ 应该小于等于 2% (m 是未被沉积前单位面积石英的质量)。

2、晶体液相振荡理论

由于压电传感器均是通过测量振荡频率的变化来获取所需的信息, 因而对在液相中振荡的晶体, 首先遇到并必需了解的两个问题是: ①影响晶体振荡活性(活力)的因素有哪些, 或者说晶体在不同性质溶液中的振荡区间由什么决定; ②溶液性质对晶体振荡频率影响如何。只有解决了这两个问题, 才能使晶体振荡(应用)体系拓宽, 也才能准确地根据晶体振荡频率变化来获取质量传感的信息。

近年来, 随着石英晶体液相振荡获得成功, 人们对石英晶体液相振荡特性的认识越来越深入。石英晶体的应用范围也得到拓宽, 特别是在生物学中的应用。研究人员发现, 在液相中, 石英晶体微天平不仅对质量敏感, 而且会受到外界温度、气压、磁场起伏、冲击震荡、和液体密度、粘度、介电常数、电导、以及流过晶体的激励电流起伏等因素的影响。

已经有很多人在液体环境中进行了将压电石英晶体响应器做为检测器的研究, 这些研究证实, 质量负载和粘性耦合是导致压电石英晶体频率变化的两个主要作用机理。

现有技术表明, 在对压电石英晶体二端施加电压后, 被施压的压电石英晶体频率是固定的, 本发明的研究人员在此基础上, 在压电晶体上固定探针, 这样就会导致整体频率的变化, 但是, 变化后的频率仍然是固定值; 但是, 由于外界因素会造成频率漂移, 因此, 本发明采取了以下措施, 即设置一参比检测, 如果单块晶体上只固化一个探针, 那么就配备一个固化了同样探针的晶体作为参比检测, 如果在同一块晶体通过刻蚀方法得到超薄石英谐振器阵列, 就在该阵列选择固化同样探针的其中一个作为参比检测, 这样就可以获得稳定的基准频率和真实可靠的实验结果。

而所固化的不同探针带来的石英晶体的频率的变化是可以通过现有技术很容易检测到的。

3、杂交原理简介

Watson 和 Crick 等人于 1953 年提出了 DNA 的双螺旋结构模型的概念。他们指出:

(1) DNA 分子是由两条方向相反的平行多核苷酸链构成的, 这两条链在化学上具有相反方向。即.....P—5'—核糖—3'—P.....的结构与.....P—3'—核糖—5'—P.....的结构相对。

(2) 碱基成对有一定规律: Chargaff 等应用层析法对多种生物 DNA 的碱基组成进行分析, 发现 DNA 中腺嘌呤数目(A)与胸腺嘧啶(T)的数目相等, 胞嘧啶(C)的数目与鸟嘌呤(G)数目相等。因此, 在 DNA 中有四种可能的碱基对: A—T、T—A、G—C、C—G。

(3) 两条链主要由碱基间的氢键相连: 碱基对的平面穿过螺旋轴, 约与螺旋轴垂直。AT 间可形成两条氢键, GC 间可形成三条氢键。同时, 对于 DNA 双

螺旋的结构稳定而言，还需借助疏水键的作用力。

(4) 由于四种碱基对都适合此模型，每条链可以有任意的碱基顺序，但由于碱基成对的规律性，如一条链的碱基顺序已确定，则另一条链必有相对应的碱基顺序。

由于 DNA 双螺旋结构主要靠氢键和疏水键维系，因此加热、酸碱、有机溶剂等凡是能破坏氢键和疏水键的因素都能引起变性，使 DNA 的双螺旋结构变为无规则线团。不同变性 DNA 片段之间，通过碱基互补配对进行的“复性”称为杂交。杂交不仅可以发生在 DNA 与 DNA 链间，也可在 DNA 与 RNA 链的同源序列之间进行。杂交过程中两条互补的单链 DNA 以非共价键方式形成双键杂合体。当其中一条链的序列已知时，通过检测杂交过程，就可以探明未知 DNA 样品中是否含有与已知序列互补的 DNA 存在。

虽然长链 DNA 分子不是刚性的，而且每个核苷酸残基都有 6 个可以自由旋转的单链，使 DNA 双螺旋可能以不同的构象形式存在；但是干燥状况下的短链 DNA 分子仍然具有一定的刚性，而且固定在电极上的寡核苷酸的空间距离很小；由于固定后的 DNA 在晶片上是成膜的，加上固定的寡核苷酸探针的质量相对晶体自身质量而言非常小，因此能够满足本发明的要求。

本发明所述的将压电基因传感器用于靶基因检测的基本工作原理是：在某个固体支持物上固定一段基因，具体地讲，所述的固定支持物可以是压电石英晶体，在压电石英晶体的二端通过银电极施加电压，从而得到一固定的频率，然后利用其在溶液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，杂交过程的质量负载和粘性耦合的变化通过导致石英压电晶体的频率变化，将该频率的变化值通过分析就可以得出是否杂交以及杂交的数量，从而实现了液相中具体的 DNA 的检测。已知基因片断在支持物上的固定情况如图 3 所示。

4、现有技术的发展概况

近年来，国内外有关基因传感器(也称为 DNA 和核酸生物传感器)的研究正成为生物传感器技术的研究热点，基因传感器以其简易、快捷、价廉的独特优越性，在分子生物学、医学检验和环境监测等领域具有广泛的应用前景，除基因序列分析、基因突变、基因检测和诊断外，还涉及 DNA 与药物、蛋白质分子间相互作用的研究等。

