

DOI: 10.13376/j.cblls/2024098

文章编号: 1004-0374(2024)07-0962-09

· 情报研究 ·

蛋白微阵列芯片技术和产业化发展前景及存在问题

杜卫东

(安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032)

摘要: 生物微阵列芯片技术发展日新月异。与基因芯片不同, 受蛋白质立体结构、生物学活性、固相载体表面化学修饰物稳定性及检测与分析方法学等方面的影响, 蛋白芯片研发及产业化道路曲折艰辛。本文就蛋白微阵列芯片类型、表面化学修饰、芯片研发现状、桎梏及发展趋势作一简要综述。

关键词: 生物芯片; 蛋白质; 生物技术; 检测平台; 临床应用

中图分类号: Q503; O657 **文献标志码:** A

Prospects and bottlenecks in development and industrialization of protein biochips

DU Wei-Dong

(Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Development of biochip technology remains a great challenge. Unlike gene biochip, the research and development and industrialization of protein biochip yet runs on a way covered with thorns as a result of influence by intrinsic three-dimensional construction and sustainable biological activity of on-chip proteins, stabilization of surface chemical modification on solid supports and methodology of detection and analysis. In this review, we have a brief review on types of protein biochips, surface chemical modification, manufacturing processes, and current R&D status, main shackles and potential trends in biochip research and development.

Key words: biochip; protein; biotechnology; assay platform; clinical application

蛋白微阵列芯片(简称蛋白芯片)技术是将已知蛋白或多肽等生物探针有序地固定于经表面化学修饰后的固相载体表面, 然后与待测生物样品中特异性靶分子和荧光素标记分子进行反应, 通过激光共聚焦扫描或电荷偶联摄影像机(CCD)对荧光信号强度进行检测分析, 从而判断样品中靶蛋白的种类和含量^[1]。蛋白芯片技术提高了芯片探针的装载密度, 能对特异性信号进行实时检测和分析, 以获得客观、准确的生物信息。该项技术已广泛应用于蛋白质组学研究、蛋白质交互作用研究、临床疾病诊断和药物筛选等前沿领域。

1 生物芯片类型

生物芯片的特征是微型化、集成化、高通量。生物芯片类型可以根据不同目的加以划分。根据芯

片包被探针分子不同, 可将芯片分为基因表达谱芯片、寡核苷酸芯片、蛋白芯片、多肽芯片、多糖芯片、细胞芯片和组织芯片等。根据检测原理不同, 芯片可分为元件型微阵列芯片、通道型微阵列芯片、生物传感器芯片等。根据应用领域不同, 生物芯片大致可以分为: (1) 基因芯片(gene microarrays), 以检测基因表达谱和结构变异^[1-2]; (2) 蛋白和多肽芯片(protein and peptide arrays), 以检测蛋白质抗原抗体

收稿日期: 2024-03-27; 修回日期: 2024-05-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30470591, 81171655); 安徽省自然科学基金面上项目(050430716, 090413114); 安徽省国际科技合作项目(1403062023); 安徽省转化医学研究院科研基金(2017zhyx37)

通信作者: E-mail: weidong.du@ahmu.edu.cn

反应及蛋白质交相互作用^[1,3-7]; (3) 比较基因组杂交芯片 (comparative genomic hybridization, CGH), 以检测染色体 DNA 拷贝数变异^[8]; (4) 染色质免疫共沉淀芯片 (chromatin immunoprecipitation-chip, ChIP-chip), 可将高分辨率基因芯片与染色体免疫沉淀技术 (ChIP) 进行整合, 使得对目的蛋白与基因组调制机制、细胞周期和细胞凋亡等的研究成为可能^[9]; (5) 小 RNA 芯片 (microRNA arrays), 以检测生物体小 RNA 表达谱^[10]; (6) 核酸可编程蛋白芯片 (nucleic acid programmable protein arrays, NAPPAs), 以检测蛋白质-蛋白质交相互作用^[11]; (7) 多孔平板芯片 (plate arrays), 以检测细胞功能和蛋白质表达^[12]; (8) 全细胞芯片 (whole cell arrays), 以期成为药物筛查、环境监测和食品安全监控的有效工具^[13]; (9) 微流体芯片 (microfluidic arrays), 其中基于微孔板芯片的单细胞微流控技术可用于分析单细胞核酸、蛋白和代谢物等, 探讨细胞异质性^[14]; (10) 表面等离子共振传感器 (SPR and BioCD), 与微流控和多路复用器件绘制纳米粒子阵列联合制备便携式设备, 以用于生物分析、临床诊断和药物筛选等^[15-16]; (11) 类器官芯片 (Organoids-on-a-chip), 用以检测器官生理微系统变化, 它是包括类器官培养、微流控、执行器和生物传感器等在内的一个检测整合体^[17]。就蛋白芯片而言, 根据研发策略不同, 又可分为分析蛋白芯片、功能蛋白芯片和反相蛋白芯片。用于临床体液抗原-抗体检测的为分析蛋白芯片。用于研究蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、蛋白质-磷脂和小分子交互作用的为功能蛋白芯片。使用已知特异性抗体筛查芯片上组织细胞裂解物样本内有无靶抗原成分者为反向蛋白芯片 (revers phase protein microarray, RPPA), 用于评估肿瘤复发和判断预后、筛查肿瘤标志物、筛选药物靶点和研究信号网络等^[18]。HuProt™ 蛋白质组学芯片和 Sengenics Immunome™ 蛋白质组学芯片的应用使高通量检测海量表达蛋白质和疾病相关自身抗体成为可能^[6-7]。生物芯片上集成不同类型分子的微阵列, 能够同步分析这些生物分子, 快速准确地获取样品中的生物信息, 检测效率明显提高。

