

一种生物芯片及其制备方法与应用

技术领域

本申请涉及生物化学领域。具体地，本申请涉及一种生物芯片，其制备方法和应用。

背景技术

生物大分子主要包括 DNA、RNA、多肽、多糖等。由于这些生物大分子在医药、农业、食品、材料、环境等领域的重要用途，这些生物大分子的体外合成也成为研究的热点，并且具有巨大的市场前景。自二十世纪五十年代 Todd, Khorana 课题组第一次报道了 DNA 合成 (Michelwn, A. M., Todd, A. R. J. Chem. Soc., 1955; Gilham, P. T., Khorana, H. G., J. A.m. Cliem. Soc., 1958) 以来，DNA 的合成方法经历了长期的发展。目前经典的合成方法包括：八十年代发展起来的柱式合成法，以及九十年代发展起来的基于微阵列的高通量合成法。这些方法基本上为固相合成法，其中，以单个脱氧核糖核苷酸为单元进行合成，并且其合成过程大多涉及基于亚磷酰胺化学法的四步骤循环：即脱保护、偶联、加帽和氧化步骤。由于每一步反应的不完全性、伴随可能发生的副反应（如脱腺苷等）以及反应物浓度随反应进展的降低，随着 DNA 单链的延长，DNA 合成的错误率急剧上升，产量急剧下降。此外，柱式合成法的缺点还在于试剂使用量大且通量低，导致合成成本较高，费时费力。而基于微阵列的合成方法虽然通量较高且试剂使用量少，但是其错误率相对较高，产量低，且不稳定。其他生物大分子如 RNA、多肽、多聚磷酸等，其合成方法与 DNA 的固相合成类似，都是于固相载体上重复进行单循环的化学反应，其合成特点也类似，柱式合成有较低错误率，但是试剂消耗量大且通量低，不利于节省成本，而微阵列合成有通量高、物料使用量少，但是错误率相对较高且不稳定。所以寻找一种能实现高通量、低成本、低错误率的合成芯片尤为重要。

生物芯片，又称蛋白芯片或基因芯片，它们起源于 DNA 杂交探针技术与半导体工业技术相结合的结晶。该技术系指将大量探针分子固定于支持物上后与带荧光标记的 DNA 或其他样品分子（例如蛋白，因子或小分子）进行杂交，通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。生物芯片技术起源于核酸分子杂交。所谓生物芯片一般指高密度固定在互相支持介质上的生物信息分子（如基

因片段、DNA 片段或多肽、蛋白质、糖分子、组织等) 的微阵列杂交型芯片 (micro-arrays), 阵列中每个分子的序列及位置都是已知的, 并且是预先设定好的序列点阵, 是根据生物分子间特异相互作用的原理, 将生化分析过程集成于芯片表面, 从而实现对 DNA、RNA、多肽、蛋白质以及其他生物成分的高通量快速检测。狭义

5 的生物芯片概念是指通过不同方法将生物分子 (寡核苷酸、cDNA、genomic DNA、多肽、抗体、抗原等) 固着于硅片、玻璃片 (珠)、塑料片 (珠)、凝胶、尼龙膜等固相递质上形成的生物分子点阵。因此生物芯片技术又称微阵列 (microarray) 技术, 含有大量生物信息的固相基质称为微阵列, 又称生物芯片。生物芯片在此类芯片的基础上又发展出微流体芯片 (microfluidics chip), 亦称微电子芯片 (microelectronic

10 chip), 也就是缩微实验室芯片。生物芯片同电子芯片一样, 也是集成的, 不过是生物材料的集成。像实验室检测一样, 在生物芯片上检查血糖、蛋白、酶活性等, 是基于同样的生物反应原理。所以生物芯片就是一个载体平台。由于生物芯片具有集成度高、通量大、灵敏度高、携带便携等潜在优点, 因此其被广泛应用于多种场景, 特别是在生物合成和检测方向, 应用前景巨大。。

15 目前代表性的商业化微阵列合成仪, 例如 CustomArray 合成仪, 是将合成反应缩小到微米级别反应孔内, 一张芯片上有上万个反应孔, 这样虽然提高了合成通量也一定程度上减少了原料的消耗, 然而产量低, 电化学反应不易控制, 且错误率较高。另外, 该芯片上还集成了温湿度传感器、控制电路等, 制作工艺非常复杂, 价格相对较为昂贵。Twist 合成仪是利用高速的微量喷墨打印头作为单体等试剂的输送方式,

20 在特殊处理的微米级的硅基芯片通孔上合成 Oligo, 然后再利用匹配的反应器与这些微孔对接, 实现原位的 PCR 和 PCA, 从而直接得到大量的长片段的 DNA 分子。该生物芯片采用特殊硅基材料, 上有特定化学修饰, 通量较大, 需要物理隔离, 此外其芯片尺寸较大 (尺寸与常规 96 孔板相当), 且未进行商业化。Evonetix 电路控制方式的合成仪, 主要利用半导体芯片具有大规模并行控制的特性, 实现了对于不同位点反应的独立控制。然而在实际应用中, 一个重要的问题在于如何避免不同位点反应的相互影响和控制产物的输出。2018 年初, 英国 Evonetix 公司公布了一项基于半导体芯片控制的合成技术。Evonetix 技术的重点在于理论上接近十亿个位点的 Oligo 合成和可实时监测的高保真 DNA 纠错组装技术, 其控制合成过程的原理如下: 在具有特殊设计的大规模可寻址的合成位点的封闭腔室内, 加入低熔点的可反复加热的阻断材料

25 (例如, 正二十四碳烷), 合成仪可以利用电路信号控制每个位点的通电与否, 进而

30

选择是否加热该位点，在加热情况下，该位点上的特殊材料可吸附在该位点阻止后续通入的试剂在该位点上反应，如果后续需要在该位点进行合成，可用溶剂将该材料清洗掉，使得该位点暴露出来以进行合成反应，这样就实现了每个位点反应的单独控制。但该芯片集成除了特殊化学修饰外，还集成了电路控制，制作工艺较为复杂。

5 因此，本领域亟须新的技术突破，尤其是制作工艺简单，价格低廉，多检测通量，可重复利用，有识别功能的生物芯片。

发明概述

10 本发明提出了一种生物芯片，其制备方法和应用。本发明的生物芯片能够应用于DNA、RNA、多肽等生物大分子合成与检测，抗体筛选，抗原识别等，具有很大的应用前景。

在一个方面，本申请提供了一种生物芯片，所述芯片上携带化学实体和编码，其中所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。

15 在另一个方面，本申请提供了制备本发明的生物芯片的方法，所述方法包括以下步骤：

- 1) 对芯片进行编码；
- 2) 对芯片进行预处理；
- 3) 对芯片表面进行硅烷化处理；
- 4) 对芯片表面进行化学修饰；和
- 20 5) 任选地，对所述化学修饰进行检测分析或定量。

在另一个方面，本申请提供了本发明的生物芯片在DNA、RNA、多肽等生物大分子的合成中的应用。

在另一个方面，本申请提供了本发明的生物芯片在生物检测中的应用。

25 附图概述

图1示意性描述了本发明的可识别的二维码芯片的实例。

图2示意性描述了本发明的芯片用于合成DNA的流程。

图3示意性描述了本发明的芯片用于合成多肽的流程。

图4A显示了实施例6中实验1合成的T30产物的HPLC谱图。

30 图4B显示了实施例6中实验2合成的T30产物的HPLC谱图。

图 4C 显示了实施例 6 中实验 3 合成的 T30 产物的 HPLC 谱图。

图 4D 显示了实施例 6 中实验 4 合成的 T30 产物的 HPLC 谱图。

图 4E 显示了实施例 6 中实验 5 合成的 T30 产物的 HPLC 谱图。

图 4F 显示了实施例 6 中 T30 标样的 HPLC 谱图。

5 图 5 显示了实施例 7 中合成的产物的凝胶电泳图, 其中 Ctrl: 标准合成引物对照; 泳道 1-3: Mix1-3。

发明详述

在本申请中, 除非另有定义, 否则本文所用的全部技术和科学术语都具有本申请
10 所属领域普通技术人员所通常理解的含义。在本申请的实施方案中, 可以使用与本文所述的那些方法和材料类似或等同的方法和材料, 下文仅仅是描述了例示性的适合的方法和材料。将所有公开出版物、专利申请、专利和其它参考文献并入本文作为参考。此外, 所述材料、方法和实施例仅仅是示范性的而非限制性的。同时, 为了更好地理解本发明, 本申请中也提供了相关术语的定义和解释。当本申请中提供的术语定义和
15 解释与本申请所属领域普通技术人员所通常理解的意思相冲突时, 以本申请提供的术语定义和解释为准。

生物芯片

在一个方面, 本申请提供了一种生物芯片, 所述芯片上携带化学实体和编码, 其
20 中所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。