互补 DNA 的可逆杂交是复制、转录、翻译等生物过程的基础，核酸杂交对在分子水平上理解这些重要的生物过程是必不可少的。

当前，基因分析方法主要是在非均相体系中检测具体 DNA 的序列，比较常用的方法是核酸杂交法，核酸杂交是两条互补单链 DNA 以非共价键方式形成双键杂合体的过程，当其中一条链的序列已知时，这是一种非常有用的分析技术，通过检测杂交过程，可以探明未知 DNA 样品中是否含有与已知序列互补的 DNA 存在，最常用的方法是在某个固体支持物上固定一段已知序列的基因，然后利用其在溶

液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，从而实现液相中具体 DNA 的检测。

近年来，人们对通过杂交方法来检测液相中具体 DNA 序列的研究越来越深入，通过杂交法检测 DNA 序列有很重要的应用价值，主要应用在：临床基因诊断、法医学、食品、生物化学、环境保护等领域，而且基因的检测方法也因生物素、地高辛、荧光染料等非放射性标记物的应用而变得更加方便和安全，特别是多聚酶链反应 PCR 技术的应用，使得基因检测更加灵敏。

传统的 DNA 杂交反应都要求使用标记方法来检测杂交信号，这些方法允许原位检测，而且可以灵敏度很高。如：PCR 技术的检测限能达到 nmol/l；DNA 计算机技术也提供了从大量混合体系中检测某一具体 DNA 序列的方法；由于短波荧光和共聚焦显微镜技术的应用，荧光标记法已经成为检测微量 DNA 非常灵敏的常用方法。但这些方法也具有一定的不足：①探针标记和修饰价格昂贵、操作烦琐；②标记探针的前、后处理复杂；③很难准确获得杂交过程中的绝对数量及杂交耗时等定量信息；④杂交时间长，往往需要几个小时，甚至几天；⑤往往需要特殊的试验设备和条件；⑥对操作人员的技术要求很高，不易掌握。也有不少研究者应用 SPR 方法来实现液相标记和未标记 DNA 杂交的定量和原位监测，但该方法存在仪器昂贵、定量不准确等缺点。

近来，越来越多的研究者开始应用非标记方法检测基因序列。研究较多的是 DNA 生物传感器系统，它通过杂交方法检测和识别 DNA 序列，并能进行 DNA 定量研究，这种检测方法操作简单、费时较少，而且不需要信号分子便可以直接进行定量分析。它不仅可用于 DNA 序列、基因点突变的测定，更重要的是能动态、定量地监测杂交反应的进行，不需要清洗电极、不需要干燥，在液相状态下便可直接获取杂交信息。DNA 生物传感器将一个经过修饰的 DNA 探针固定在一个转换单元上，该转换单元再将物理或化学信号转变成电信号。根据选用介质和换能器的不同，DNA 生物传感器可以分为电化学、光学、和压电晶体传感器等几大类。

在本发明中，研究人员主要应用了石英晶体微天平 QCM (Quartz Crystal Microbalance) 技术即压电传感器技术并结合基因芯片技术来检测 DNA，并比较了不同固定方法对传感器响应时间、杂交效率等情况的影响。

为了更清楚地说明本发明的创造性所在，申请人在此对现有技术对基因传感器研究进展作出如下的描述：

A、光学基因传感器

目前主要有荧光光纤基因传感器、表面增强拉曼基因探针和表面等离子体共振基因传感器三类。

Henke 等通过溴化乙啶杂交指示剂和全内反射荧光法测定光纤表面的杂交反应，研究了荧光光纤 DNA 传感器的制备，并借助散射法以及 UV-UIS 光谱法比较了光纤表面单链 DNA 的两种固定化方法，结果表明寡核苷酸难以直接固定在表面疏水连接剂在的氨基端上，但用酰胺偶连反应则能成功固定。Uddion 等采用 DNA 合成仪，直接在经连接剂处理后的石英光纤表面合成寡核苷酸，利用杂交形成的

dsDNA 嵌入溴化乙啶研制了荧光检测的光纤 DNA 传感器,用于检测三螺旋 DNA 的形成。Abel 等^[6]研制了自动光学 DNA 传感器系统,其原理是用亲和素或链霉亲和素将生物素标记探针固定在光纤表面,利用石英光纤损耗场的荧光激发和检测,实现探针与荧光素标记互补链杂交的现场监测,灵敏度可达 132 pmol。与荧光检测相比,表面增强拉曼检测具有更高的灵敏度。因此利用表面增强拉曼(SERS)试剂修饰制备的基因探针,可无需放大直接用于基因检测。Graham 等报道了灵敏度达 0.8 pmol 的 SERS 基因探针。Isola 等将具有光谱选择性和高灵敏度的 SERS 技术与 PCR 技术结合,应用于 HIV-Gag 基因的检测。虽然 SERS 技术所需设备较昂贵复杂,但基于其极小的光谱带宽(半峰宽<1nm),可望实现在一个芯片上用多个 SERS 基因探针同时检测多个靶基因,而这是一般光学检测技术(如荧光检测的半峰宽为 50-100nm)所难以作到的。

表面等离子体共振(SPR)基因传感器基于 SPR 对传感器表面变化的敏感,无需杂交指示剂也不用对 DNA 标记,直接现场监测杂交过程。Peterlinz 等报道用两色 SPR 谱实现 DNA 杂交的非标记现场定量检测,并由此跟踪研究了杂交以及热致变性过程的动力学。Corn 和 Smith 研究室报道将扫描 SPR 测量和显微 SPR 技术联用,用以表征金膜表面 DNA 杂交吸附及其与链霉亲和素的结合,并借助生物素-链霉亲和素作用形成链霉亲和素/DNA 多分子层,来放大探针杂交的 SPR 信号。同时,该研究室在金膜表面构建了 2×2 寡核苷酸探针(探针斑点直径约 2.0mm)的阵列,用现场显微 SPR 技术同时检测多 DNA 杂交。该研究初步表明了用 SPR 技术进行 DNA 芯片检测的可行性。