2 蛋白芯片表面化学修饰

蛋白芯片使用的固相支撑物 (基片) 包括玻片、硅片、硝酸纤维素膜、尼龙膜、聚丙烯膜、聚丙烯酰胺、交联葡聚糖和金银铂等金属平面或纳米材料等。虽然通过物理吸附方式可以把蛋白质分子直接

连接在固相载体上, 但这种物理吸附无法调控蛋白质分子的排列方向, 固相化效率较低, 分子间连接疏松, 容易在生物反应过程中被洗脱, 所以较为少用。在蛋白质探针点样前, 需要对芯片基片进行表面化学修饰。这种修饰可以是二维性的, 即使用醛基、氨基、羧基、环氧基、多聚赖氨酸、肝素、巯基和生物素-链霉亲和素等化学试剂, 通过共价键或特殊分子间亲和力把蛋白质固定在固相载体表面。经此类修饰的固相载体与蛋白质的结合较为牢固, 蛋白质构象变化较小, 有利于保持蛋白质天然活性。修饰也可以是三维性的, 如使用琼脂糖、聚丙烯酰胺、硝化纤维、聚乙二醇等试剂。这些试剂在玻璃基片表面包被一层凝胶或树突状多聚物, 并可以通过化学反应引入活性基团, 以共价结合或物理吸附的方式把蛋白固定在载体表面。这种三维多孔结构对蛋白质的结合量大于二维平面载体, 这种凝胶固-液相环境使固定后的蛋白质不易失去活性。国内曾对玻璃基片上述化学试剂修饰方法学及蛋白结合效率进行过评估^[19-20]。目前表面化学修饰玻璃基片已经商品化。

自 20 世纪 80 年代 Allara 和 Whitesides 等报道自组装分子单层 (self-assembled monolayer, SAM) 技术以来, 利用硫醇类化合物自然吸附于金箔 (Au) 基片表面制备 SAM 的技术已被广泛使用^[3-5, 21-22]。一般认为硫醇类 SAM 是由硫醇类化合物在其巯基与 Au 之间形成的化合键和理化作用力的诱导下定向排列而获得的。这一工艺体现为在无外力作用下, 表面化学修饰试剂分子会自发地形成低自由能, 以近乎垂直且非常稳定的形式在金箔基片表面通过非共价作用形成具有特定排列顺序的分子聚合体, 形成分子单层。具备这种功能的修饰分子具有自组装机动力以及导向作用, 这种自发非共价键弱相互作用力是维持自组装体系结构稳定性和完整性的始动力。另外, 使用过量硫醇类分子进行表面化学修饰时, 分子含巯基一端亦可与 Au 共价键 (Au-S 键, 金硫键) 结合, 分子另外一侧游离端则与包被探针分子结合。分子自组装单层技术能够很好地调控生物芯片表面的性质、方位和功能^[3, 22-23]。除了硫醇类 (R-SH, R 代表烷基), 二硫化物 (R-S-S-R) 也能在金箔基片表面形成分子单层。烷基硅烷衍生物如 SiO₂、SnO₂ 或 TiO₂ 等能用来修饰羟基化表面, 在表面聚合作用中经 Si-O-Si 键连接形成多聚硅氧烷^[21, 24]。探针蛋白分子内的多肽侧链骨架可以提供以下游离功能基团: -SH (半胱氨酸)、-NH₂ (赖氨酸、

精氨酸)、-COOH(天冬酰胺、谷酰胺)、-OH(丝氨酸)、Ph-OH(Ph=苯基,如酪氨酸)和咪唑基(组氨酸)等。这些游离基团可以直接偶联到芯片表面修饰分子的末端基团上,如芯片表面的末端羧基化分子单层和蛋白质分子的游离氨基之间可形成酰胺键^[24]。有时,需要加入一个双功能偶联剂,即在固相载体和特异性探针分子之间人为加入一个桥分子,其一端与固相载体表面的分子自组装单层末端基团结合,另一端可以作为连接臂结合探针蛋白分子,以此减少生物分子反应过程中的空间位阻效应^[3, 25]。偶联方法可以随芯片固相载体种类及表面化学修饰物的不同而不同。偶联包被蛋白、酶类及抗体最关键的前提是保持其生物活性。一般来讲,由于分子间的化学偶联仅仅发生在肽链上的某一个功能基团,与生物活性结合或识别位点间有足够距离,因此对生物活性一般影响不大^[3, 22]。

蛋白芯片探针包被工艺是借助于芯片点样仪加以实现的。另外一种包被方法是在玻璃片上点样探针蛋白序列的DNA片段,并加入体外转录和翻译系统,合成的探针分子以GST融合蛋白形式结合在芯片修饰的谷胱甘肽基团上。这种类型的蛋白芯片检测纯度不高,目前仅用于蛋白质交互作用研究。

3 生物芯片国内外研发状况

Dot blot技术可以被看作为生物芯片技术创建的雏形。20世纪80年代Bains等将短链DNA片段固定到固相载体上,借助反向杂交方式进行序列测定;而基因芯片从实验室走向工业化却得益于探针固相原位合成技术和照相平板印刷技术的有机结合以及激光共聚焦显微技术的引入,它是继大规模集成电路之后的又一次具有深远意义的科学技术革命^[1, 26]。

