

技术与方法

cDNA 芯片表面核酸固定化的优化*

马淑华 王升启**

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 cDNA 芯片技术表面核酸固定化影响因素众多, 其中涉及选择载体、固定于玻片的 DNA 片段浓度、玻片 DNA 片段的固定方法、玻片预处理方法、DNA 片段的变性、溶解 DNA 片段的点样液等等. 针对这些因素进行了优化筛选实验, 以便于提高 cDNA 芯片技术检测基因表达的效率.

关键词 cDNA 芯片, 核酸固定, 玻片, 优化

学科分类号 Q7

cDNA 芯片技术在近几年中引起了人们的普遍关注, cDNA 芯片利用核酸双链的互补碱基之间的氢键作用, 形成稳定的双链结构, 通过检测目的单链上的荧光信号, 来实现样品的检测. 由于玻片本身的荧光本底很低, 所以可用荧光标记的方法对生物芯片实施检测和分析, 同时具有快速、精确和安全等优点. 而且, 还可用多个荧光素进行标记以实现一次性分析多个生物样品. 玻片作为支持物还可使反应体积缩小到 5~200 μL , 而通常的杂交反应体积为 5~50 ml. 这样一方面节约了试剂, 同时还可以提高反应试剂的有效浓度 (0.1~1 $\mu\text{mol/L}$), 是常规检测 (0.4~4 $\mu\text{mol/L}$) 的一万倍. 因此促进了杂交速度, 减少了杂交时间, 并可取得较强的荧光信号^[1].

cDNA 芯片一般在高效率机器人的帮助下, 通过直接接触或用精细的微量加液管置于玻片上构成阵列, 它的优点在于芯片制造速度快、成本低, 而且芯片之间制造误差小. 如何将核酸固定于玻片表面是制备 cDNA 芯片阵列的关键, 也是提高杂交效率的前提条件^[2].

本实验针对 cDNA 芯片技术中核酸固定于玻片表面的影响因素进行了优化筛选实验.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: UniHybTM 杂交液 (Telechem 公司)、10% SDS、cy3-dUTP、cy5-dUTP、20 × SSC (standard saline citrate, 柠檬酸盐)、50% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、ArrayItTM 96-well PCR

Purification kit (Telechem International, Inc.)、 MgCl_2 、1 mol/L Tris-HCl、dNTP、氨基片和醛基片 (Sigma 公司) 及多聚赖氨酸片 (本实验室制作).

1.1.2 仪器设备: ScanArray 3000 芯片扫描仪、ArrayIt Hybridization Casette (Telechem 公司)、PixSys7500 型点样仪 (Cartesian 公司)、紫外交联仪 (BioRad Inc. USA).

1.2 方法

1.2.1 多聚赖氨酸片的制备: 将原始材料显微镜载玻片进行如下步骤的清洗和包被: a. 配制清洗液: 将 100 g 氢氧化钠颗粒溶解到 400 ml 双蒸水中, 加 600 ml 95% 乙醇, 搅拌直至溶液变清澈. b. 第一次清洗玻片: 将装有载玻片的架子浸泡在装清洗液的烧杯中, 在摇床中浸泡振荡至少 2 h. c. 第二次清洗玻片: 用双蒸水清洗载玻片 5 次, 每次 5 min, 然后将干净的玻片室温干燥. d. 制备多聚赖氨酸溶液: 35 ml 多聚赖氨酸与 35 ml 组织培养用的 PBS (不含 Mg^{2+} , Ca^{2+}) 及 280 ml 双蒸水混合. e. 包被玻片: 将玻片放入多聚赖氨酸溶液中, 振荡 1 h. f. 第三次清洗玻片: 在双蒸水中洗 1 min, 室温干燥, 立即转入一个干净的切片盒中备用^[3].

* 军队杰出人才基金项目“基因芯片关键技术及应用研究”资助. 国家自然科学基金重点项目“基因组研究与基因分离中共同的 DNA 芯片技术”资助 (39889001).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-05-21, 接受日期: 2001-07-23

1.2.2 荧光标记 PCR 产物的制备: 在总体积 100 μ l 的 PCR 反应体系中掺入荧光素 Cy3-dCTP 或 Cy5-dCTP, 10 $\times$ 缓冲液 10 μ l (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, 15 mmol/L MgCl₂), 模板 DNA, 双引物各 5 μ l (T7、SP6 引物), 掺入荧光素的 4 种 dNTP 混合物 16 μ l (dA/G/TTP 各 1.25 mmol/L, dCTP 1.15 mmol/L, Cy3-dCTP 0.10 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l), 加水至 100 μ l. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环. 使用 ArrayItTM 96-well PCR Purification kit (Telechem International, Inc.) 纯化荧光标记 PCR 产物. 使用 DH650 型紫外分光光度计 (Bechman 公司) 测定 PCR 产物浓度及荧光掺入率.