B、电化学基因传感器

通常制作的电化学基因传感器由于精度和重线性差,难以实用推广。因此,目前研究主要是利用易于进行大批量制作的微细加工技术,研制可望实现一次性使用的电化学基因传感器。Wang 实验室利用丝网印刷技术,研制了系列微型 DNA 厚膜碳电极,其应用包括基于杂交法检测核酸序列、通过药物和农药嵌入 dsDNA 或对核碱基氧化信号的影响测定这些小分子、以及超微量核酸的直接吸附溶出伏安法测定,同时该实验室提出了用高灵敏的恒电流溶出计时电位法来检测 DNA 的杂交识别;测定的 DNA 序列有 M.Tuberculosis、HIV-I、E.Coli、Protozoan cryptosporidium parvum 等。Hashimoto 等利用光刻微细加工技术,刻蚀出直径 0.3mm 的固定 DNA 探针的微金膜电极,可一次性使用,并以电活性物 Hoechst 33258 作杂交指示剂,检测了病人血清 HBV-DNA 的浓度。Singhal 和 Kuhr 利用在铜表面核糖和氨基的电催化氧化,提出了与目前利用腺嘌呤和鸟嘌呤核碱基氧化检测不同的 DNA 电化学传感器。由于所有核苷酸和 DNA 分子都含有核糖和氨基,因此,该类传感器可适于各类核苷酸的测定。

除上述基因探测外,电化学基因传感器的另一重要应用是对基因突变和损伤的检测。国内孙星炎等利用 ssDNA 共价固定在石墨电极表面,以道诺霉素(DRN)为杂交指示剂,使电极表面的 ssDNA 与溶液中互补的 ssDNA 杂交形成 dsDNA,

具有电化学生活性的 DRN 在杂交过程中嵌入 DNA 双螺旋结构中, 形成 DNA 电化学生感器, 根据在紫外光照射、亚硝酸的作用下能否杂交及杂交程度的差异, 检测 DNA 结构的变异, 并初步探讨了上述两种因素引起 DNA 损伤的程度和可能的突变机理。此前, Wang 等则直接用固定 dsDNA 的微型电化学生感器, 基于 DNA 中鸟嘌呤的氧化信号变化探讨了紫外光辐射引起的 DNA 损伤, 包括 DNA 的构象变化及其鸟嘌呤的光致化学反应。

C、压电基因传感器

压电基因传感器是基于体声波器件-压电石英谐振器对其表面质量变化的敏感(质量灵敏度可达 ng 级), 无须杂交指示剂直接检测传感器表面的 DNA 杂交反应, 此类传感器也有称为体声波和石英(晶体)微/纳天平 DNA 传感器。在传感器 DNA 探针固定化方法的研究中, Nicolili 等用 LB 膜技术在石英谐振器上沉积得到与脂肪胺混合的 ssDNA 的单分子层, 有很好的杂交反应活性; Fawcett 等在传感器表面分别用疏水性的聚苯烯、聚乙烯和丙烯酸的共聚物交联固定探针, 初步探讨了高分子在研制 DNA 传感器中的应用。由于生物大分子易在亲水性表面吸附, 为使探针活性达到最大, 同时降低非特异性的吸附, 应尽可能减弱传感器表面除探针位点外的生物亲和性, 在疏水性高分子表面接上反应位点可能成为杂交型 DNA 传感器的理想表面。

过去压电基因传感器多是比较杂交前后传感器干燥表面的质量变化进行检测, 随着液相压电传感器技术的成熟, 通过现场监测杂交过程, 使压电基因传感器更为简便和快捷; 同时也可进行表面杂交过程动力学研究, 为基因传感器的优化提供依据。这方面率先开展研究的是 Okahato 实验室, 他们测定了 10 到 30-mer 寡核苷酸双链互补结合的平衡常数、结合及离解的速度常数等动力学参数以及表面的杂交结合量; 并通过改变探针的固定方法、探针和靶基因的长度、错配的碱基数、杂交温度、杂交液离子强度等因素, 详细研究了传感器表面杂交过程动力学特性。

与放射性同位素等物质标记核酸的杂交检测技术相比, 基因传感器的灵敏度还有较大差距。除进一步提高传感器本身的检测灵敏度外, 国内陈誉华等以单纯疱疹病毒和人细胞内质网分子伴侣 Grp94 基因组为例, 首次尝试了引物链延伸反应性压电基因传感器的研制。其原理是利用 DNA 序列分析中的引物-模板杂交后引物链的延伸反应, 使杂交后短链探针以靶基因为模板逐步延伸, 从而导致表面更大的质量增加, 灵敏度得以提高。另外, Wang 等利用肽核酸(PNA)探针, 实现了单碱基错配的现场辨析, 使传感器的特异性得到显著提高, 且杂交时间也可减少至 3-5 分钟。

基因探针--单链 DNA 片段(寡核苷酸)在传感器表面的固定化, 是基因传感器的首要和基本条件。

本发明采用的方法包括有吸附法、共价键合法和组合法三种探针固定化方法, 采用现有技术中的后两类方法, 虽然可得到牢固的探针修饰层, 但其表面杂交反

应活性位点少，且方法复杂。

本发明的研究人员注意到，利用具备某些结构的分子的自组装作用，制备末端修饰的探针，使其在表面自然形成稳定、高度有序的单分子层(SAMs)，无疑具有理想的反应活性，本发明优选采用巯基进行末端修饰，即优选采用巯基共价键结合法。