自从美国于1998年宣布正式启动基因芯片计划以来,欧美及日本等发达国家均投入大量资金用于生物芯片的开发与产业化。1992年,Affymetrix公司Fodor领导的小组运用半导体照相平板技术,首次报道了原位合成制备的基因芯片(GeneChip)。1995年,美国斯坦福大学布朗(P. Brown)实验室发明了第一块以玻璃基片为固相载体的基因微阵列芯片,标志着DNA微阵列(DNA microarray)技术进入了广泛研究和应用阶段。2001年,RayBiotech公司建立了世界上第一款商品化细胞因子抗体芯片,继而又研发出了包括蛋白芯片、多肽芯片在内的多种类型的芯片产品。美国约翰霍普金斯大学研发的

HuProt™蛋白质组芯片含有20 240个人重组蛋白。2023年,Sengenics公司推出i-Ome Discovery™蛋白芯片平台,选择性包被与人类疾病相关的1 800种自身抗原,可以对患者血清内潜在自身抗体进行表达谱分析,用于肿瘤、自身免疫性疾病、神经退行性疾病、内分泌疾病、传染病和免疫缺陷病等疾病的生物标志物筛查和诊断。美国VivoVerse公司研发了线虫高通量微流控系统,具有可进行单芯片80(2x40)及960(24x40)个样本检测的两种高通量平台,兼容性强,设备可用于其他多种微流体实验。具有代表性的国际生物芯片公司包括昂飞(Affymetrix)、安捷伦科技(Agilent Technologies)、赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)、因美纳(Illumina)、珀金埃尔默(PerkinElmer)、富鲁达(Fluidigm Corporation)、罗氏生命科学(Roch Life Science)、瑞博奥(RayBiotech)和Sengenics等。国际上众多中小型生物技术公司在生物芯片市场上激烈竞争,不断推动生物芯片技术的发展与革新。生物芯片集成度、检测通量和准确度更加趋于完美,新型芯片不断涌现,在科学研究、生物制药以及分子诊断领域占有一席之地。

我国生物芯片研发始动时间几乎与欧美同步。目前由国家863专项重点资助的生物芯片研发基地包括生物芯片北京国家工程研究中心(博奥生物芯片有限责任公司)、生物芯片上海国家工程研究中心(上海生物芯片有限公司)、天津生物芯片技术有限责任公司、西安国家微检测系统工程技术研究中心和南京生物芯片重点实验室等。其中,我国生物芯片研发领衔单位当属博奥生物芯片有限公司。这家公司自2000年创立以来,已有包括HLA基因分型芯片、遗传性耳聋基因突变检测芯片、鳞翅目模式生物家蚕全基因组寡核苷酸芯片、SARS病毒检测基因芯片、高效兽药多指标检测蛋白芯片、转录因子活性谱芯片等产品问世,研发出了多项与生物芯片相关联的检测仪器和设备,国内外授权专利累计700项,专利转换率达50%,其中多项产品远销欧美国^[27]。此外,上海生物芯片有限公司、浙江大学、清华大学、东南大学、上海交通大学、中国科学院大连化学物理研究所、中国科学院长春应用化学研究所等单位在生物芯片研发上亦有可喜的成果。其中,中国科学院长春应用化学研究所应用表面增强拉曼光谱(SERS)和共振光散射技术研制了新型蛋白芯片,其对肽和蛋白的检测限分别达到10 fg和100 fg,液相蛋白检测限达到0.1 μg/mL^[28]。

中国科学院力学研究所建立了“蛋白质芯片生物传感器系统”,用于乙肝五项指标、肿瘤标志物、微量抗原抗体、SARS 抗体药物、病毒及急性心肌梗死诊断标志物的检测与鉴定^[29]。中国科学院大连化学物理研究所基于液滴的微流控系统,将秀丽隐杆线虫封装成一个平行的液滴系列,首次以单动物分辨率表征蠕虫对神经毒素的反应行为^[30]。2024年3月27日,上海交通大学公布材料科学与工程学院研究人员基于量子点荧光编码微球膜乳化法制备工艺以及信号解析技术,创建了具有自主知识产权的量子点液态生物芯片技术平台,可用于对核酸和蛋白质标志物的检测^[31]。义翘神州科技股份有限公司以其海量蛋白和多肽库作为优势为蛋白芯片研制提供物质保障。本课题组在以金箔基片为基础的蛋白芯片研发方面也有一些进展,如建立了针对莱姆病^[3, 4, 32-33]、梅毒^[34]、传染性单核细胞增多症、系统性红斑狼疮^[22]和艾滋病等相关感染性病原体,脑卒中脑脊液^[35-36]、胃癌^[37]和肝癌血清糖链,噬血细胞淋巴组织细胞增多症(HLH)血清细胞因子及其中和抗体^[5, 23, 25, 38],不孕症患者血清抗精子膜抗体^[39]、胶质母细胞瘤^[40]、肥胖症^[41]、胃癌^[42]及肝癌等血清分子标志物筛查和药物评估^[43]等的蛋白芯片。这种金箔蛋白芯片检测限可达 50 pg/mL^[25];检测组间差异为 1.37%~4.35% (CV),组内差异为 3.78%^[43]。金箔 EBV 蛋白芯片可以同步检测血清抗 EBV 核抗原 1 蛋白(EBNA-1) IgG 抗体、抗病毒衣壳抗原蛋白(VCA) IgG 抗体和 IgM 抗体,以区别 EBV 早期及晚期感染患者;其检测特异性和敏感度与临床化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay)结果相当^[22]。利用金箔多肽芯片可以了解莱姆病患者血清中莱姆病伯氏疏螺旋体种属感染情况^[4]以及在片完成血清学分子组分免疫沉淀检测,了解蛋白质-蛋白质交互作用等^[5]。金箔蛋白芯片的优势还在于可以进行质谱分析等。