如本领域技术人员已知, 芯片的基片由适合用作芯片的任何材料制备而成, 所述材料不会不利地影响反应试剂的活性或者与反应试剂发生不期望的副反应。优选地, 芯片由惰性材料制成。在某些优选的实施方案中, 所述芯片由选自下列的材料制成: 硅片(硅晶)、玻璃片(珠)、陶瓷、金属片、塑料片(珠)、凝胶、尼龙膜, 或其
25 任何组合, 优选为硅片。在一个实施方案中, 芯片由多孔玻璃制成, 其粒径可为 5 μ m-2000 μ m 中的任意一种, 更进一步地, 其粒径为 25 μ m, 50 μ m, 100 μ m, 200 μ m, 500 μ m 中的任意一种; 其孔径可为 200 $\text{\AA}$ -5000 $\text{\AA}$ 中的任意一种, 更进一步地, 其孔径可为 500 $\text{\AA}$, 1000 $\text{\AA}$, 1500 $\text{\AA}$, 2000 $\text{\AA}$, 3000 $\text{\AA}$ 中的任意一种。此类芯片可以具有任何期望的形状。例如, 芯片可以是片状、长方体、圆柱体、球体等形状, 优选的, 芯片
30 为正方形的片状。在一个具体实施方式中, 生物芯片是微型 DNA 合成用芯片, 其尺

寸为 2 mm*2 mm, 甚至是 1 mm*1 mm、0.5 mm*0.5 mm 或更小。在某些优选的实施方案中, 本发明的芯片可回收重复利用。

编码

5 本发明的芯片具备可识别特性。为此, 需要对芯片进行编码, 其为芯片提供特异性信号。芯片上的特异性信号可以为磁信号、电信号、识别码等, 优选的, 特异性信号为二维码。

因此, 在具体实施方案中, 本发明的生物芯片携带编码, 所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。应当理解, 此处的“编码”意指, 任何可用于区分和鉴别芯片身份的特征。此类特征包括但不限于, 数字, 符号, 图形, 识别码例如条形码, 二维码, 优
10 选为二维码。

在优选的实施方案中, 芯片上携带的编码为二维码。维条码/二维码(2-dimensional bar code)是用某种特定的几何图形按一定规律在平面(二维方向上)分布的黑白相间的图形记录数据符号信息的; 在代码编制上巧妙地利用构成计算机内部逻辑基础的“0”、“1”比特流的概念, 使用若干个与二进制相对应的几何形体来表示文字数值信息, 通过图象输入设备或光电扫描设备自动识读以实现信息自动处理。它具有条码技术的一些共性: 每种码制有其特定的字符集; 每个字符占有一定的宽度; 具有一定的校验功能等。同时还具有对不同行的信息自动识别功能、及处理图形旋转变换点。二维码具备内置的纠错功能, 能够在代码损坏或被涂抹的情况下恢复数据。它可以采用数学
15 形式的纠错 (Reed- Solomon) 来恢复数据。

在某些优选的实施方案中, 芯片上携带的编码为至少两个或更多个特征的组合。例如, 芯片上携带的编码可以为识别码(例如条形码或二维码)与电信号的组合, 识别码(例如条形码或二维码)和光信号(例如荧光)的组合, 识别码(例如条形码或二维码)与数字的组合, 识别码(例如条形码或二维码)与 RFID 标签的组合, RFID
25 标签与电信号的组合, RFID 标签和光信号(例如荧光)的组合, RFID 标签与数字的组合, 数字和光信号(例如荧光)的组合, 或数字、图形和识别码(例如条形码或二维码)的组合等等。

编码的一个重要功能是由于用于区分和鉴别芯片。表述“编码与芯片具有唯一对应关系”意指, 每一个芯片对应于一个独特的编码。换言之, 各个芯片所携带的编码是彼此不同的。由于每一个芯片与其所携带的编码具有唯一对应关系, 因此, 可通过识别
30

所述编码，方便地区分多个芯片，或者从多个芯片中快速、方便地寻找和鉴别感兴趣的芯片。

在本发明的方法中，可使用各种方式来识别芯片上携带的编码。在某些优选的实施方案中，使用检测器（例如，通过识别数字，符号，图形，识别码（例如条形码，
5 二维码），**RFID** 标签，光信号（例如荧光，化学发光，拉曼光谱），量子点，磁信号，电信号，或其任何组合的检测器）来检测芯片上携带的编码，并使用处理器来分析所述检测器检测到的信号，从而识别芯片的身份（编码）。用于检测/识别数字，符号，图形，条形码，二维码，**RFID** 标签，荧光，发光，量子点，拉曼光谱等各种方法和仪器是本领域技术人员熟知的，包括但不限于光信号识别器、磁信号识别器、电
10 信号识别器、图像识别器、或其任何组合。例如，此类仪器可以为，二维条码检测仪、条形码检测仪、或 **RFID** 标签阅读器等。

芯片表面化学修饰

在芯片上添加了编码之后，对芯片的表面进行化学修饰，以达到该芯片能满足不
15 同功能需求的目的。芯片表面修饰的分子的具体类型取决于芯片的实际应用。例如，用于合成生物大分子的芯片，其表面修饰有能够起始合成反应的分子；用于检测抗原的芯片，其表面修饰有特异性的抗体；用于筛选抗体的芯片，其表面修饰有特异性的抗原。

A. 用于生物大分子合成

20 要在芯片表面合成不同种类的生物大分子，如 **DNA**、**RNA**、多肽等，则每一种芯片需要其对应的芯片表面化学修饰；此外，还需要保证芯片表面有足够多的修饰分子，同时需要保证芯片表面修饰分子分布均匀，避免信号分布不均一。

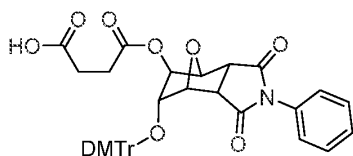
为此，在一个具体方面，本申请提供了一种生物芯片，所述芯片上携带化学实体和编码，其中所述化学实体能够与反应试剂发生反应从而将反应试剂中的单体连接至
25 所述化学实体的末端，所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。

如本文所使用的，本发明的生物芯片是化学修饰的，即生物芯片的表面通过连接化学实体而进行了修饰。在具体实施方案中，所述化学实体为 **linker** 分子（连接分子），其能够与反应试剂发生反应（偶联反应或连接反应），从而将反应试剂中的单体连接至所述 **linker** 分子的末端。

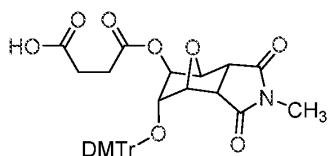
30 用于合成核酸（**DNA**/**RNA**）的生物芯片以 **linker** 分子进行修饰，其中所述 **linker**

分子优选为始端为带有可与氨基反应的官能团，末端为带有酸不稳定性保护基的羟基，用酸处理时可将羟基保护基去除以暴露出羟基，中间可以是酯基、脂基、硫酯基、邻硝基苄基、香豆素基团、羟基、巯基、硫醚基、羧基、醛基、氨基、胺基、酰胺基、烯基、炔基中任何一种或多种官能团的化合物，优选的始端官能团为羧基，末端羟基保护基是三苯甲基，例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基（DMT），可以用二氯乙酸、三氯乙酸或三氟乙酸在有机溶剂(如二氯甲烷，乙腈)中的溶液处理时将其去除。在优选实施方案中，Linker 分子为：DNA 合成完毕后，氨解处理时能断开、易脱掉的分子，优选的 Linker 分子为 Universal Linker，其中 Universal Linker 是指外-氮-苄基-5-（琥珀酰氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺、外-氮-甲基-5-（琥珀酰氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺 或 外-氮-甲基-5-（二甘醇氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺。Universal Linker 的化学结构式如下：

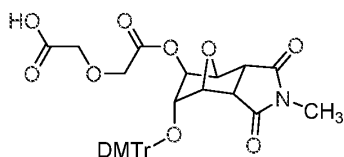
（1）外-氮-苄基-5-（琥珀酰氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺



（2）外-氮-甲基-5-（琥珀酰氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺



（3）外-氮-甲基-5-（二甘醇氧基）-6-二甲基-7-氧杂双环[2.2.1]庚烷-2- 3-二甲酰亚胺



用于合成多肽的生物芯片以化学实体进行修饰，其中所述化学实体为固相法合成多肽的高分子载体（树脂）。这些树脂只有导入反应基团，才能直接连上第一个氨基

酸（初始氨基酸）。根据所导入反应基团的不同，把这些树脂及树脂衍生物分为氯甲基树脂、羧基树脂、氨基树脂或酰肼型树脂。BOC 合成法通常选择氯甲基树脂，如 Merrifield 树脂；FMOC 合成法通常选择羧基树脂如王氏树脂、2-Cl(Trt)-Clresin。起始氨基酸的固定主要是通过保护氨基酸的羧基同树脂的反应基团之间形成的共价键来实现的，形成共价键的方法有多种：氯甲基树脂，通常先制得保护氨基酸的四甲铵盐或钠盐、钾盐、铯盐，然后在适当温度下，直接同树脂反应或在合适的有机溶剂如二氧六环、DMF 或 DMSO 中反应；羧基树脂，则通常加入适当的缩合剂如 DCC 或羧基二咪唑，使被保护氨基酸与树脂形成共酯以完成氨基酸的固定；氨基树脂或酰肼型树脂，则是加入适当的缩合剂如 DCC 后，通过保护氨基酸与树脂之间形成的酰胺键来完成氨基酸的固定。