前述各种基因传感器中，无需标记或杂交指示剂的 SPR 和压电传感器易于大批量制备，技术简便快捷，可进行实时现场监测，所需设备也较简单便宜。这两类传感器已成为基因传感器研究的主流。

多聚酶链反应(PCR)技术已广泛应用于医学各个领域，但目前其应用需在 PCR 扩增后再对产物分离分析，因此对多聚酶链反应进行现场监测，即实时 PCR 技术具有重要的应用价值。

某些标本和探针结合所产生的信号比较微弱，本发明的研究人员以人乳头瘤病毒癌基因转录物的检测为例，首次尝试了将可现场监测的压电基因传感器与 PCR 技术结合，构建新型的实时 PCR 技术；换句话说，为了提高信号强度，本发明采用了对标本先进行 PCR 扩增，或采用实时 PCR 扩增的方法，提高了信号的强度和检测灵敏度。

基因传感器发展的一个具有重要意义的趋势是构制微型基因传感器阵列即基因传感器芯片。至今除前已提及的用 SPR 显微技术进行的尝试外，Arlinghaus 等用溅射激发共振离子化微探针技术检测用同位素标记 DNA 与基因传感器芯片的杂交，而本发明采用了区别于上述现有技术的微型压电石英谐振器阵列构制了本发明所述的靶基因组自动检测系统。

本发明所述的靶基因组自动检测方法的检测步骤如下：

首先进行标本采集处理，然后通过进样系统将标本加入杂交反应系统，这里所述的杂交反应系统是由基座、芯片、导线构成；杂交反应系统将标本和探针接触后的频率变化参数以及对比检测参数的数据反馈给数据采集及处理系统，所述的数据采集及处理系统包括了多道测试采集和实时中央信号处理，所述的多道测试采集实际上是对多个压电石英晶体上的探针或一块压电石英晶体阵列上的多个探针因和标本结合而产生的参数的变化依序采集；实时中央信号处理最终以分道数据显示、数据综合处理、图像显示得以表现。

实际上，本发明所述的微型压电石英谐振器可以是单块石英晶体固化一种探针，也可以采用微型压电石英谐振器阵列，这样就可以在一块石英晶体上被刻蚀的大量小块上设有大量的探针，见附图 1，通常设有至少 9 种探针。

本发明可以采用在一个芯片上标记不同种类的探针（即多种特异的基因片段—核苷酸序列）。探针种类的不同，检测的基因信息就不同；如果仅标记一种探针，可对不同来源的多个标本进行同种基因信息的检测和分析（如某种病原体：乙肝病毒等）；如标记多种探针，即可对一个标本的多种基因信息进行诊断和分析（如：检测肝炎时，可以固定多种探针检测甲、乙、丙等肝炎）。

本发明所述的微型石英谐振阵列基因传感器芯片是利用微细加工技术直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，然后将大量探针分子固定于镀有金或银膜层的石英晶体支持物上，晶体两侧通过银电极施加一定的电压，而后使探针与标本进行杂交，由于杂交与否会导致石英晶体谐振频率的改变，通过检测石英晶体谐振频率的变化值即可判断样品有无靶分子以及数量多少。

本发明所述的将压电基因传感器芯片用于靶基因检测的基本工作原理是：在某个固体支持物上固定一段基因，具体地讲，所述的固定支持物可以是压电石英晶体，在压电石英晶体的二端通过银电极施加电压，从而得到一固定的频率，然后利用其在溶液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，杂交过程的质量负载和粘性耦合的变化通过导致石英压电晶体的频率变化，将该频率的变化值通过分析就可以得出是否杂交以及杂交的数量，从而实现了液相中具体的 DNA 的检测。已知基因片段在支持物上的固定情况如图 3 所示。

下面是本发明的所述的微型压电石英谐振器阵列基因传感器芯片归纳：

其中，本发明所述的微型压电石英谐振器阵列基因传感器芯片包括被刻蚀成阵列的 AT 切石英晶体 3，在石英晶体的下表面镀有金属膜层 4，在石英晶体阵的上表面镀有呈相同阵列的金属膜层 2，在呈阵列的上金属膜层 2 的上表面固化有探针阵列层 1，相应的探针 7 处固定有电极 6，下金属膜层与基座 5 热压键合；所述的阵列数至少为一个，优选至少为六个，最好至少为九个；其中，所述阵列的块数和被固化的探针层 1 的数量是相同的；所述阵列所呈现的块之间设有沟槽 9；所述的金属膜层可以是金膜层或银膜层；所述的电极是银电极；所述的基座是玻璃基座；为了减小其它因素的影响，在所述阵列中固化有同样探针中的一个被作为参比检测；本发明采用的固化方法可以是吸附法、共价键合法和组合法，但优选采用巯基末端修饰共价键结合法。

本发明所述的检测方法步骤分列如下：

1. 标本处理 标本中核酸的提取，内切酶处理（不同标本用不同的酶）根据不同的样本进行目的片段的分离提纯等；

2. 若芯片非一次性使用，在进样测试前进行电极清洗，本发明所述的检测仪优选使用一次性芯片；

3. 启动电脑操作软件程序，内容包括进样、实时监控、信号处理、图像显示系统及结果分析；

4. 由经进样孔进样将标本合探针接触使之产生杂交反应；

5. 根据电脑数据及图像得到测试结果；

6. 清洗进样池及反应池；

7. 循环操作。

本发明所述的多道（孔）反应装置已经由申请人生产并公开出售。

本发明所述的靶基因组自动方法采用了生物工程学、分子生物学、传感器、微细加工技术等，其主要用途包括对疾病的诊断（传染性疾病、遗传病、肿瘤、心血管疾病等）、基因突变的检测、新药物的研制开发和环境监测。