4 蛋白芯片应用的标准化问题

阻遏蛋白芯片规模化应用的一个关键问题是蛋白芯片加工工艺和检测数据诠释的标准化。由于目前各实验室使用的芯片种类、实验条件、检测手段和分析方法等诸多方面存在差别,使得各实验室间的检测数据无法兼容和比较分析。值得庆幸的是,面对来自各界对生物芯片技术的质疑,美国食品和药品管理局(FDA)领导实施了基因芯片质量控制(MAQC)计划,对生物芯片检测数据的重现性、可

靠性进行了为期两年的研究。该研究对同一芯片平台数据重复性、可再现性,平台间数据可比较性、相对准确性,及不同平台间相关性进行了评估,认为生物芯片数据具有平台内和平台间可重现性,因此可以用于基础研究甚至作为临床诊断工具^[44]。2008年,我国生物芯片标准化技术委员会(TC421)成立,发布医学行业标准《生物芯片基本术语》(GB/T 27990-2011);2009年以来发布了一系列生物芯片国家医药行业规定和标准,如《体外诊断用蛋白质微阵列芯片》(YY/T 1151-2009)、《体外诊断用 DNA 微阵列芯片》(YY/T 1153-2009)、《微阵列芯片用醛基基片》(GB/T 33752-2017)、《DNA 微阵列芯片通用技术条件》(GB/T 28639-2012)、《蛋白质微阵列芯片通用技术条件》(GB/T 28641-2012)、《人体疾病易感 DNA 多态性检测基因芯片》(GB/T 29889-2013)、《生物芯片类检测试剂注册技术审查指导原则》(食药监办械函[2013]3号)和与其加工工艺相关的仪器技术参数标准;而分析系统性能验证则需要满足《临床实验室质量和能力的专用要求》(GB/T 22576-2008)。按照国家政策制备生物芯片专业标准化工作方针、政策和技术措施,对生物芯片相关产品及检测方法领域的国家标准制进行修订,规范了生物芯片产业的管理,促进了这一新兴产业的有序发展。2020年,《中华内分泌代谢杂志》发表“化学发光法微阵列蛋白芯片临床应用专家共识”,为蛋白芯片临床应用原则提出了新的建议^[45]。

5 蛋白芯片研发的技术难点

理论上,蛋白芯片检测的特异性依赖于包被蛋白克隆序列的专一性和纯化程度。蛋白芯片检测敏感度取决于芯片化学修饰平面和检测试剂及仪器本身。蛋白经常存在自身降解或分子结构折叠变化,使得探针蛋白抗原决定簇无法暴露或蛋白失活,导致蛋白芯片检测灵敏性和可重复性发生改变。因此,保障抗原蛋白制备纯度和立体构象完整性,保持表面化学修饰芯片稳定性、包被分子生物学活性等,对今后蛋白芯片研发及临床应用至关重要。蛋白芯片真正要成为实验室或临床普遍采用的技术仍存在以下问题亟待解决。(1)多功能接头或多用途蛋白芯片平台以及高效表面化学修饰工艺的建立。(2)包被蛋白及多肽等探针分子制备和蛋白芯片试剂盒储存期活性保持。理化因素影响蛋白芯片储存期^[43]。与蛋白芯片不同,多肽芯片使用的是短蛋白片段或多肽,多肽长度为 8~30 个氨基酸,含有特

异性蛋白表位序列^[4, 33, 46]。在多肽芯片研发上要选择适宜长度的肽链序列, 以保证其免疫原性及与抗原表位结合的特异性; 但肽链太长会出现交叉反应和非特异性结合等, 因此还要避免长链疏水残基。(3) 特异性高效价靶分子抗体的研发与制备。(4) 高灵敏标志物的选择。目前标志物多选用荧光素、亲和标签、免疫金银标签或化学光标签等, 常出现影响探针与靶蛋白作用的空间位阻效应。表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 无标记检测可用于蛋白质交互作用研究。(5) 蛋白芯片检测特异性、稳定性和可重复性的提高。(6) 蛋白芯片临床样本的定量化检测。(7) 高灵敏信号芯片检测仪的研发。(8) 分析软件开发与实验数据兼容。(9) 专利期保护。(10) 研发临床实用型蛋白芯片进行患者的个体化检测或单一蛋白芯片分隔区域化, 以实现不同临床样本的同步检测。传染性疾病血样封闭型蛋白芯片的应用可以避免含有危害病原体的血样暴露带来的实验室污染。此外, 如何检测低丰度表达靶蛋白及降低蛋白芯片加工成本同样也是目前需要解决的关键问题。

6 蛋白芯片研发成果调研

截至 2024 年 3 月 27 日, 作者于 PubMed 数据库索引中输入关键词 “microarrays”, 发现共发表 168 670 篇论文, 基于关键词 “protein microarray” 则共计发表 92 823 篇论文。生物芯片应用涉及到分子生物学、生物进化、生物医学 (新药的筛选与合成, 疾病诊断和治疗, 如癌症、早老性痴呆症等病因研究)、农林科学 (农作物育种、食品卫生监督、微生物检测)、环境科学、生化武器侦检、司法鉴定等基础研究和应用领域, 而且以转化医学为目的的研发趋势日益显著。

