直接点样法最早由 Stanford 大学 Brown 实验室发展而来，是将微量的寡聚核苷酸片段、cDNA 或蛋白质等通过特定的高速点样机器人直接排列到玻片等介质上，生物大分子探针通过共价键或离子键与特殊处理的玻片相连，从而制备成芯片。直接点样法主要包括 3 个重要的环节：探针的准备，载体的表面修饰和点样。

1．探针的准备

根据实验的目的，选择相应的探针及种类，基因芯片的探针主要有寡核苷酸或 cDNA。对于寡核苷酸探针，探针的设计是很关键的一个环节，需要根据研究目的设计相应的探针序列，如 SNP 分析芯片，必须考虑待检测位点的序列和位置，需要严格控制探针的 Tm 值。如果用于表达谱的研究，目的基因的寡核苷酸探针设计原则是尽量使探针与其他基因之间没有同源性，即探针的特异性要好。探针设计完成后，目前有商业化公司可以进行人工合成。

对于 cDNA 芯片，需要预先克隆到大量目的基因的 cDNA 克隆，并经过测序验证。用 PCR 进行探针的扩增，经过纯化后，即可用于点样。

对于蛋白质芯片，探针的制备是一个很大的瓶颈，需要预先准备大量的有活性的探针。主要有几种方式：一是人工合成多肽探针，虽然效率较高，但其活性与完整蛋白质可能存在很大区别；二是用基因工程的手段制备蛋白质探针，将目的基因构建到原核或真核蛋白质表达系统中，在宿主细胞中表达，经过纯化后制备探针；三是针对抗体芯片，通过杂交瘤技术制备单克隆抗体，纯化后用于芯片制备。

蛋白质要预处理，因为 DNA 相对与蛋白质来说比较稳定，因此所有 DNA 探针只需简单的纯化后就能直接溶于点样液中直接点样。而不同的蛋白质探针的性质差异很大，稳定性也差，通常用来制备芯片的蛋白质最好具有较高的纯度和完好的生物活性，所以点样前必须选择合适的缓冲液将蛋白质溶解。一般是采用含 40％甘油的 PBS 缓冲液，一则可以防止溶液蒸发，使蛋白质在芯片的整个制作过程中均保持水合状态；再则该缓冲液可有效防止蛋白质变性，从而维持其生物活性。蛋白质预处理完毕即可加入样品槽中进行点样。

2．玻片的表面修饰

对于 DNA 芯片，点样法所用载体多为玻璃片，其与多孔尼龙膜相比具有杂交体积小、荧光背景低、支持同时使用两种或两种以上荧光素。其他可用的固相载体还有硝酸纤维膜、活化葡聚糖凝胶、琼脂糖、甲基丙烯酸共聚物、丙烯酰胺、聚苯乙烯等，大多因较强荧光背景、化学和物理稳定性差、固定 DNA 片段的一致性较差和不易提高密度等原因而很少使用。

在点样前，一般先对载体表面进行化学修饰(如多聚赖氨酸或硅烷偶联剂等)，使其表面富含氨基并带正电。修饰后的固相载体表面可利用静电吸附带负电的 DNA 或蛋白质探针，或通过双功能偶联试剂(如戊二醛)辅助形成共价化学键而连接。

玻片表面的修饰方法很多，如 3—氨丙基三甲氧基硅烷对玻璃表面进行氨基化，氨基与 1，4—苯二异硫氰酸盐发生反应，使玻片表面连接上可以与氨基反应的异硫氰酸基团，5’氨基修饰的寡核苷酸与异硫氰酸基团反应，从而将探针连接在芯片上。Rogers 研究了将末端二硫键修饰的寡核苷酸共价交联到巯基硅烷化玻璃表面的可行性。玻片先用 3—巯丙基硅烷衍生化，与 5’端二硫键化合物修饰的寡核苷酸发生巯基置换反应进而交联。此外，Livaehe 等利用吡咯在电化学条件下发生氧化聚合的原理，以微电极阵列为基础制备寡核苷酸芯片。通电时，5’吡咯修饰的寡核苷酸及吡咯在微电极上发生聚合，聚合物的合成区域限制在电极表面，通过切换微电极的通电情况选择定位各种寡核苷酸探针。