采用本发明所述方法构造的靶基因自动检测仪的检测性能如下表 1 所示：

表 1

主要技术经济指标	
• 最低检出量：	5 pg, 与同位素标记相当
• 检出时间：	10 min
• 传感器芯片大小：	10 mm × 10 mm
• 传感器及阵列大小：	1.0 mm × 1.0 mm, 7 × 7
• 芯片可测靶基因数：	49
• 传感器芯片使用寿命：	10 次，优选一次性使用
• 检测系统使用寿命：	万次以上

采用本发明所述方法或者采用该方法构造的靶基因组自动检测仪的优点如下：

本发明所采用的微型压电石英谐振器阵列构制的芯片的灵敏度可达 pg 级；特异性与目前所用标记检测技术相同。

采用本发明所述方法构造的靶基因自动检测仪具备可原位测定、无需标记、随时可获得检测信息、体积较小、便于携带、使用方便、成本低廉等优点，适合于临床和野外环境检测。

表 2 本发明所述的检测方法及其检测仪与常规方法的性/价比较

		检测时间	操作难易	价格 (RMB)	配套设备
常规	ELISA	3 hour	复杂	~ ¥50.0	需要
	培养	> 1 week	复杂	~ ¥150.0	需要
本发明传感器芯片		< 10 min	简易	~ ¥30.0	不需

注：ELISA 和培养法是目前临床广泛应用检测病原体的方法

本发明所述检测方法的保护范围可见权利要求，但不仅限于此，在本发明构思下对本发明所述的检测方法的顺序和组合的改变都应该在本发明的保护范围之内。

图 6 是本发明所述检测仪的电路示意。

本发明所述的检测仪，除了芯片外，电路的各部分都可以采纳现有技术中的电路，本发明的贡献之一是将各检测电路组合并结合本发明所述的芯片以达到本发明的目的

下面是实施例，所述的实施例只是用来说明本发明，而不是用来限定本发明的。

实施例 1

采用上述本发明的方法及按照该方法构造的检测仪，用 30bp 的 Hpv18 (7021-7050) 片段和 20bp 的毒素原性大肠杆菌 (ETEC) 产生的不耐热肠毒素 (LT) 片段固定于芯片上，对标本进行检测，见图 4，由图 4 可知，当反应约 5 分钟时达平衡，此时芯片震荡频率减少约 40-50HZ，其中，■连线为标本阴性对照，▲连线为对 HPV 的测试结果，X 连线为对 LT 的测试结果。

实施例 2

表 3 和表 4 是用常规培养方法、PCR 方法和本发明所述方法和检测仪分别对结核杆菌、淋球菌（已确知有无的标本）检测的结果比较。

表 3 所示的 30 份淋球菌标本中阴性标本为 1、8、9、10、11、14、15、18、19、20、21、22、23、26、27，其余均为阳性；

表 4 所示的 30 份结核杆菌标本中阴性标本为 1、6、7、9、11、18、19、21、22、27、28，其余均为阳性。

比较检测结果可以看出，常规培养方法比较准确和客观，但灵敏度有限，PCR 方法灵敏度高但易出现假阳性，由实验数据可得无论准确度还是灵敏度，本发明所述的自动靶基因检测仪的检测效果是优于这两种方法的。

本发明所述的靶基因自动检测方法以及采用该方法构造的检测仪的特点是 DNA 芯片和传感器技术相的组合，具有如下优点

- 1、价格低廉，便于携带；
- 2、使用方便，可原位和实时监测；
- 3、无需标记，可长期保存，反应第三敏感性高；
- 4、可同时检测多组标本。

表 3 淋球菌临床检验结果报告

样号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培养	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PCR	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
MGI	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

样号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
培养	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
PCR	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
MGI	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-

样号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
培养	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
PCR	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
MGI	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+

表 4 结核杆菌临床检验结果报告

样号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培养	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
PCR	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
MGI	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+

样号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
培养	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
PCR	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
MGI	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

样号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
培养	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MGI	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+

权 利 要 求

1、一种组合靶基因自动检测方法，其特征在于所述的检测方法是利用微细加工技术直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，将大量探针对应地固定于镀有金属膜层的石英谐振器阵列上形成微型石英谐振阵列基因传感器芯片，在芯片二端通过银电极施加电压得到一固定的频率，然后使探针在溶液中同与之互补的标本（寡核苷酸）进行杂交，测定杂交过程的质量负载和粘性耦合的变化通过导致芯片的频率值，即可得出是否杂交以及杂交的数量。

2、根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于所述的微型石英谐振阵列基因传感器芯片包括被刻蚀成阵列的 AT 切石英晶体 3，在石英晶体的下表面镀有金属膜层 4，在石英晶体阵列的上表面镀有呈相同阵列的金属膜层 2，在呈阵列的上金属膜层 2 的上表面固化有探针阵列层 1，相应的探针 7 处固定有电极 6，下金属膜层与基座 5 热压键合。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的检测方法，其特征在于所述的阵列所形成的块数至少为一个，优选至少为六个，最好至少为九个；

4、根据权利要求 1 或 3 所述的检测方法，其特征在于所述的阵列的块数和被固化的探针 1 的数量是相同的；所述的阵列所呈现的块之间设有沟槽 9；

5、根据权利要求 1 或所述的检测方法，其特征在于所述的金属膜层可以是金膜层或银膜层；所述的电极是银电极；所述的基座是玻璃基座；

7、根据权利要求 1 或所述的检测方法，其特征在于所述的阵列中阵列中固化有同样探针中的一个被作为参比检测探针；所述的探针是已知基因片断；所述的芯片阵列上可标记同种或不同种类的探针。。