查询国家知识产权局相关资料^[47], 对蛋白芯片国内外研发及专利申请进行调研, 截至 2024 年 3 月, 发现 “biochip” (生物芯片) 项下国际发明专利计 5 314 项; “protein” + “biochip” (蛋白质 + 生物芯片) 项下国际发明专利计 1 247 项。以人体免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 为例, 发现以 “HIV + protein + biochip” (HIV+ 蛋白质 + 生物芯片) 研发为重点的国际发明专利计 3 项, 分别为《A diagnostic test system for simultaneous, quantitative detection of hiv1 and hiv2 antibodies and / or hiv antigens in human sample material》(申请号 DE20061012885)、《Protein chip for detecting human

immunodeficiency virus HIV1/2 antibody and preparation method therefor》(申请号 WO2021CN-81827) 和《Anti-HIV (human immunodeficiency virus) antibody detection reagent, reagent kit, manufacturing method of reagent, and detecting method of anti-HIV antibody》(申请号 JP2006023-1247)。同理, “生物芯片” 项下中国发明专利计 3 634 项, “蛋白芯片” 项下中国发明专利计 1 021 项。其中, 以 “HIV+ 蛋白芯片” 研发为重点的中国发明专利计 3 项, 分别为《一种艾滋病抗原检测芯片制备方法》(申请号 CN104977413A)、《一种用于检测人类免疫缺陷病毒 HIV1/2 抗体的蛋白芯片及其制备方法》(申请号 CN202010203740.0) 和《多肽芯片及其在艾滋病诊断产品制备中的应用》(申请号 CN202210737190.X)。基于对新一代 HIV 蛋白芯片诊断试剂盒研发考量, 应该建立一种 HIV-1/HIV-2 抗体与 HIV-1 O 亚群抗体及 p24 抗原组合蛋白芯片同步检测方法, 力争缩短艾滋病 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 患者临床筛查和确证实验诊断窗口期。

7 国内蛋白芯片产业化现状

基因水平的变化需要通过蛋白质水平变化而体现出来, 后者可以真实反映出细胞或机体代谢状况。临床对中晚期肿瘤患者的诊断基本上取决于医学影像或穿刺活检。显然, 以分子标志物筛查为基础的体外诊断对肿瘤及其癌前病变患者的早期筛查、早期诊断和早期治疗尤为重要。目前国内蛋白芯片检测试剂盒研发基本上是围绕着对病原体微生物、自身免疫性疾病、人体肿瘤、过敏原和生物毒素的筛查等方面展开。依据国家药品监督管理局注册生物芯片产品和国家知识产权局数据库信息, 截至 2024 年 3 月, 在《注册生物芯片类试剂及蛋白芯片试剂盒》项下, 发现已有蛋白芯片试剂盒国产医疗器械注册产品计 17 项, 蛋白芯片试剂盒国产医疗器械注册产品历史数据累计 12 项。参照国家药品监督管理局《生物芯片类检测试剂注册技术审查指导原则 (食药监办械函 [2013]3 号附件)》, 其中基于蛋白芯片进行艾滋病患者筛查实验和 (或) 确证实验的原创性产业化运作目前尚未开展。

虽然我国生物芯片的基础研究与国际水平差距正在缩小, 但我国生物芯片产业化仍处于起步阶段。生物芯片企业研发大多以下游应用为主, 主营业务为体外诊断。生物芯片企业中产业上游企业较少。

尤其在生物芯片加工工艺关键性技术上依旧存在较大差距，蛋白芯片研发存在诸多难点，如多数企业蛋白芯片研发力度大多不足，研发水平较低，技术薄弱，缺乏规模优势等。这主要归因于蛋白芯片产业技术复杂、投资巨大、研发及审批周期较长、临床应用困难重重等。

毋庸置疑，我国蛋白芯片技术的临床应用存在较大空白区，这也为这一检测技术的推广与普及提

供了难得的商业机遇。《中国蛋白质芯片市场发展态势分析与投资战略预测报告(2023-2030年)》显示了我国在蛋白芯片产业化企业区域分布(图1)、企业注册资本规模(图2)、市场规模(图3)和市场份额(图4)等方面的信息^[48]。