在优选的用于合成多肽的生物芯片的技术方案中，用于修饰芯片的化学实体（linker 分子）为羧基树脂，即末端含有可与羧基缩合反应的基团，如王氏树脂，2-Cl(Trt)-Clresin 等，或类似化学结构的分子，优选为始端带有可与氨基反应的官能团、末端带有可与氨基酸单体羧基偶联反应的官能团，最终多肽合成完毕后，用酸处理时能解离的 linker 分子，中间可以是酯基、脂基、硫酯基、邻硝基苄基、香豆素基团、羟基、巯基、硫醚基、羧基、醛基、氨基、胺基、酰胺基、烯基、炔基中任何一种或多种官能团的化合物，如 4-羟甲基苯甲酸，4-氯甲基苯甲酸，或取代的 4-羟甲基苯甲酸，4-氯甲基苯甲酸等，优选的 linker 分子为 4-羟甲基苯甲酸。

B. 用于生物检测

在另一个具体方面，本申请提供了一种生物芯片，所述芯片上携带特异性抗原/抗体和编码，所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。例如，用于检测抗原的芯片，其表面修饰有特异性的抗体；用于筛选抗体的芯片，其表面修饰有特异性的抗原。

生物芯片的制备

在另一个方面，本发明提供了一种生物芯片的制备方法，所述方法包括以下步骤：

- 1) 对芯片进行编码；
- 2) 对芯片进行预处理；
- 3) 对芯片的表面进行硅烷化处理；
- 4) 对芯片的表面进行化学修饰；
- 5) 任选地，对所述化学修饰进行检测或定量分析。

如本发明所使用的，“对芯片进行编码”，意指为芯片添加一个独特的身份标签。应当理解，此处的“编码”意指，任何可用于区分和鉴别芯片身份的特征。此类特征包括但不限于，数字，符号，图形，识别码，例如条形码，二维码。在优选的实施方案中，“对芯片进行编码”包括在芯片上添加二维码，该二维码与所述芯片是唯一对应的。5 换言之，不同的芯片上添加的二维码是彼此各不相同的。

在具体实施方式中，本发明采用激光打印的方式，将二维码打印在芯片上，作为可识别信号。为了适应不同的应用场景，需要设计制作不同抛光及二维码类型的芯片，即不抛光单面二维码、不抛光双面二维码、单抛单面二维码、单抛双面二维码、双抛10 单面二维码、双抛双面二维码芯片，还可以在特殊需要的应用场景对芯片表面进行特殊处理，如磨砂或纳米级点位修饰以增加表面积，以确保二维码芯片的识别快速、准确、高效。

以 DNA 合成用二维码芯片制作及识别为例，本发明采取了如下技术：本发明提出的用于 DNA 合成的芯片尺寸可根据应用情况调整，例如可以是 2 mm*2 mm，甚至是15 是 1 mm*1 mm、0.5 mm*0.5 mm 或更小，最小可到亚毫米级别（实例请见附图 1）。由于芯片尺寸微小，在打码模式的选择上，采用了打点二维码模式，为了确保切割质量，无毛刺，本发明提出的二维码芯片采用机械切割。为了保证打码深度，选择红光的激光，保证点位深且清楚，即便在后续长时间使用过程中有些许磨损，仍然不会影响二维码的识别。为了解决大量芯片使用过程中不可避免的黏连问题，采用震荡反应20 容器，在保证使用过程中高效率的同时，不影响芯片表面芯片反应的均一性。芯片的识别，即芯片拍照、放大、识别过程。为了更好地进行芯片识别，在打码时要保证二维码中的点尽量大、尽量深。

在具体的实施方式中，可首先将多个彼此不同的二维码等间距打印在整张硅片上，例如二维码大小可以是 1mm*1mm。然后将硅片切割为 2mm*2mm 的芯片，切割25 时确保二维码位于每张芯片的中央。

如本文所使用的，“对芯片进行预处理”是为了达到清洁芯片表面的目的，同时暴露出更多羟基，提高表面反应活性。所述预处理步骤包括酸处理、碱处理、超声、等离子清洗、丙酮清洗或其组合，其中酸可选自硫酸、盐酸、磷酸、食人鱼液等，碱可选自氢氧化钠、氢氧化钾等。在优选的实施方案中，预处理方法为先进进行酸处理，然后30 后进行等离子清洗；更优选地，预处理方法为先进进行氢氧化钠处理，然后进行去离子

清洗和丙酮清洗。

如本文所使用的，“对芯片表面进行硅烷化处理”是指进行芯片表面氨基修饰。硅烷化过程可采用气相沉积法（CVD）、溶液浸泡、简易负压气相沉积法等一种或多种处理，其中硅烷化试剂为一端为烷氧基硅基团，一端为氨基的试剂，可选自 APTMS、
5 APTES 等，优选的，采用 APTMS 为硅烷化试剂，进一步优选地，采用 50% 的硅烷化试剂。在优选的实施方案中，采用简易负压气相沉积法，在能保证高效硅烷化的同时，又能保证操作的简便，保证表面修饰的均一性。

如本文所使用的，“对芯片表面进行化学修饰”意指在芯片表面连接化学实体，化学实体的具体种类由芯片的具体用途决定。

10 当生物芯片用于合成核酸（DNA/RNA）时，所述化学实体优选为始端带有可与氨基反应的官能团、末端带有酸不稳定性保护基的羟基的 linker 分子，用酸处理时可将羟基保护基去除以暴露出羟基，中间可以是酯基、脂基、硫酯基、邻硝基苄基、香豆素基团、羟基、巯基、硫醚基、羧基、醛基、氨基、胺基、酰胺基、烯基、炔基中任意一种或多种官能团的化合物，优选的始端官能团为羧基，末端羟基保护基是三苯
15 甲基，例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基（DMT），可以用二氯乙酸、三氯乙酸或三氟乙酸在有机溶剂（如二氯甲烷，乙腈）中的溶液处理时将其去除。

当生物芯片用于合成多肽时，所述 linker 分子为优选羧基树脂，即末端含有可与羧基缩合反应的基团，如王氏树脂，2-Cl(Trt)-Clresin 等，或类似化学结构的分子，优选为始端带有可与氨基反应的官能团、末端带有可与氨基酸单体羧基偶联反应的官
20 能团，最终多肽合成完毕后，用酸处理时能解离的 linker 分子，中间可以是酯基、脂基、硫酯基、邻硝基苄基、香豆素基团、羟基、巯基、硫醚基、羧基、醛基、氨基、胺基、酰胺基、烯基、炔基中任意一种或多种官能团的化合物，如 4-羟甲基苯甲酸，4-氯甲基苯甲酸，或取代的 4-羟甲基苯甲酸，4-氯甲基苯甲酸等，优选的 link 分子为 4-羟甲基苯甲酸。

25 需要说明的是，生物芯片制备的步骤顺序，优选为先进行编码，后进行表面化学修饰，以便更好地保护修饰后的生物芯片表面，有利于生物芯片的后续应用。例如，当采用激光打印的方式将二维码打印在芯片上之后，经过预处理与硅烷化处理，最后再进行芯片表面化学修饰；如果将顺序颠倒，在对芯片进行预处理与硅烷化处理之后，进行芯片表面化学修饰，最后采用激光打印的方式将二维码打印在芯片上，则容易在
30 激光打印过程中对芯片表面修饰的化学分子造成破坏，影响芯片后续的使用。

易于理解的是，在进行目标化合物合成时，芯片上携带的化学实体（linker 分子）每一次接触反应试剂，都将使得反应试剂中的单体连接至所述 linker 分子的末端，使其延长。重复进行接触和反应，即可不断延长合成的化合物的长度，直至获得目标化合物。

- 5 在某些优选的实施方案中，在完成芯片上的合成反应后需要能够方便地将合成产物（目标化合物）从芯片上切割/分离。

例如，当目标化合物为 DNA 时，可通过氨解反应将目标化合物从芯片上切割下来。在某些优选的实施方案中，用于进行氨解反应的试剂可以选自氨水，氨气，甲胺，或其任何组合。在某些优选的实施方案中，氨解反应可以在选自下列的温度下进行：
10 室温到 120℃，例如，室温到 60℃，60-90℃，90-120℃。在某些优选的实施方案中，氨解反应可以进行 0.5h-48h，例如 0.5-2h，2-5h，5-10h，10-18h，18-24h。在某些优选的实施方案中，在氨解反应后，对目标化合物（DNA）进行分离和纯化，例如，可使用 MOP，PAGE，PAGE Plus，HPLC 或其任何组合对目标化合物（DNA）进行分离和纯化。