8、根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于所述的探针固化方法包括吸附法、共价键合法和组合法；优选采用巯基进行末端修饰，即巯基共价键结合法。

9、根据权利要求 1 或所述的检测方法，其特征在于所述的标本是先进行 PCR 扩增的，或采用实时 PCR 扩增的。

10、根据权利要求 1 所构造的靶基因组自动检测仪，其特征在于所述的检测仪设有微型石英谐振阵列基因传感器芯片，芯片设置在杂交反应系统种，所述的杂交反应系统是由基座、芯片、电极导线构成；杂交反应系统将标本和探针接触后的频率变化参数以及对比检测参数的数据反馈给数据采集及处理系统，所述的数据采集及处理系统包括了多道测试采集和实时中央信号处理，所述的多道测试采集实际上是对多个压电石英晶体上的探针或一块压电石英晶体阵列上的多个探针因和标本结合而产生的参数的变化依序采集；实时中央信号处理最终以分道数据显示、数据综合处理、图像显示得以表现。

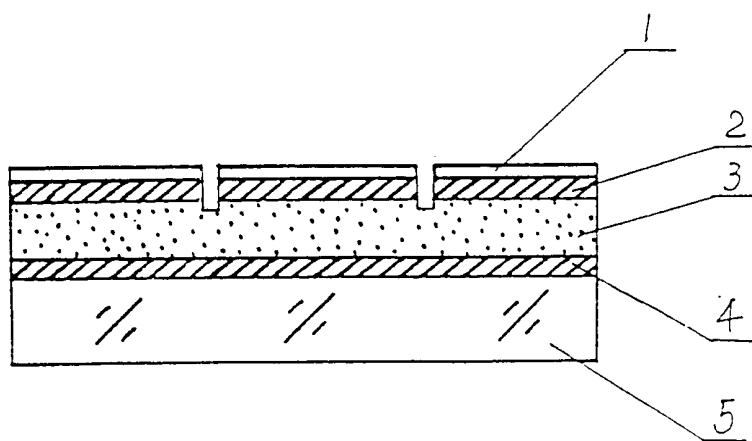
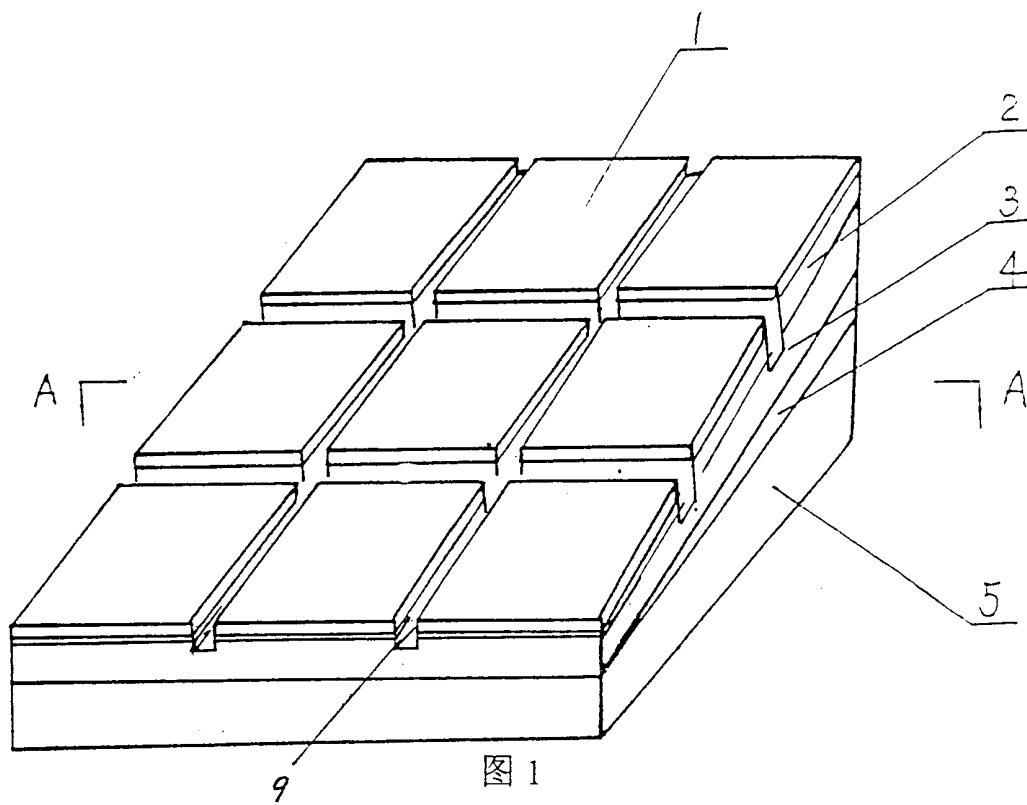