对于蛋白质芯片，常用载体有膜载体和载玻片。膜载体常用聚偏二氟乙烯膜(poly vinylidene difluoride，PVDF)，使用时先将膜切割成所需尺寸，然后用 95％乙醇浸泡处理。以载玻片作为载体时，一般需经过特殊化学修饰。通常用含乙醛的硅烷试剂处理载玻片，使载玻片表面带有活性醛基基团，醛基与蛋白质所带的氨基反应将蛋白质固定在载体上，这种方法适合固定较大的蛋白质分子。若固定较小的蛋白质分子或肽，则用小牛血清白蛋白—琥珀酰亚胺(BSA—NHS)修饰载玻片。具体方法为：先在载玻片上吸附上一层 BSA 分子，然后用 N，N 二琥珀酰亚胺基碳酸酯(N，N-disuccinimidyl carbonate)，激活 BSA 分子，使 BSA 上活化的 Lys、Asp、Glu 与待固定蛋白质的氨基或羧基发生反应，形成共价连接。

3．点样

直接点样方式由于其操作简便、成本低、易于推广等优点而广泛地被采用。

(1)点样系统：点样系统又叫点样仪或机械手。在直接点样法中，采用的机械手有一套计算机控制的三维移动装置，包括装点样针的点样头、机械手臂、点样针清洗系统、芯片载片台及计算机控制系统。

不同厂家生产的点样仪基本原理类似，只是点样的方式有所区别。点样方式包括接触式点样(针点)和非接触式点样(喷点)。针点是指用针通过直接接触介质表面将 DNA 样品点到介质上。常用的针的类型有裂缝针(spit pin)、实心针(solidpin)、毛细管针(capillarypin)或环针(pinandring)等。喷点是通过非接触式方式将 DNA 样品点到介质表面，通常是用加压的方法传递探针。与针点相比较，喷点点样量大、密度小，因此喷点主要用于点低密度的膜，不如针点运用广，它的最大优点是可以结合其他方法如压电等方法。目前比较成熟的点样针的种类有：TeleChem 公司和 Majer 公司的裂缝针，GenomicSolutions 公司和 BioRobotics 公司的实心针，GeneticMicrosystem 公司的环针等，Packard lnstrument 公司等采用压电非接触式喷点方式。

(2)点样与点样后处理：点样的过程根据不同型号的点样仪而有所不同，具体操作应根据厂家的指南进行。

点样完成后还必须经过一个点样后处理的过程，才能成为可以使用的生物芯片。不同的基片、不同的样品就会有不同的结合方式，也就要求不同的点样后处理方法。如以膜为载体的芯片固定时应放入湿盒中，37~C 恒温 lh 即可；以聚丙烯酰胺凝胶修饰的载玻片为载体的芯片，可用戊二醛将凝胶激活从而与蛋白质形成连接；对于糖蛋白，则可用酰肼代替酰胺将凝胶激活后与蛋白质上的多糖基团结合，达到固定蛋白质的目的。通常情况下，点样后处理包括水合、紫外交联、洗脱和封闭 4 个步骤。水合的目的是保证样品与基片表面在溶液状态下充分反应；紫外交联的目的则是希望样品与基片表面形成的化学键能够吸收紫外线而变得更加牢固；洗脱的目的是为了洗掉那些没有牢固结合的样品，以消除其在杂交过程中的影响；封闭则是为了消除基片表面活性基团与杂交液中的探针分子之间的非专一性相互作用而产生背景。

封闭剂的选择与封闭方法根据玻片的修饰与探针的种类而有所不同。如氨基修饰的 DNA 芯片用琥珀酸酐溶液封闭，醛基修饰的 DNA 芯片用硼氢化钠溶液封闭。蛋白质芯片所用的封闭试剂主要有小牛血清白蛋白和甘氨酸两种。封闭后，用 PBST(含 0.1%Tween 20 的 PBS)反复洗涤芯片，除去多余的封闭液。