15 例如，当目标化合物为 RNA 时，可通过氨解反应将目标化合物从芯片上切割下来。在某些优选的实施方案中，用于进行氨解反应的试剂可以选自氨水，氨气，甲胺，或其任何组合。在某些优选的实施方案中，氨解反应可以在选自下列的温度下进行：室温到 120℃，例如，室温到 60℃，60-90℃，90-120℃。在某些优选的实施方案中，氨解反应可以进行 0.5h-48h，例如 0.5-2h，2-5h，5-10h，10-18h，18-24h。在某些优选的实施方案中，在氨解反应后，对目标化合物（RNA）进行分离和纯化，例如，可使用 PAGE，PAGE Plus，HPLC 或其任何组合对目标化合物（RNA）进行分离和纯化。在某些优选的实施方案中，分离和纯化在无 RNase 的环境中进行。例如，在某些优选的实施方案中，采用 HPLC 纯化，并且用于分离和纯化的所有试剂和设备都不含 RNase（即 RNase-free），避免 RNase 污染。

25 例如，当目标化合物为多肽时，可通过加入洗脱剂将目标化合物从芯片上切割下来。在某些优选的实施方案中，用于进行洗脱的试剂（洗脱剂）可以选自氢氟酸、三氟乙酸，四氟硼酸，或其任何组合。在某些优选的实施方案中，可以在选自下列的温度下进行洗脱反应：室温到 120℃，例如，室温到 60℃，60-90℃，90-120℃。在某些优选的实施方案中，洗脱反应可以进行 0.5h-48h，例如 0.5-2h，2-5h，5-10h，10-18h，
30 18-24h。在某些优选的实施方案中，在洗脱反应后，对目标化合物（多肽）进行分离

和纯化。例如，可使用高效液相色谱、亲和层析、毛细管电泳，或其任何组合对目标化合物（多肽）进行分离和纯化。

任选地，在修饰步骤之后，为了表征芯片的修饰质量，可采取多种技术手段对所述化学修饰进行检测或定量分析。例如，可首先通过加入酸对 linker 分子末端的带有 DMT 保护的羟基进行脱保护，对收集溶液的颜色进行定性观测，溶液为红色表明 Linker 连接成功，即芯片修饰成功。进一步的，对收集的红色溶液进行定量，即通过紫外可见分光光度计进行 DMT 定量，确定修饰完毕的芯片表面 Linker 的分子数，以确定芯片表面分子载量。最后将脱掉 DMT 的芯片与 6-FAM 的荧光单体偶联，将偶联完毕的芯片清洗干净后置于荧光显微镜下观测荧光，通过荧光的有无、强度及均一性，可定性该修饰芯片的质量，即芯片表面荧光强度高，同时荧光信号均一，表明该修饰后的芯片质量好。

生物芯片用于核酸合成

本发明的芯片可用于合成核酸（DNA/RNA）。用于固相合成核酸的一般方法和原理是本领域技术人员所熟知的。通常而言，核酸的固相合成一般都采用固相亚磷酰胺三酯法，其通过多个轮次的循环反应，将多个核苷酸逐个、按顺序地连接至芯片上，从而获得包含多个核苷酸的目标产物，其中，每个轮次的循环反应可涉及 4 个步骤：即，脱保护，活化/偶联，盖帽，和氧化。

在 DNA/RNA 合成的具体实施技术方案中，根据合成所需单体的种类及合成通量要求，首先选择芯片编码方式和制定识别分选方案，制作不同通量的 DNA/RNA 合成用生物芯片，和相应的识别器、分选器、及控制芯片移动、试剂液体引入和引出的驱动装置。通过识别器识别芯片上的特异性信号，将其分选入含有相应的偶联单体的“反应池”中，然后通过控制驱动器将脱保护试剂引入反应池中进行脱保护，待反应完毕后引出脱保护试剂，然后再根据反应池对应的待偶联的单体，引入偶联试剂进行偶联，引出偶联试剂，最后再依次引入盖帽试剂与氧化试剂，分别进行盖帽与氧化，至此一个循环结束。通过程序设定，不断重复该循环直至合成完毕，最终可集中收集芯片获得 DNA/RNA 库或利用识别分选技术以获得单独 DNA/RNA 片段（流程示意图请见图 2）。

在多肽合成的具体实施方案中，根据多肽合成所需氨基酸单体的种类及合成通量

要求，首先选择芯片编码方式和制定识别分选方案，制作不同通量的多肽合成用生物芯片，和相应的识别器、分选器、及控制芯片移动、试剂液体引入和引出的驱动装置。通过识别器识别芯片上的特异性信号，将其分选入含有相应的偶联氨基酸单体的“反应池”中，然后通过控制驱动器将脱保护试剂引入反应池中进行脱保护，待反应完毕后引出脱保护试剂，然后再根据反应池对应的待偶联的氨基酸单体，引入偶联试剂进行偶联，引出偶联试剂，至此一个循环结束。通过程序设定，不断循环直至合成完毕，最终可集中收集芯片获得多肽库或利用识别分选技术以获得单独多肽片段（流程示意图请见附图 3）。

10 生物芯片用于生物检测

本发明所述的生物芯片，可用于生物检测，如抗原、抗体筛选、疾病诊断等，尤其是可同时进行多生物样本检测。抗原抗体有特异性结合力，即一种抗原能特异性的与对应的抗体进行亲和性结合，利用这种特异性亲和力，即可进行特异性的抗原抗体筛选。常规的生物检测芯片，只能同时检测一种生物样本，即如果要筛选抗体 A，将待筛选的抗体库通过有特异性抗原 A 修饰的芯片，然后洗脱、解吸附来获得目标抗体 A。或在单一芯片上修饰多种抗原位点，以达到高通量筛选的目的，但是此种修饰显然较为复杂，且不易区分。

A 抗体筛选

本发明的生物芯片，可实现简单高通量的抗体筛选。下面以可筛选 1000 种抗体的修饰芯片为例，描述具体的技术应用方案：

将 1000 片芯片（芯片尺寸为 2 mm*2 mm，甚至是 1 mm*1 mm、0.5 mm*0.5 mm 或更小）混合在一起，每一张芯片上修饰有特异性的抗原，然后将抗体库的溶液加到混合后的芯片上，并使其没过，由于抗原和抗体有特异性结合作用，接触反应一段时间后，特异性的抗体会与其相应的芯片上的抗原结合，然后移除抗体库，并加入清洗试剂清洗芯片，以确保残留的未结合的抗体移除干净。随后根据芯片上标识的二维码，将 1000 片芯片分选到 1000 个不同的位点反应孔中，然后向每个盛放有芯片的反应孔中加入解吸附试剂，将芯片上结合的抗体与芯片上的抗原解吸分开，并反复多次以确保抗体完全解吸附。然后将 1000 个反应孔中的溶液再单独转移到新的 1000 个反应孔中，即可以同时筛选得到相应的 1000 种特异性抗体，最后对得到的抗体进行分析表征，对有阳性结果显示的抗体进行纯化以得到高纯度的抗体。通过以上技术方案，即

可快速高效的得到大量高纯度的特异性抗体，完成抗体的高通量筛选。

本发明提出的抗体筛选方面的应用，由于经抗原修饰的芯片体积微小，并且制作简单，可大批量生产，同时配合本发明提出的通过芯片上标记二维码进行快速、高效的识别和分选，该抗体筛选的技术应用的通量可达上万甚至百万级别。

5 **B 抗原检测**

本发明的生物芯片，可实现简单高通量的抗原检测。下面以可检测 1000 种抗原的修饰芯片为例，描述具体的技术应用方案：

将 1000 片芯片（芯片尺寸为 2 mm*2 mm，甚至是 1 mm*1 mm、0.5 mm*0.5 mm 或更小）混合在一起，每一张芯片上修饰有特异性的抗体，然后将抗原库的溶液加到混合后的芯片上，并使其没过，由于抗原和抗体有特异性结合作用，接触反应一段时间后，特异性的抗原会与其相应的芯片上的抗体结合，然后移除抗原库，并加入清洗试剂清洗芯片，以确保残留的未结合的抗原移除干净，随后根据芯片上标识的二维码，将 1000 片芯片分选到 1000 个不同的位点反应孔中，然后向每个盛放有芯片的反应孔中加入解吸附试剂，将修饰芯片上结合的抗原与芯片上的抗体解吸分开，并反复多次以 15 以确保抗体完全解吸附，然后将 1000 个反应孔中的溶液再单独转移到新的 1000 个反应孔中，即可以同时筛选得到相应的 1000 种特异性抗原，最后对得到的抗原进行分析表征确认。通过以上技术方案，即可快速高效的完成抗原的高通量检测。

本发明提出的技术应用，由于其芯片体积微小，并且制作简单，可大批量生产，同时配合本发明提出的通过在芯片上打印二维码进行快速、高效的识别和分选，该抗原检测的技术应用的通量可达上万甚至百万级别。