图 2

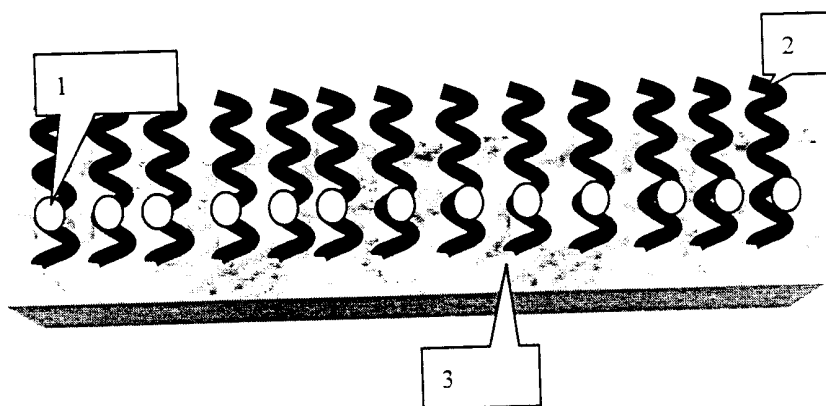


图 3

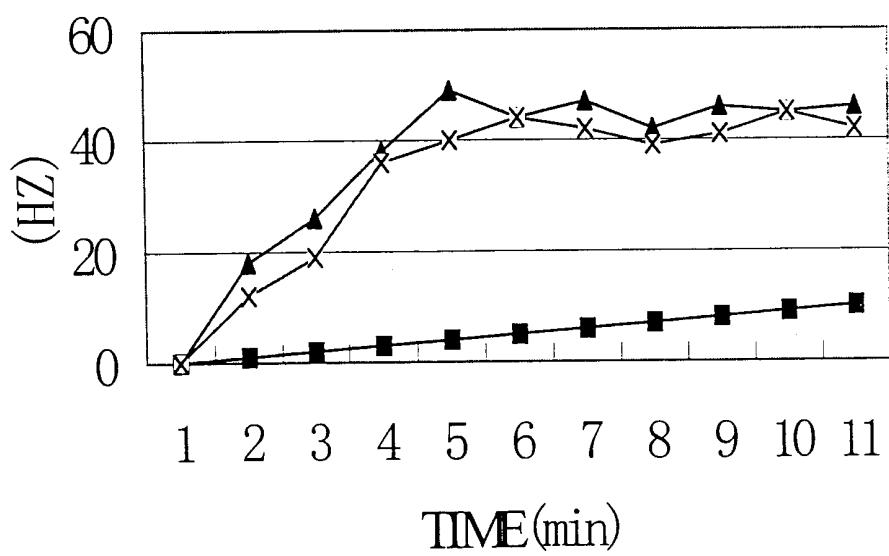


图 4

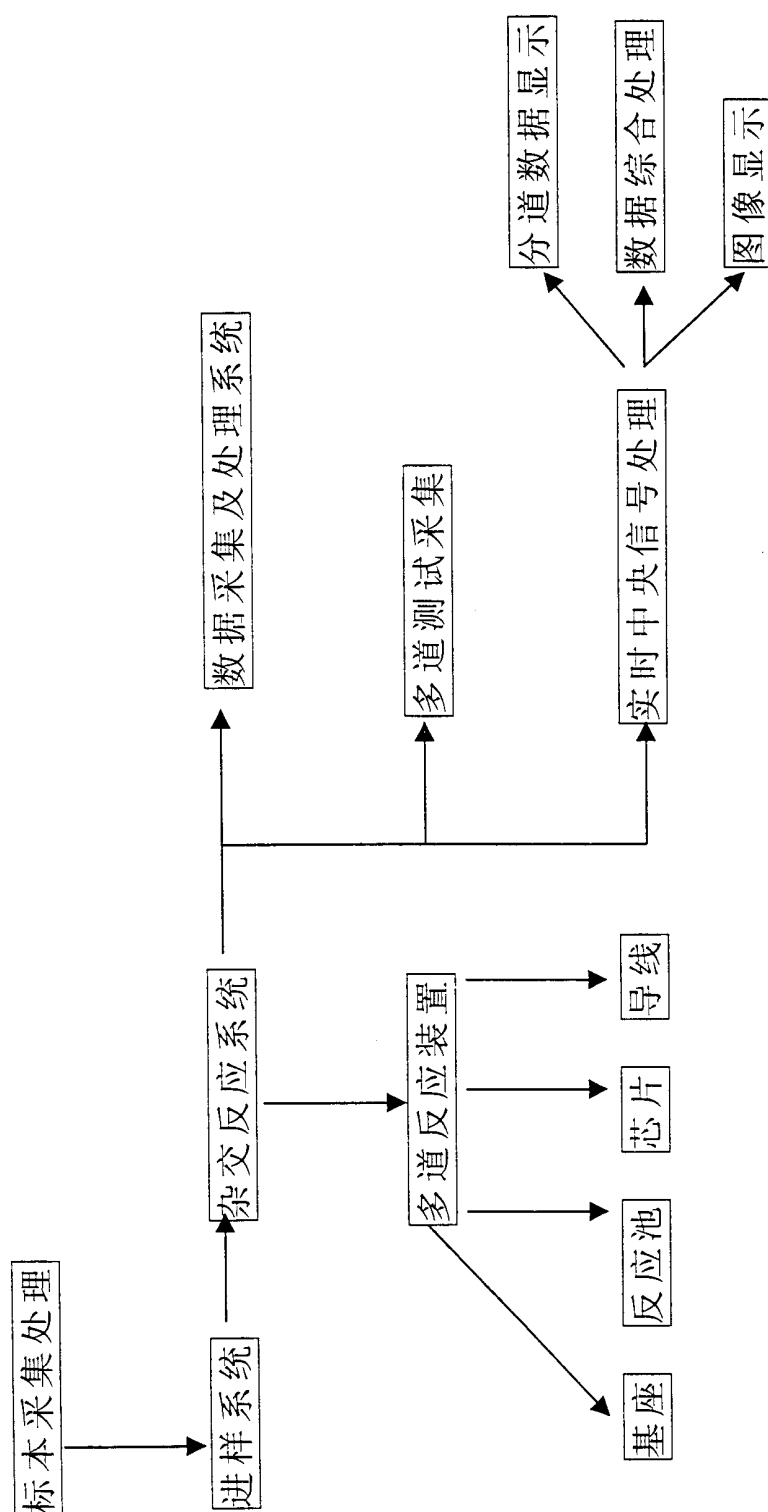


图 5

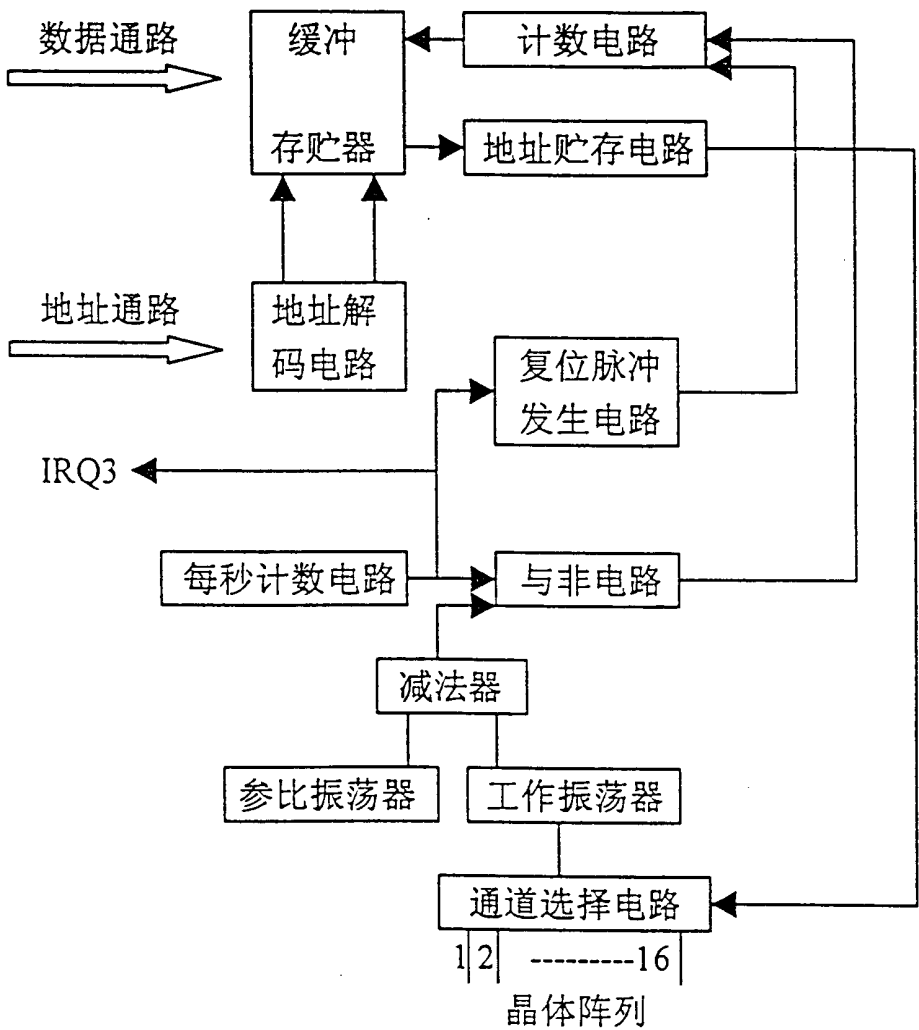


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN 99/00192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12Q1/68, C12Q1/24, C12M1/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12Q1/68, C12Q1/24, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Chinese Patnets, Chinese Scientific and Technical Journals

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, Spupdate, PIR,WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
Y	US 5501986(E. I. Du Pont de Nemours and Company), 26 March 1996	1-10
Y	US 5661028(Lockheed Martin Energy Systems, Inc.), 26 August 1997	1-10
A	WO 98/10122(NORTHEASTERN UNIVERSITY), 12 March 1998	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2000 (28. 03. 2000)

Date of mailing of the international search report

13 APR 2000 (13. 04. 00)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer

SUN, guangxiu

Telephone No. 86-010-62093884



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN 99/00192

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US 5501986	26-03-1996	WO 8909938A	19-10-1989