蛋白芯片市场化规模扩大归因于全球人群肿瘤、感染和慢性病发病率的持续性保有量^[49-50]以及得益于临床体液免疫检测与诊断需求的迅猛发展。

我国蛋白芯片相关企业区域分布情况

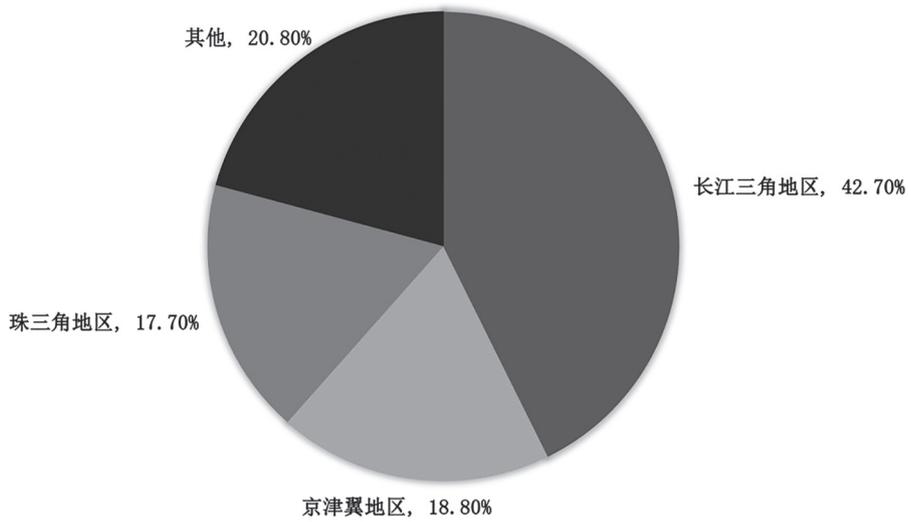


图1 蛋白芯片产业化区域分布

我国蛋白芯片相关企业注册规模分布情况

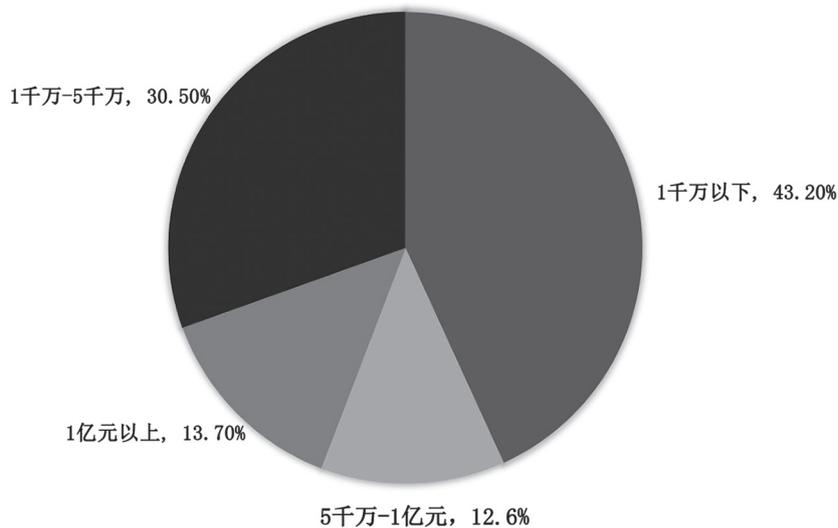


图2 蛋白芯片企业注册资本规模

2018-2022年我国蛋白芯片市场规模及增速

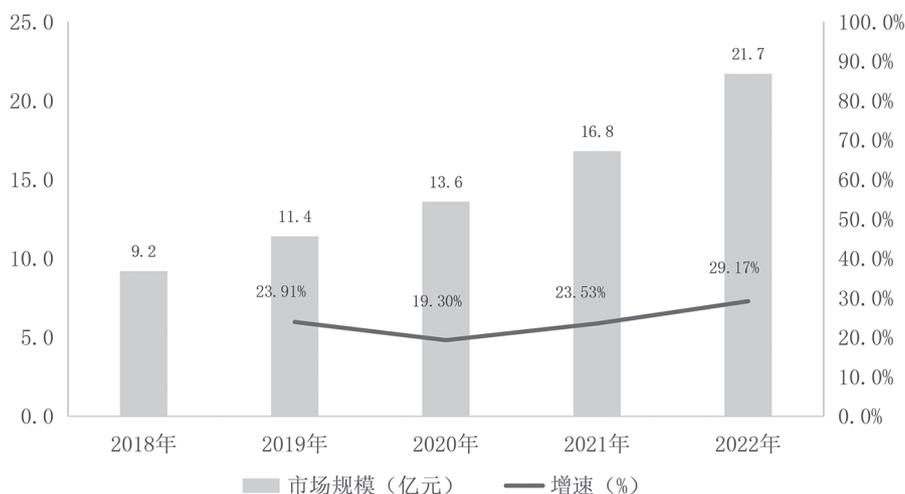


图3 蛋白芯片市场规模与增速

2019-2022年我国蛋白芯片市场份额(按应用领域)

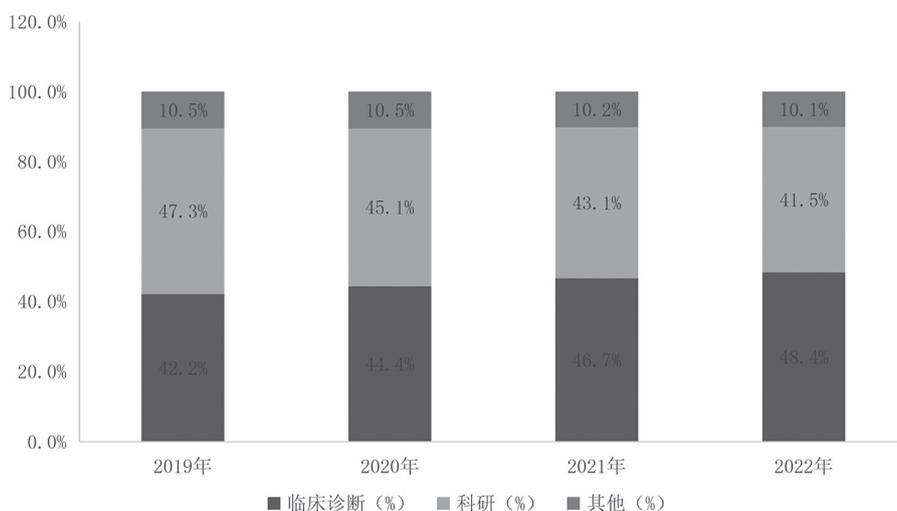


图4 蛋白芯片市场份额变化

2019-2022年间,我国临床检验领域蛋白芯片市场份额主要集中在肿瘤、传染性疾病和过敏原,占比分别为30%、19%和17%左右。国际Mordor Intelligence公司《生物芯片市场规模和份额分析-增长趋势和预测(2024-2029)》市场调研报告显示,芯片实验室和生物芯片市场规模预计从2024年的190.8亿美元增长到2029年的310.4亿美元,2024-2029年复合年增长率为10.22%^[51]。显而易见,对专注于开发新颖和先进蛋白质临床诊断技术的市场投资者来说,在蛋白芯片技术产业化领域的试水需要魄力与耐心。