本发明通过以下多个实施例进行详细展开说明，其中实施例中使用到的主要试剂与耗材如下：

合成固相载体：常规芯片、100 nm 氧化硅片、300 nm 氧化硅片、磨砂石英芯片、透明石英芯片，尺寸：2*2*0.45 mm

25 ACN（乙腈）：北京迪纳兴科

去保护试剂：3% TCA Deblock，北京迪纳兴科

活化剂：0.25 M Activator，北京迪纳兴科

亚磷酰胺单体 A、T、C、G: Sigma Aldrich

氧化剂：0.05 M Oxidizing，北京迪纳兴科

30 CAP A: 乙酸酐/吡啶/四氢呋喃 1/1/8，北京迪纳兴科

CAP B: 17.6% w/v 氮-甲基咪唑/乙腈, 北京迪纳兴科

氨水: 国药

T30 标样: 深圳国家基因库

TA 克隆试剂盒: pMDTM19-T, TaKaRa

5 **实施例 1. 用于合成核酸 (DNA/RNA) 的芯片的制备**

首先, 委托广瑞特电子进行定制化的二维码芯片打印与切割。采用红光激光打印, 二维码大小为 1mm*1mm, 将打印有二维码的裸硅片切割为 2mm*2mm*0.45mm 的微型芯片, 每个微型芯片居中打印有特异性的二维码, 使用食人鱼液对已经进行二维码打印、切割的芯片进行预处理, 然后进行等离子清洗。之后, 采用 APTMS 通过简易
10 负压气相沉积法对预处理后的芯片进行硅烷化处理。最后, 采用购自芜湖华仁科技的 **Universal Linker** 偶联于芯片上。

之后, 通过加入酸对 **linker** 分子末端的带有 **DMT** 保护的羟基进行脱保护, 对收集溶液的颜色进行定性观测, 溶液为红色表明 **Linker** 连接成功, 即芯片修饰成功。然后, 对收集的红色溶液进行定量, 即通过紫外可见分光光度计进行 **DMT** 定量, 确定
15 修饰完毕的芯片表面 **Linker** 的分子数, 以确定芯片表面分子载量。或将脱掉 **DMT** 的芯片与 **6-FAM** 的荧光单体偶联, 将偶联完毕的芯片清洗干净后置于荧光显微镜下观测荧光, 通过荧光的有无、强度及均一性, 可进一步定性该修饰芯片的质量, 即芯片表面荧光强度高, 同时荧光信号均一, 表明该修饰后的芯片质量好。

具体修饰步骤如下:

20 **1、配制 100mL 0.1 M NaOH 溶液**, 分装于两个 100 mL 烧杯中, 每个烧杯放入 2000 片二维码常规芯片, 手摇震荡清洗 3 min, 首先使用去离子水清洗三次, 丙酮清洗三次, 晾干, 使芯片表面洁净以便于后续进行硅烷化修饰。

2、配制 100 mL 50%的硅烷化试剂, 分装于两个 100 mL 烧杯中, 每个烧杯放入 2000 片清洗过的二维码芯片, 于超声仪超声 30 min, 丙酮清洗 5 次, 晾干。

25 其中, 50%硅烷化试剂为: 1% (APTES: PTES=1:1) 的丙酮溶液, 以总体积 100mL 为例, 各组分为 APTES 500 μ L、PTES 500 μ L 和丙酮 99mL。

3、于干燥箱 80°C 干燥 10 min, 取出待后续实验。

4、取 1000 mg Linker、800 mg HATU、2000 μ L DIPEA 加入 100 mL 乙腈中, 摇匀后分装于两个 50 mL 离心管中, 每个离心管放入 2000 片硅烷化的二维码芯片, 于
30 垂直搅拌仪搅拌过夜, 反应完成后, 收集芯片, 分别用乙腈、丙酮清洗三次, 晾干。

之后，取出 30 片修饰的二维码芯片，使用 TCA deblock 洗脱芯片表面 DMT，使用紫外可见分光光度计测定 DMT 的浓度，测定修饰二维码芯片的 Linker 接枝密度。

5、将修饰完毕，干燥后的芯片收集至 50 mL 离心管中，待用。

与此同时，比较了 1%、100%硅烷化试剂对芯片修饰的影响，步骤同上，只是分别使用 1%、100%硅烷化试剂替代 50%硅烷化试剂，其中 1%硅烷化试剂为：1%（APTES：PTES=1:99）的丙酮溶液，以总体积 100mL 为例，各组分为 APTES 10μL、PTES 990μL 和丙酮 99mL，100%硅烷化试剂为：1%（APTES：PTES=1:0）的丙酮溶液，以总体积 100mL 为例，各组分为 APTES 1000μL、PTES 0μL 和丙酮 99mL。最终获得三种不同硅烷化配比的修饰芯片的 Linker 接枝密度，结果如表 1 所示。

考虑到芯片表面的 Linker 接枝密度，与实际目标化合物的合成效果并不是正相关关系，即不是接枝密度越高，芯片合成效果越好，因为这其中涉及到分子拥挤的问题。为了能够保证芯片表面分子数足够多的同时，又需要同时权衡芯片在实际合成使用过程中，连接上的寡核苷酸链不会太拥挤，以至于影响最终的合成质量及长度。因此，本实施例在摸索最佳硅烷化试剂配比时，需要综合考虑 Linker 接枝密度、合成单步效率以及产物纯度等因素。本实施例中，在获得上述不同硅烷化试剂配比修饰的芯片之后，将芯片用于合成 T5 DNA 序列（即 TTTTT（SEQ ID NO.15）），具体方法参见实施例 3，最终获得的产物纯度与单步合成效率见表 1。从表 1 的结果可知，当使用 50%硅烷化试剂进行修饰时，Linker 接枝密度虽然没有 100%硅烷化试剂配比的高，但是其所得产物的纯度及单步合成效率最高。

表 1

硅烷 (APTES/PTES) 比例	片数	Linker 接枝密 度 (pmol/片)	合成序列	HPLC 纯度 (%)	单步合成效 率 (%)
1%	30	19.3	T5	79.7	95.6
50%	30	32.0	T5	95.4	99.1
100%	30	33.5	T5	94.5	98.9

实施例 2. 用于合成多肽的芯片的制备

首先，委托广瑞特电子进行定制化的二维码芯片打印与切割。采用红光激光打印，二维码大小为 1mm*1mm，将打印有二维码的裸硅片切割为 2mm*2mm*0.45mm 的微

型芯片，每个微型芯片居中打印有特异性的二维码，使用食人鱼液对已经进行二维码打印、切割的芯片进行预处理，然后进行等离子清洗。之后，采用 APTMS 通过简易负压气相沉积法对预处理后的芯片进行硅烷化处理。最后，将采购自安耐吉的 4-羟甲基苯甲酸作为 Universal linker 偶联于芯片上。

5

实施例 3. DNA 的合成

在本实施例中，发明人使用如图 2 所示的 DNA 合成法，利用 4 种单碱基反应池进行 DNA 分子合成。具体步骤如下。

S1. 准备合成单体、反应试剂及反应池

10 提供 4 种反应池（第一、第二、第三、第四反应池），其分别用于添加脱氧核糖核苷酸 A、T、C 和 G，以及在每个反应池中进行脱保护、盖帽、氧化和洗涤；其中，
-在偶联时，

第一反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、3'-羟基被亚磷酰胺保护的腺苷酸以及四唑；

15 第二反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、3'-羟基被亚磷酰胺保护的鸟苷酸以及四唑；

第三反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、3'-羟基被亚磷酰胺保护的胞苷酸以及四唑；

20 第四反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、3'-羟基被亚磷酰胺保护的胸苷酸以及四唑；

-在脱保护时，4 个反应池均加入三氯乙酸的二氯甲烷溶液作为脱保护试剂；

-在盖帽时，4 个反应池均加入乙酸酐/吡啶/四氢呋喃和 N-甲基咪唑的乙腈溶液作为盖帽试剂；

-在氧化时，4 个反应池均加入 0.01 M 碘液作为氧化剂；

25 -在洗涤时，4 个反应池均加入乙腈作为清洗液。

S2. 准备芯片

使用实施例 1 中 50%硅烷化试剂修饰后的 5 种不同类型的芯片（常规芯片、100 nm 氧化硅片、300 nm 氧化硅片、磨砂石英芯片、透明石英芯片）。

S3. 准备设备和软件程序

30 提供设备，其中，所述设备包括，

- 二维码识别器，其能够识别芯片上携带的二维码并产生信号；
 - 芯片分选器，其能够对芯片进行分选；
 - 驱动芯片移动的驱动装置；
 - 试剂液体驱动装置，其能够将各种“池”中的试剂液体引入和引出；
- 5 - 中央处理器，其能够接收二维码识别器识别二维码所产生的信号，并发出指令控制芯片分选器分选芯片和/或控制驱动装置移动芯片；和
- 存储器，其用于存储待合成的 DNA 分子的序列，芯片与二维码的对应关系，待合成的 DNA 分子的序列与芯片的对应关系，以及，每一个固相基质已经历的反应。
- 另外，还根据待合成的目标 DNA 序列设计控制程序，所述控制程序能够根据预
- 10 先确定的 DNA 序列，确定芯片的分选方案。

S4. DNA 合成

- 首先混合所有芯片，通过识别器识别预先印制在芯片上的二维码，中央处理器根据识别器的识别信号，控制芯片分选器分选芯片，并按照预设的控制程序，将每一张芯片移动至期望的反应池中，然后通过控制驱动器将脱保护试剂引入反应池中进行脱
- 15 保护，待反应完毕后引出脱保护试剂，引入清洗液对芯片进行清洗，然后再根据反应池对应的待偶联的单体，引入偶联试剂进行偶联，待反应完毕后引出偶联试剂，引入清洗液对芯片进行清洗，最后再依次引入盖帽试剂、氧化试剂和清洗液，分别进行盖帽、氧化与清洗，至此一个循环结束，完成一个碱基的添加/偶联。具体的操作步骤、所使用的试剂及反应时间，如表 2 所示。
- 20 在一个碱基偶联后，根据预定的 DNA 合成序列信息，循环重复以上步骤，直至 DNA 分子合成完毕。

表 2.