		EP 0408641AB	23-01-1991
		JP 3503681T	15-08-1991
		DE 68918693D	10-11-1994
US 5661028	26-08-1997	US 5944971	31-08-1999

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 99/00192

A. 主题的分类

IPC⁷: C12Q 1/68, C12Q1/24, C12M1/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷: C12Q 1/68, C12Q1/24, C12M1/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献, 中文科技期刊数据库

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, Spupdate, PIR, WPI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
Y	US 5501986(E. I. Du Pont de Nemours and Company), 1996 年 3 月 26 日	1 - 10
Y	US 5661028(Lockheed Martin Energy Systems, Inc.), 1997 年 8 月 26 日	1 - 10
A	WO 98/10122(NORTHEASTERN UNIVERSITY), 1998 年 3 月 12 日	1 - 10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

2000 年 3 月 28 日(28. 03.2000)

国际检索报告邮寄日期

13. 4月 2000 (13. 04. 00)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员 SUN, guangxiu

电话号码: 86-010-62093884



国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN 99/00192

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US 5501986	1996 年 3 月 26 日	WO 8909938A	1989 年 10 月 19 日
		EP 0408641AB	1991 年 1 月 23 日
		JP 3503681T	1991 年 8 月 15 日
		DE 68918693D	1994 年 11 月 10 日
US 5661028	1997 年 8 月 26 日	US 5944971	1999 年 8 月 31 日