1.2.3 玻片表面荧光标记 PCR 产物固定及洗涤的过程: 将相同浓度同一批制作的多个荧光标记 PCR 产物用 PixSys7500 型点样仪通过机械手臂以接触式点样方式分别印迹于氨基片、醛基片、多聚赖氨酸片表面, 其中印迹于醛基片的荧光 PCR 产物经氨基修饰. 制备阵列后将三种玻片再水化、干烤. 继续将氨基片及多聚赖氨酸片进行紫外交联使 DNA 牢固结合于玻片上. 使用 ScanArray3000 芯片扫描仪检测各点处理前荧光信号强度. 模仿实际杂交实验中的各步洗涤过程进行后处理: 2 $\times$ SSC-0.2% SDS 5 min, H₂O 2 min, 1 $\times$ SSC-0.2% SDS 5 min, 0.006 $\times$ SSC, 室温干燥. 同时检测各步处理后的荧光信号强度进行比较分析, 此时的荧光强度代表了 DNA 在玻片表面的结合强度^[3].

1.2.4 核酸固定化实验的优化:

a. DNA 片段固定方法: 将荧光标记 PCR 产物印迹于同一批处理的多聚赖氨酸片、氨基片及醛基片表面, 以 80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C、140 $^{\circ}$ C 的干烤温度在分别干烤 30 min、1 h、2 h、2 h 及室温放置, 并结合不同紫外交联强度 50 mJ、100 mJ、200 mJ、300 mJ、400 mJ、500 mJ 处理多聚赖氨酸片、氨基片, 使 DNA 固定于玻片上, 继续在 1.2.3 中相同条件下进行洗涤.

b. 洗涤温度与时间: 用 1.2.3 中提供的洗液洗涤印迹上阵列的玻片, 比较每步的洗涤时间分别为 2 min、5 min、10 min 时 DNA 的结合程度. 并且在 30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 等温度下使用同一洗液进行洗涤, 分别检测荧光信号强度, 以比较不同温度对 DNA 结合的影响.

c. 玻片处理方法: 在玻片上点荧光标记 PCR 产物, 针对去除非特异结合的干扰又不使荧光信号明显减弱的目的, 选用降低背景的方法对玻片进行预处理, 洗涤方法基本不变, 筛选出最佳预处理方法.

结合上面优化的 DNA 固定条件比较 DNA 片段在三种载体上的结合强度及处理方法, 筛选出结合最牢固且处理较方便、随机影响因素相对少、处理后背景干扰少的载体. 三种载体洗涤条件相同, 此外醛基片进行还原^[4].

氨基片及多聚赖氨酸片进行封闭: 溶解 5 g 琥珀酸酐 (Aldrich 公司) 于 315 ml 的 *n*-甲基吡咯烷酮中, 向该液加入 35 ml 0.2 mol/L 的硼酸钠 (pH 8.0), 搅拌至溶解 (用 NaOH 调 pH 值), 将玻片浸 (同时振荡) 在该溶液中 15 min^[5].

d. 固定于玻片的 DNA 片段长度及浓度: 将同一批制作的长度在 0.3~1.3 kb 之间的几种荧光标记 PCR 产物稀释成 0.25 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L 几种不同的浓度梯度制备阵列. 同时重复实验几张玻片, 使用 1.2.3 中的洗涤条件处理后检测荧光信号强度.

e. DNA 载片变性: 相同浓度、相同种类的荧光标记 PCR 产物分别在制备阵列前后进行变性. 在制备阵列前变性的方法: 在制备阵列前将 PCR 产物放在 100 $^{\circ}$ C 水浴中加热变性 2 min 后速置于冰上, 然后快速转入置于冰上的 96 孔板中制备阵列. 在制备阵列后载片变性的方法: 将 PCR 产物直接印迹在玻片上, 将玻片放于 100 $^{\circ}$ C 水浴中加热变性 2 min 后速置于预冷 95% 乙醇中 2 min, 取出甩干. 经过相同条件的固定、洗涤处理后检测荧光信号.

2 结 果

2.1 DNA 片段固定方法的影响

结果表明, 醛基片通过高温短时间干烤即可使 DNA 结合最牢固, 其中 100 $^{\circ}$ C 干烤 1 h 即可达到点样后室温放置两周的效果, 缩短了实验周期. 多聚赖氨酸片及氨基片在 80 $^{\circ}$ C 干烤 2 h 合并 200 MJ 强度下, 紫外交联条件下 DNA 结合最牢固. 紫外交联强度不能过高以免紫外造成 DNA 损伤. 其中紫外交联强度与 DNA 结合强度的对应关系见图 1, 其中玻片表面的 DNA 荧光信号强度代表 DNA 结合强度.