操作步骤	试剂/溶剂	试剂用量	浸入时间	反应次数
脱保护	3%三氯乙酸/二氯甲烷	150 μ L	15 s	2
清洗	乙腈	250 μ L	10 s	3
偶联	0.1 M 亚磷酰胺单体/乙腈、0.5 M 四唑/乙腈	40 μ L (T)+60 μ L (ACT)	60 s	2
清洗	乙腈	250 μ L	10 s	1
盖帽	乙酸酐/吡啶/四氢呋喃 1/1/8、17.6% w/v 氮-甲	75 μ L (A)+75 μ L (B)	20 s	2

	基咪唑/乙腈			
清洗	乙腈	250 μ L	10 s	1
氧化	0.01 M 碘液（水/吡啶/ 四氢呋喃 2/20/78）	150 μ L	20 s	2
清洗	乙腈	250 μ L	10 s	3

S5. DNA 的分离和纯化

待 DNA 合成完毕后，可以选择将所有芯片统一收集在一起，进行氨解，由此分离和纯化所有合成的 DNA 分子。或者，可以利用二维码对所有芯片进行识别，分选和收集目的芯片，然后对目的芯片进行氨解，由此分离和纯化目的 DNA 分子。

- 5 本实施例中共选取了 5 种不同类型的芯片进行 T30 DNA（序列为：TTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT（SEQ ID NO.16））合成，其中这 5 种芯片为：常规芯
片、100 nm 氧化芯片、300 nm 氧化芯片、磨砂石英芯片、透明石英芯片。具体步骤
如下：

（1）实验 1-T30

- 10 取 40 片常规芯片（规格：2*2*0.45 mm，双面具有二维码），将其混合，根据合
成的目标序列确定本次循环需要添加的单体，在芯片分选器分选之后，待合成相同单
体的芯片被分选至同一个反应池，加入由 75 μ L Cap A 和 75 μ L Cap B 组成的盖帽试
剂，将芯片浸泡在反应池中反应 1 次，把试剂排出之后再加入 1 次试剂，将芯片再次
浸泡反应 1 次，两次共反应 40 s，然后排出盖帽试剂，加入乙腈清洗 3 次。排出乙腈
15 加入去保护试剂 TCA 150 μ L，反应 15 s，排出试剂后重新加入试剂再反应 1 次，15 s。
完成去保护步骤后，排出去保护试剂，加入 250 μ L 乙腈清洗 3 次。排出乙腈加入 40 μ L
亚磷酰胺单体 T 和 60 μ L 活化剂 ACT，进行偶联反应 60 s，排掉试剂后重新加入试
剂再反应 1 次，两次反应共 120 s，完成偶联步骤。排出偶联试剂，加入 250 μ L 乙腈
清洗 1 次。排出乙腈加入由 75 μ L Cap A 和 75 μ L Cap B 组成的盖帽试剂，反应 1 次，
20 排掉试剂后重新加入试剂再反应 1 次，两次反应共 40 s。排出盖帽试剂，加入 250 μ L
乙腈清洗 1 次。排出乙腈加入 150 μ L 氧化剂，反应 20 s，排掉试剂后重新加入试剂再
反应 1 次，两次反应共 40 s，排出氧化试剂，加入 250 μ L 乙腈清洗 3 次，至此一个循
环完成。将上述合成步骤循环 30 次，最后去保护，氨水氨解，处理后得到 T30 产物，
进行 Nanodrop 定量测定单片合成量，并通过 HPLC 分析测定 HPLC 纯度，计算单步
25 合成效率（单步合成效率由 HPLC 纯度分析获得，例如：合成 T10 的 HPLC 纯度为

80%，则单步合成效率为 $\sqrt[3]{0.8} = 97.8\%$)，HPLC 检测结果见图 4A。

并且需要注意，在首次循环的脱保护之前，先进行盖帽处理，以封闭芯片表面端部基团不完整的区域，使其无法偶联构建单元，从而提高合成效率。从第二次循环开始，不需要再次进行盖帽，而是从识别分选开始，历经“脱保护-偶联-盖帽-氧化”步骤，如此循环直至合成完毕。

(2) 实验 2-T30

取 40 片 100 nm 氧化芯片进行 T30 DNA 合成，具体步骤同实验 1，HPLC 检测结果见图 4B。

(3) 实验 3-T30

取 40 片 300 nm 氧化芯片进行 T30 DNA 合成，具体步骤同实验 1，HPLC 检测结果见图 4C。

(4) 实验 4-T30

取 40 片磨砂石英芯片进行 T30 DNA 合成，具体步骤同实验 1，HPLC 检测结果见图 4D。

(5) 实验 5-T30

取 40 片透明石英芯片进行 T30 DNA 合成，具体步骤同实验 1，HPLC 检测结果见图 4E。

将上述 5 个实验的 DNA 合成结果进行汇总，结果如表 3 所示。从表 3 可知，使用透明石英芯片进行 DNA 合成，所得产物纯度和单步合成效率最高。相对于单步合成效率最低的 100nm 氧化芯片，单步合成效率提高了 2.5%，即每一循环的合成效率由 96.8% 提高到 99.3%，而整个合成过程需要 30 个循环，那么在经历整个合成过程后所得产物的纯度显著提高，由 37.9% 提高至 81.0%。当合成的序列越长，反应循环数越多，产物纯度的提高就越显著。

表 3

实验编号	芯片	实物图	单片合成量	HPLC 纯度	单步合成效率
1	常规芯片		15.7 pmol	43.0%	97.2%
2	100nm 氧化芯片		9.2 pmol	37.9%	96.8%

3	300nm 氧化芯片		10.5 pmol	55.4%	98.1%
4	磨砂石英芯片		54.6 pmol	71.3%	98.9%
5	透明石英芯片		26.8 pmol	81.0%	99.3%

(6) 实验 6 基于透明石英芯片的 59 nt 寡核苷酸合成及基因组装测试、测序结果分析

为了进一步确认最佳合成载体,使用透明石英芯片进行 14 条 59 nt 长度的寡核苷酸的合成,序列如表 4 所示,并进行基于一步法 PCA/PCR 反应策略的小片段基因组装、跑胶图验证目标条带正确性,最后通过切胶回收、TA 克隆转化、送 Sanger 测序,通过分析比对测序结果,最终确定最佳固相合成载体。

表 4

编号	序列	SEQ ID NO
59 nt-1	GCCCATTTCTCGAACGTACTTCTCACAGTTTCAGTTAAGAAATCGAA GAAGTAAGATAC	1
59 nt-2	AGTACGTTTCGAGAAATGGGCCACTACCGGAGAAACACTTCAGTTACT CTTTGAGATGAA	2
59 nt-3	AAGTATTTGCATAAGCACTTTAAATGTAGGTTTTTTCATCTCAAAGAG TAACTGAAGTG	3
59 nt-4	ACATTTAAAGTGCTTATGCAAATACTTATAGGTGGCAATCAAGTTGA AAATGAATTGCT	4
59 nt-5	CAAATCGGAAATTGTTCTCCTTGAACAAAGCGTCAAGCAATTCATTTT CAACTTGATTG	5
59 nt-6	CAAGGAGAACAATTTCCGATTGCTGGTCTTCGTAGCATGCCCCCTCG ATTTCCCCGGAT	6
59 nt-7	AACTATTTCTCCTCGACCCTTCATTGCCCTGTTGTAAGTAGATCCGGG GAAATCGAGGG	7
59	GAAGGGTCGAGGAGAAATAGTTAAGATATACGAACGGATAATAAATG	8

nt-8	AAAGAAAAGTGA	
59	GGTCCTTGGCTCTCCTCTAGTCTTGGCAATCATCACTTTTCTTTTCATT	9
nt-9	TATTATCCGTT	
59	TAGAGGAGAGCCAAGGACCAACATACTGGATATAATGCTAGACAGTC	10
nt-10	AATGTGATGAGG	
59	ACTTTCATGATATTCTCATCATTCAATACTTTTCCTTCCTCATCACATT	11
nt-11	GACTGTCTAG	
59	GTATTGAATGATGAGAATATCATGAAAGTGCTGCTTTGGTATACATTT	12
nt-12	AGTGGTTATGA	
59	ATAATAGTCTGTGTGGCAACCTTTGCAATAGATTCATAACCACTAAAT	13
nt-13	GTATACCAAAG	
59	AGGTTGCCACACAGACTATTATGTTATTGGAAAAACACCCCGAGTGC	14
nt-14	TTCCAGAAAGCA	