8 不结束语

技术进步与革新给生物芯片行业带来机遇的同

时,也带来了前所未有的挑战。蛋白芯片检测领域以及与临床其他相关检测技术的兼容与互补是决定蛋白芯片今后能否进入临床应用的切入点。专一性蛋白诊断芯片的研制与试剂盒开发应该与临床专科医院检测需求相匹配。建议设立第三方生物芯片临床检测实验室。在提高蛋白芯片检测特异性、敏感性、可重复性和检测安全性的同时,还应提高临床快速诊断的便利性和降低产品造价。因此,制定与完善行业内蛋白芯片标准化临床检测流程和诊断标准显得尤为重要。工业及生物技术领域的迅速发展给蛋白芯片应用带来丰盛商机,但我国蛋白芯片基础研究和研发成果转化及产业化进程任重道远。

谨以此,献给所有致力于参与、支持和关注生

物芯片技术研发的人们。

[参 考 文 献]

- [1] Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*, 2013, Chapter 22: Unit 22.1
- [2] Du W, Li W, Chen G, et al. Detection of known base substitution mutations in human mitochondrial DNA of MERRF and MELAS by biochip technology. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 2371-6
- [3] Ye L, Huang NL, Du YX, et al. Succinyl- β -cyclodextrin modified gold biochip improved seroimmunological detection sensitivity for Lyme disease. *Anal Chim Acta*, 2017, 953: 48-56
- [4] Huang NL, Ye L, Lv H, et al. A biochip-based combined immunoassay for detection of serological status of *Borrelia burgdorferi* in Lyme borreliosis. *Clin Chim Acta*, 2017, 472: 13-9
- [5] Liu Q, Ye L, Li SG, et al. A simplified direct on-chip forward or reverse immunoassay for evaluating protein-protein interactions in the serum. *Biotechnol J*, 2023, 18: e2200427
- [6] Sjoberg R, Mattsson C, Andersson E, et al. Exploration of high-density protein microarrays for antibody validation and autoimmunity profiling. *N Biotechnol*, 2016, 33: 582-92
- [7] Mesleh A, Ehtewish H, Lennard K, H, et al. High-throughput autoantibody screening identifies differentially abundant autoantibodies in autism spectrum disorder. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1222506
- [8] Haeri M, Gelowani V, Beaudet AL. Chromosomal microarray analysis, or comparative genomic hybridization: a high throughput approach. *MethodsX*, 2016, 3: 8-18
- [9] Diaz RE, Sanchez A, Anton Le Berre V, et al. High-resolution chromatin immunoprecipitation: ChIP-sequencing. *Methods Mol Biol*, 2017, 1624: 1-73
- [10] Liu CG, Calin GA, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc*, 2008, 3: 563-78
- [11] Miersch S, LaBaer J. Nucleic acid programmable protein arrays: versatile tools for array-based functional protein studies. *Curr Protoc Protein Sci*, 2011, Chapter 27: Unit27.2
- [12] Becker AK, Erfle H, Gunkel M, et al. Comparison of cell arrays and multi-well plates in microscopy-based screening. *High Throughput*, 2018, 7: 13
- [13] Elad T, Lee JH, Belkin S, et al. Microbial whole-cell arrays. *Microb Biotechnol*, 2008, 1: 137-48
- [14] Zhang J, Xue J, Luo N, et al. Microwell array chip-based single-cell analysis. *Lab Chip*, 2023, 23: 1066-79
- [15] Wang W, Thiemann S, Chen Q. Utility of SPR technology in biotherapeutic development: qualification for intended use. *Anal Biochem*, 2022, 654: 114804
- [16] He J, Boegli M, Bruzas I, et al. Patterned plasmonic nanoparticle arrays for microfluidic and multiplexed biological assays. *Anal Chem*, 2015, 87: 11407-14
- [17] Unagolla JM, Jayasuriya AC. Recent advances in organoid engineering: a comprehensive review. *Appl Mater Today*, 2022, 29: 101582
- [18] Coarfa C, Grimm SL, Rajapakshe K, et al. Reverse-phase protein array: technology, application, data processing, and integration. *J Biomol Tech*, 2021, 32: 15-29
- [19] Jiang L, Yu Z, Du W, et al. Development of a fluorescent and colorimetric detection methods-based protein microarray for serodiagnosis of TORCH infections. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 376-82
- [20] 张春秀, 梅茜, 顾莹, 等. 制备蛋白质芯片的玻璃表面修饰方法比较. *中华检验医学杂志*, 2003, 26: 219-21
- [21] Bossard-Giannesini L, Cardenas L, Cruguel H, et al. How far the chemistry of self-assembled monolayers on gold surfaces affects their work function? *Nanoscale*, 2023, 15: 17113-23
- [22] Lv H, Ye L, Liu Q, et al. S-S-PEG-COOH self-assembled monolayer on gold surface enabled a combined assay for serological EBV antibody isotypes. *Proteomics Clin Appl*, 2019, 13: e1800067
- [23] Weidong D, Xueling M, Schneider EM. A direct immunoassay assessment of streptavidin- and N-hydroxysuccinimide-modified biochips in validation of serological TNF α responses in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Biomol Screen*, 2008, 13: 515-26
- [24] Schaeferling M, Schiller S, Paul H, et al. Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3097-105
- [25] Du YX, Ye L, Song ZJ, et al. Development of a dendrimer PAMAM-based gold biochip for rapid and sensitive detection of endogenous IFN- γ and anti-IFN- γ IgG in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mol Med Rep*, 2020, 22: 5369-77
- [26] Sutandy FX, Qian J, Chen CS, et al. Overview of protein microarrays. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, Chapter 27: Unit 27.1
- [27] 博奥生物集团有限公司. 集团介绍[EB/OL]. <https://www.capitalbio.com/about.html>
- [28] Li T, Guo L, Wang Z. Microarray based Raman spectroscopic detection with gold nanoparticle probes. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1125-30
- [29] 中国科学院力学研究所. 我所成功研制出“蛋白质芯片生物传感器系统”[EB/OL]. (2006-07-06). https://imech.cas.cn/research/kyjz/200607/t20060706_6685505.html
- [30] Shi W, Qin J, Ye N, et al. Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab Chip*, 2008, 8: 1432-5
- [31] 上海交通大学材料科学与工程学院. 上海交大领衔突破技术壁垒, 量子点液态生物芯片问世[EB/OL]. (2024-03-27). <https://news.sjtu.edu.cn/jdyw/20240327/195234.html>
- [32] Ye L, Huang NL, Ma XL, et al. Establishment of N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate (SMCC) modified biochip enabling concurrent detection of serum infectious antibodies in neuroborreliosis. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 404-10