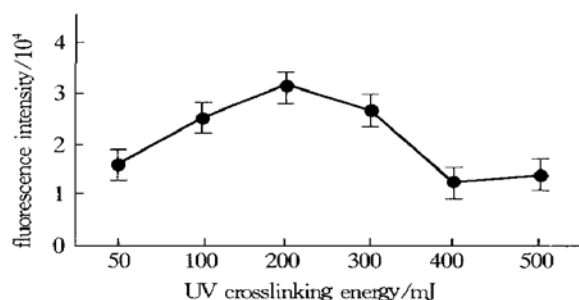


Fig. 1 Immobilization intensity in different UV crosslinking energy

2.2 洗涤温度与时间对 DNA 固定的影响

DNA 结合于玻片后的洗涤对 DNA 的结合及背景的信号有密切关系。如图 2、图 3 所示，洗涤时间越短，温度越低，DNA 结合越强，背景也越高；洗涤时间越长，温度越高，DNA 结合越弱，背景也越低。鉴于玻片荧光背景总体水平较低，为使 DNA 结合较强，选择室温进行洗涤。洗涤次数也影响 DNA 结合，室温中洗涤 5 min 可以满足要求，能够去除玻片表面杂质及游离 DNA，并能降低荧光背景。洗液的种类与离子强度对 DNA 的结合强度影响也较大，在水溶液中洗涤时间过久能明显减少 DNA 结合量，洗涤时间最好不超过 2 min。在上面 1.2.3 的洗涤步骤中，荧光标记 PCR 产物的荧光信号随洗涤过程进行性递减，若继续增加洗涤

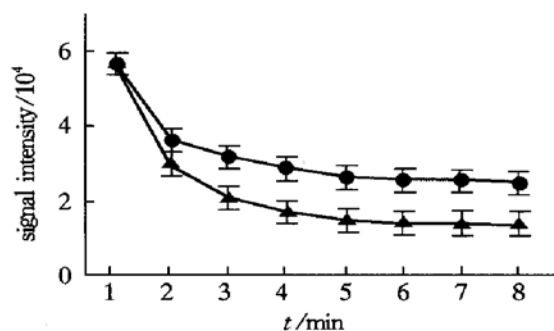


Fig. 2 signal intensity in different wash times

●—●: washing 2 min; ▲—▲: washing 5 min.

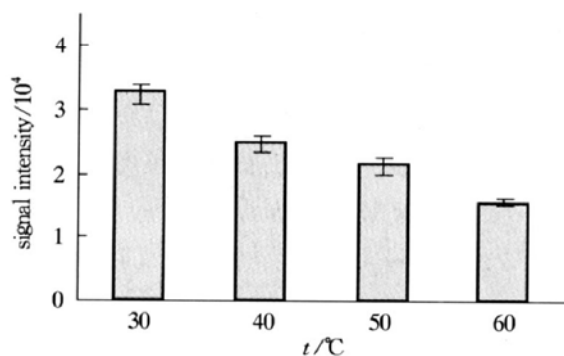


Fig. 3 Immobilization intensity in different wash temperature

步骤，则荧光信号不再继续减弱，有可能是结合不牢固或未与玻片共价结合的 DNA 被洗掉，而结合牢固的 DNA 保留在上面，这样也会保证在实际杂交中杂交体不会被洗掉而造成浪费，所以洗涤条件至关重要。

2.3 载体的选择

主要针对去除非特异结合的干扰又不能使荧光信号明显减弱的目的，选用几种降低背景的方法对玻片进行预处理中，洗涤方法基本不变，选用最佳预处理方法后处理玻片。

结果表明三种载体 DNA 结合强度无明显差别，但氨基片和多聚赖氨酸片制备及处理比醛基片简便，背景相对低，且 DNA 不需进行氨基修饰。

2.4 固定于玻片的 DNA 片段长度及浓度的影响

结果表明，DNA 片段长度在 0.3~1.3 kb 之间时对荧光信号影响不大。而在一定的 DNA 浓度范围内，荧光信号强度与最终固定于玻片上的 DNA 量成正比，当玻片结合 DNA 量达到饱和时继续增加 DNA 浓度则多余的 DNA 则会被洗去，并且荧光信号相对较低，因此 DNA 片段浓度最大不要超过 1.00 g/L。

2.5 DNA 载片变性的影响

结果表明，点片前预变性的荧光信号明显强于载片变性（图 4）。载片变性使 DNA 片段结合量明显降低，并使已牢固结合在玻片上的 DNA 重新脱落。

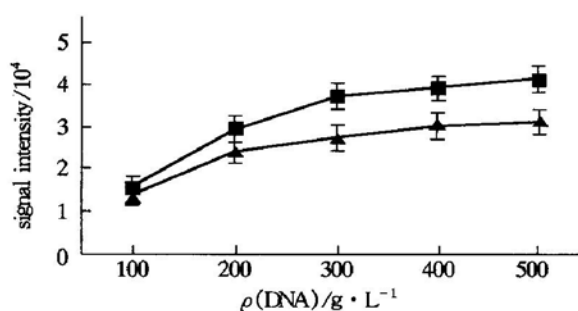


Fig. 4 Signal Intensity vs [DNA] - post vs pre-grid denaturation

■—■: pre-grid denaturation; ▲—▲: post-grid denaturation.