具体步骤如下：

取 42 片透明石英芯片按照实施例 3 中的实验 1 的方法步骤进行寡核苷酸的合成，最后去保护，分别合成 14 条上表序列寡核苷酸，每条序列使用平行的 3 张芯片进行合成（即每条序列合成使用 3 组平行试验），总共合成 42 条。将 42 条引物 3*（59 nt-1
5 - 59 nt-14），分成 3 组（14 片/组）氨解，处理后得到目标 3 组 59 nt Mix 产物各 50 μ L。取 10 μ L 样品，分别加入 4 μ L dNTPs、5 μ L Buffer、4 μ L 首尾引物、0.5 μ L DNA 聚合酶，用水将其体积补至 50 μ L 混匀，进行一步法 PCA/PCR 反应。使用降落 PCR 扩增 35 个循环后，产物于 12 $^{\circ}$ C 保存。取 2 μ L PCR 产物点样至胶孔中，调节电压为 180 V，电泳时间为 30 min，进行跑胶检测。结果如图 5 所示。从图 5 中可看出，基于透
10 明石英芯片合成的 59 nt 引物，组装成的 560 bp 基因条带，与标准合成引物对比清晰、正确。

另将条带正确的 PCR 产物切胶回收后，利用 TaKaRa 公司的 TA 克隆试剂盒（pMDTM19-T）进行克隆转化实验，菌落 PCR 验证条带正确的 TA 克隆转化子送 Sanger 测序。Sanger 测试结果如表 5 所示，3 组平行实验的平均错误率为 0.34%。

表 5

芯片 类型	引物	缺 失	突 变	插 入	错 误 总数	基 因 长度	碱基 总数	错误率
透明石英芯片	Mix-1	5	2	6	13	560	3920	0.33%

	Mix-2	6	2	6	14	560	4480	0.31%
	Mix-3	6	6	5	17	560	4480	0.38%

经过对不同类型的二维码芯片进行化学修饰，以及基于修饰芯片进行基于浸泡-识别-分拣的一系列 59 nt 寡核苷酸合成、基因合成测试，并对多种芯片合成 HPLC 分析结果进行对比，表明：经过化学修饰的二维码芯片，可以进行寡核苷酸的合成，且透明石英芯片的合成效果最好，相应的 T30 引物的单片合成量 26.8 pmol，HPLC 纯度 81.0%，单步合成效率达到 99.3%，最终通过 14 条 59 nt 引物合成、小片段组装、Sanger 测序进一步验证了透明石英芯片效果更佳，且 Mix 组测序结果错误率可低至 0.3%。

以上实施例及实验结果均表明本发明提出的生物芯片可用于 DNA 合成，且最终测试对比的透明石英芯片合成效果好，与目前商业化主流合成效果有可比性，进一步表明本发明提出的化学修饰的可识别的生物芯片的可行性高，且有很大的应用前景。

实施例 4. RNA 的合成

在本实施例中，发明人使用基于浸泡-分选的 RNA 合成法，利用 4 种单碱基反应池进行 RNA 分子合成。具体步骤如下。

S1. 准备合成单体、反应试剂及各种“池”

提供 4 种池（第一、第二、第三、第四反应池），其分别用于添加核糖核苷酸 A、U、C 和 G，以及在每个反应池中进行脱保护、盖帽、氧化和洗涤；其中，

-在偶联时，

第一反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、2'-羟基被 TBDMS 保护、3'-羟基被亚磷酸保护的腺苷酸以及四唑；

第二反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、2'-羟基被 TBDMS 保护、3'-羟基被亚磷酸保护的鸟苷酸以及四唑；

第三反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、2'-羟基被 TBDMS 保护、3'-羟基被亚磷酸保护的胞苷酸以及四唑；

第四反应池加入 5'-羟基被 DMT 保护、2'-羟基被 TBDMS 保护、3'-羟基被亚磷酸保护的尿苷酸以及四唑；

-在脱保护时，4 个反应池均加入三氯乙酸的二氯甲烷溶液作为脱保护试剂；

-在盖帽时，4个反应池均加入乙酸酐/吡啶/四氢呋喃和N-甲基咪唑的乙腈溶液作为盖帽试剂；

-在氧化时，4个反应池均加入0.01 M 碘液作为氧化剂；

-在洗涤时，4个反应池均加入乙腈作为清洗液。

5 S2. 准备芯片

使用实施例1中50%硅烷化试剂修饰后的芯片。

S3. 准备设备和软件程序

提供设备，其中，所述设备包括，

- 二维码识别器，其能够识别芯片携带的二维码并产生信号；
- 10 - 芯片分选器，其能够对芯片进行分选；
- 驱动芯片移动的驱动装置；
- 试剂液体驱动装置，其能够将各种“池”中的试剂液体引入和引出；
- 中央处理器，其能够接收二维码识别器识别二维码所产生的信号，并发出指令控制芯片分选器分选芯片和/或控制驱动装置移动芯片；和
- 15 - 存储器，其用于存储待合成的RNA分子的序列，芯片与二维码的对应关系，待合成的RNA分子与芯片的对应关系，以及，每一个芯片已经历的反应。

另外，还根据待合成的目标RNA序列设计控制程序，所述控制程序能够根据预先确定的RNA序列，确定芯片的分选方案和移动方案。

S4. RNA 合成

- 20 首先混合1000张芯片，通过识别器识别预先印制在芯片上的二维码，中央处理器根据识别器的识别信号，控制芯片分选器分选芯片，并按照预设的控制程序，将每一张芯片移动至期望的反应池中，然后通过控制驱动器将脱保护试剂引入反应池中进行脱保护，待反应完毕后引出脱保护试剂，引入清洗液对芯片进行清洗，然后再根据反应池对应的待偶联的单体，引入偶联试剂进行偶联，待反应完毕后引出偶联试剂，
- 25 引入清洗液对芯片进行清洗，最后再依次引入盖帽试剂、氧化试剂和清洗液，分别进行盖帽、氧化与清洗，至此一个循环结束，完成一个碱基的添加/偶联。具体的操作步骤、所使用的试剂及反应时间，如表6所示。

在一个碱基偶联后，根据预定的RNA合成序列信息，循环重复以上步骤，直至1000条RNA分子合成完毕。

表 6.

操作步骤	试剂/溶剂	浸入时间
脱保护	10%三氯乙酸/二氯甲烷	15s
清洗	乙腈	60s
清洗	乙腈	60s
偶联	0.1 M 亚磷酰胺单体（单碱基）/乙腈、0.5 M 四唑/乙腈	90s
清洗	乙腈	60s
盖帽	乙酸酐/吡啶/四氢呋喃 1/1/8、17.6% w/v 氮-甲基咪唑/乙腈	30s
氧化	0.01 M 碘液（水/吡啶/四氢呋喃 2/20/78）	30s
清洗	乙腈	60s
清洗	乙腈	60s

S5. RNA 的分离和纯化

待 RNA 合成完毕后，可以选择将 1000 张芯片统一收集在一起，进行氨解，由此
5 分离和纯化所有合成的 RNA 分子。或者，可以利用二维码对 1000 张芯片进行识别，分选和收集目的芯片，然后对目的芯片进行氨解，由此分离和纯化目的 RNA 分子。

分离和纯化每一张芯片所合成的 RNA 分子，并进行测序。测序结果显示，所合成的每一种 RNA 分子均具有预期的目标序列。

10 实施例 5. 多肽的合成

在本实施例中，发明人使用如图 3 所示的基于浸泡-分选的多肽合成法，利用 21
种单氨基酸合成池进行多肽分子合成。具体步骤如下。

S1. 准备合成单体、反应试剂及各种“池”

提供 23 种池，其中，

15 - 21 种合成池（对应于 21 种常规的氨基酸单体），其各自用于添加一种不同的氨基酸单体；其中，每一种合成池包含一种 α -氨基被 Fmoc 保护、侧链被保护（如果有侧链的话）的氨基酸单体，以及四甲基脒六氟磷酸盐、N-甲基吗啉和 DMF；

- 脱保护池，其包含 20% 哌啶的二甲基甲酰胺（DMF）溶液作为脱保护试剂；

- 洗涤池，其包含 DMF/DCM 作为清洗液。

S2. 准备芯片

使用实施例 2 中制备好的芯片。

S3. 准备设备和软件程序

提供设备，其中，所述设备包括，

- 5
- 二维码识别器，其能够识别芯片携带的二维码并产生信号；
 - 芯片分选器，其能够对芯片进行分选；
 - 驱动芯片移动的驱动装置；
 - 试剂液体驱动装置，其能够将各种“池”中的试剂液体引入和引出；
 - 中央处理器，其能够接收二维码识别器识别二维码所产生的信号，并发出指令控制芯片分选器分选芯片和/或控制驱动装置移动芯片；和
- 10
- 存储器，其用于存储待合成的多肽分子的序列，芯片与二维码的对应关系，待合成的多肽分子与芯片的对应关系，以及，每一个芯片已经历的反应。

另外，还根据待合成的目标多肽序列设计控制程序，所述控制程序能够根据预先确定的多肽序列，确定芯片的分选方案和移动方案。

15

S4. 多肽合成

首先将 1000 张芯片置于脱保护池中进行脱保护，待反应完毕后，转移至洗涤池中进行清洗两次。然后，使用二维码识别器识别预先印制在芯片上的特异性二维码。中央处理器根据二维码识别器的识别信号，控制芯片分选器分选芯片，并按照预设的控制程序，将每一张芯片移动至期望的合成池中，进行偶联反应。待偶联反应完毕后，