- [33] Du W, Ma X, Nyman D, et al. Antigen biochips verify and extend the scope of antibody detection in Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59: 355-63
- [34] Huang NL, Ye L, Schneider EM, et al. Development of a novel protein biochip enabling validation of immunological assays and detection of serum IgG and IgM antibodies against *Treponema pallidum* pathogens in the patients with syphilis. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 465-71
- [35] Ye L, Fang YS, Li XX, et al. A simple lectin-based biochip might display the potential clinical value of glycomics in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Ann Transl Med*, 2021, 9: 544
- [36] Ye L, Ji X, Song Z, et al. Clinical value of glycan changes in cerebrospinal fluid for evaluation of post-neurosurgical bacterial meningitis with hemorrhagic stroke patients. *Diagnostics (Basel)*, 2023, 13: 187
- [37] Gao Y, Li SG, Liu Q, et al. Establishment of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono-N-hydroxysuccinimide ester (DOTA-NHS-ester) based lectin microarray for efficiently detecting serum glycans in gastric cancers. *Anal Biochem*, 2020, 597: 113686
- [38] Liu Q, Liu SS, Li SG, et al. Establishment of a protein biochip to detect serum IgG antibodies against IL-2 and soluble CD25 in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 487: 256-63
- [39] Xu F, Ye L, Hu Y, et al. A novel protein biochip screening serum anti-sperm antibody expression and natural pregnancy rate in a follow-up study in Chinese infertility. *Biosci Rep*, 2020, 40: BSR20191769
- [40] Guan L, Wang W, Ji X, et al. T-antigen as a biomarker of progression-free survival in patients with glioblastoma. *Ann Clin Transl Neurol*, 2024, doi: 10.1002/acn3.52082
- [41] Ye L, Hu Y, Xu F, et al. Protein biochip-based semiquantitative detection for plasma leptin. *Proteomics Clin Appl*, 2017, doi: 10.1002/prca.201600073
- [42] Song-Guo Li, Yi Gao, Yan Zhang, et al. Decreased serum adiponectin level affected clinical pathological characteristics of patients with gastric cancer. *Curr Proteomics*, 2016, 13: 1-8
- [43] Du W, Xu Z, Ma X, et al. Biochip as a potential platform of serological interferon $\alpha 2b$ antibody assay. *J Biotechnol*, 2003, 106: 87-100
- [44] Consortium M, Shi L, Reid LH, et al. The microarray quality control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1151-61
- [45] 徐英春, 杜娟, 李金明, 等. 化学发光法微阵列蛋白芯片临床应用专家共识. *中华内分泌代谢杂志*, 2020, 43: 1075-9
- [46] Zandian A, Forsstrom B, Haggmark-Manberg A, et al. Whole-proteome peptide microarrays for profiling autoantibody repertoires within multiple sclerosis and narcolepsy. *J Proteome Res*, 2017, 16: 1300-14
- [47] 国家知识产权局. 智能化专利检索及分析系统[EB/OL]. <https://pss-system.cponline.cnipa.gov.cn/>
- [48] 观研报告网. 中国蛋白质芯片市场发展态势分析与投资战略预测报告(2023-2030年)[EB/OL]. <https://www.chinabaogao.com/baogao/202304/632118.html>
- [49] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-49
- [50] Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, et al. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20: 193-205
- [51] Mordor Intelligence. 生物芯片市场规模和份额分析-增长趋势和预测(2024-2029)[EB/OL]. <https://www.mordorintelligence.com/zh-CN/industry-reports/biochip-product-market>