20

将所有芯片转移至洗涤池中进行清洗两次，由此完成一个氨基酸的添加/偶联。其中，每一步反应时，都需要先利用试剂液体驱动装置将对应的试剂引入池中，待反应结束之后，再利用试剂液体驱动装置将试剂从池中引出。具体的操作步骤、所使用的试剂及反应时间，如表 7 所示。

在一个氨基酸偶联后，根据预定的多肽序列信息，循环重复以上步骤，直至 1000

25

条多肽分子合成完毕。

表 7

操作步骤	试剂/溶剂	浸入时间
脱保护	20%哌啶/DMF	15s
清洗	DMF/DCM	60s
清洗	DMF/DCM	60s

偶联	氨基酸单体、四甲基脒六氟磷酸盐 /N-甲基吗啉、DMF (1:24)	90s
清洗	DMF/DCM	60s
清洗	DMF/DCM	60s

S5. 多肽的分离和纯化

待多肽合成完毕后，可以选择将 1000 张芯片统一收集在一起，进行解离，由此分离和纯化所有合成的多肽分子。或者，可以利用二维码对 1000 张芯片进行识别，分选和收集目的芯片，然后对目的芯片进行解离，由此分离和纯化目的多肽分子。

- 5 分离和纯化每一张芯片所合成的多肽分子，并进行测序。测序结果显示，所合成的每一种多肽分子均具有预期的目标序列。

权 利 要 求

1. 一种生物芯片，所述芯片上携带化学实体和编码，其中所述编码与所述芯片具有唯一对应关系。

2. 根据权利要求 1 所述的生物芯片，其中所述化学实体能够与反应试剂发生反应从而将反应试剂中的单体连接至所述化学实体的末端。

3. 根据权利要求 2 所述的生物芯片，其中所述化学实体为能够起始 DNA/RNA 合成反应的 **linker** 分子，优选为始端带有可与氨基反应的官能团、末端带有酸不稳定性保护基的羟基的 **linker** 分子，更优选为 **Universal Linker**。

4. 根据权利要求 2 所述的生物芯片，其中所述化学实体为能够起始多肽合成反应的 **linker** 分子，优选为始端带有可与氨基反应的官能团、末端带有可与氨基酸单体羧基偶联反应的官能团，最终多肽合成完毕后，用酸处理时能解离的 **linker** 分子，更优选为 4-羟甲基苯甲酸。

5. 根据权利要求 1 所述的生物芯片，其中所述芯片上携带特异性抗原，用于筛选抗体；或者，所述芯片上携带特异性抗体，用于检测抗原。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的生物芯片，其中所述编码为所述芯片身份的特异性表征，其包括数字，符号，图形，和/或识别码；优选地，所述编码为二维码。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的生物芯片，其中所述芯片具有下列一项或多项特征：

(1) 所述芯片选自不抛光单面二维码、不抛光双面二维码、单抛单面二维码、单抛双面二维码、双抛单面二维码、双抛双面二维码芯片；

(2) 所述芯片尺寸小于 2 mm*2 mm，优选为 0.5 mm*0.5 mm；

(3) 所述芯片由选自下列的材料制成：硅片（硅晶）、玻璃片（珠）、陶瓷、金属片、塑料片（珠）、凝胶、尼龙膜，或其任何组合，优选为硅片；

(4) 所述芯片由多孔玻璃制成，所述多孔玻璃粒径为 5 μ m-2000 μ m；所述多孔玻璃孔径为 200 $\text{\AA}$ -5000 $\text{\AA}$ ；

(5) 所述芯片形状为片状、长方体、圆柱体、或球体，优选地，所述芯片为正方形的片状；

(6) 所述芯片选自 100 nm 氧化硅片、300 nm 氧化硅片、磨砂石英芯片或透明石英芯片；优选地，所述芯片为透明石英芯片；

(7)所述芯片的表面经过硅烷化试剂处理,优选地,所述硅烷化试剂选自 APTMS 或 APTES,更优选地,所述硅烷化试剂为 50%的硅烷化试剂。

8. 制备根据权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片的方法,所述方法包括以下步骤:

- 1) 对所述芯片进行编码;
- 2) 对所述芯片进行预处理;
- 3) 对所述芯片的表面进行硅烷化处理;
- 4) 对所述芯片的表面进行化学修饰;
- 5) 任选地,对所述化学修饰进行检测或定量分析。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述预处理包括酸处理、碱处理、超声、等离子清洗、丙酮清洗或其组合,其中酸选自硫酸、盐酸、磷酸、食人鱼液,碱选自氢氧化钠、氢氧化钾;优选地,预处理方法为先进进行酸处理,然后进行等离子清洗;更优选地,预处理方法为先进进行氢氧化钠处理,然后进行去离子清洗和丙酮清洗。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,其中通过在所述芯片表面连接化学实体,从而实现所述芯片的表面进行化学修饰。

11. 根据权利要求 8 所述的方法,其中采用激光打印的方式将二维码打印在所述芯片上,优选地,采用红光的激光通过打点二维码模式进行打码。

12. 根据权利要求 8 所述的方法,其中通过将所述芯片浸泡在硅烷化试剂中并进行超声处理来对所述芯片的表面进行硅烷化处理,优选地,所述硅烷化试剂包括 APTES 和 PTES。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述硅烷化试剂为 50%的硅烷化试剂。

14. 根据权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片或根据权利要求 8-13 任一项所述的方法制备的生物芯片在生物大分子合成中的应用。

15. 根据权利要求 14 所述的应用,其中所述生物大分子为核酸或多肽。

16. 权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片或根据权利要求 8-13 任一项所述的方法制备的生物芯片在抗原或抗体检测中的应用。

17. 一种核酸合成方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 提供根据权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片或根据权利要求 8-13 任一项所述的方法制备的生物芯片,其中,所述生物芯片上携带的编码对应于待合成的核酸的序列;

(2) 提供 4 种反应池,其分别用于添加脱氧核糖核苷酸 A、T、C、G 或核糖核

苷酸 A、U、C、G，以及在每个所述反应池中进行脱保护、盖帽、氧化和洗涤；

(3) 识别所述生物芯片携带的编码，并根据编码所对应的序列，确定待添加的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，将待添加相同脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的芯片分选至同一反应池；

(4) 在所述反应池中加入脱保护试剂，将所述生物芯片浸泡在所述反应池中进行脱保护，反应结束后排出所述脱保护试剂；

(5) 在所述反应池中加入相应的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的偶联试剂，将所述生物芯片浸泡在所述反应池中进行偶联反应，反应结束后排出所述偶联试剂；

(6) 在所述反应池中加入盖帽试剂，将所述生物芯片浸泡在所述反应池中进行盖帽反应，反应结束后排出所述盖帽试剂；

(7) 在所述反应池中加入氧化试剂，将所述生物芯片浸泡在所述反应池中进行氧化反应，反应结束后排出所述氧化试剂，由此完成一个核苷酸的添加；

(8) 根据编码所对应的待合成核酸序列，重复步骤(3)至(7)一次或多次，从而在所述生物芯片上产生具有预先确定序列的核酸；

任选地，所述方法还包括下述步骤：

(9) 将所述核酸从所述生物芯片上切割下来，从而获得所述核酸。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，在进行所述核酸合成之前，将所述生物芯片分选至所述反应池后，在所述反应池中加入盖帽试剂，将所述生物芯片浸泡在所述反应池中进行盖帽反应。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的方法，其中使用多个芯片同时进行合成反应。

20. 一种高通量筛选抗体的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 将多个芯片混合，其中所述芯片为权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片或根据权利要求 8-13 任一项所述的方法制备的生物芯片，并且每一个芯片上修饰有特异性的抗原并带有唯一编码；

(2) 将所述多个芯片浸入待检测样品溶液中并充分反应；

(3) 移除样品溶液并清洗所述芯片；

(4) 识别每个所述芯片上携带的编码，并根据编码将每个所述芯片彼此分开；

和

(5) 将所述芯片上结合的抗体与芯片上的抗原解吸附，并鉴定得到的抗体。

21. 一种高通量检测抗原的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 将多个芯片混合，其中所述芯片为权利要求 1-7 任一项所述的生物芯片或根据权利要求 8-13 任一项所述的方法制备的生物芯片，并且每一个芯片上修饰有特异性的抗体并带有唯一编码；

(2) 将所述芯片浸入待检测样品溶液中并充分反应；

(3) 移除所述样品溶液并清洗所述芯片；

(4) 识别每个所述芯片上携带的编码，并根据编码将每个所述芯片彼此分开；

和

(5) 将所述芯片上结合的抗原与芯片上的抗体解吸附，并鉴定得到的抗原。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法，其中在步骤(4)中，通过识别每个生物芯片上携带的编码对芯片进行分选，并通过驱动芯片移动的驱动装置将每个芯片移动到不同的反应容器中。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中通过向装有分选后的芯片的反应容器中加入解吸附试剂而使抗原和抗体解吸附。