3 讨 论

目前，以功能研究为核心的后基因组计划，要求设计和利用更为高效的硬软件技术，来对如此庞大的基因组及蛋白质组信息进行加工和研究。建立新型、高效、快速的检测和分析技术就势在必行。

了。这些高效的分析与测定技术已有多种, 如 DNA 质谱分析法、荧光单分子分析法、杂交分析等。其中以生物芯片技术为基础的许多新型分析技术发展最快也最具发展潜力。早在 1988 年, Bains 等^[6]就将短的 DNA 片段固定到支持物上, 以反向杂交的方式进行序列测定。当今, 随着生命科学与众多相关学科 (如计算机科学、材料科学、微加工技术、有机合成技术等) 的迅猛发展, 为生物芯片的实现提供了实践上的可能性。生物芯片的设想最早起始于 80 年代中期, 90 年代美国 Affymetrix 公司实现了 DNA 探针分子的高密度集成, 即将特定序列的寡核苷酸片段以很高的密度有序地固定在一块玻璃、硅等固体片基上, 作为核酸信息的载体, 通过与样品的杂交反应获取其核酸序列信息^[4]。生物芯片由于采用了微电子学的并行处理和高密度集成的概念, 因此具有高效、高信息量等突出优点^[7]。

与 PCR 技术一样, 芯片技术已经开展和将要开展的应用领域非常的广泛。生物芯片的第一个应用领域是检测基因表达。但是将生物分子有序地放在芯片上检测生化标本的策略具有广泛的应用领域, 除了基因表达分析外, 杂交为基础的分析已用于基因突变的检测、多态性分析、基因作图、进化研究和其他方面的应用, 微阵列分析还可用于检测蛋白质与核酸、小分子物质及与其他蛋白质的结合, 但这些领域的应用仍待发展。对基因组 DNA 进行杂交分析可以检测 DNA 编码区和非编码区单个碱基改变、缺失和插入, DNA 杂交分析还可用

于对 DNA 进行定量, 这对检测基因拷贝数和染色体的倍性是很重要的^[8]。

用于芯片制备的无孔基质表面使得芯片检测中的生化反应大大受益。玻璃基质所需的反应体积 (5~ 200 μ l) 比传统的分析要小得多 (5~ 50 ml), 小反应体积降低了试剂的消耗, 增加了微阵列分析中核酸的反应物的浓度 (0.1~ 1 μ m), 相对于传统分析 (0.1~ 4 pm) 增加 10^5 倍之多, 浓度的增加又能加速杂交的速度, 从而减少获得强荧光信号的时间, 并可用盖玻片封闭杂交槽进行杂交反应。

参 考 文 献

- 1 David D L, Bowtell M. Option available from start to finish for obtaining expression data by microarray. *Nature Genetics*, 1999, **25** (1): 145~ 146
- 2 Geiss G K, Bumgarner R E, An M C. Large scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology*, 2000, **266** (1): 8~ 16
- 3 Xiang C S, Chen Y D, Yuan J. cDNA microarray and expression in virus infected cells. *Chinese Science Bulletin* 1999, **44** (5): 449 ~ 452
- 4 Markus B, Jorg D H. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27** (9): 1970
- 5 Veilleux J K, Duran L W. Covalent immobilization of biomolecules to preactivated surfaces. Fairfield: IVD Technology Press, 1996. 1~ 20
- 6 Bains W, Smith G C. A novel method for nucleic acid sequence determination. *J Theor Biol*, 1998, **135** (3): 303~ 307
- 7 Sgroi D C, Teng S, Robinson G. *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res*, 1999, **59** (22): 5656~ 5661
- 8 Loftus S K, Chen Y, Gooden G. Informatic selection of a neural crest-melanocyte cDNA set for microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (16): 9277~ 9280

Surface Optimization of Glass Slide Used for The Immobilization of cDNA Probes*

MA Shu-Hua, WANG Sheng-Qi**

(Institute of Radiation Medicine Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Microarray hybridization is a powerful technique in life science since it allows a relatively straightforward determination of gene expression, in respect to distribution as well as quantification. Large-scale hybridization-based mRNA expression mapping projects call for robust and high efficient microarray hybridization techniques that are amenable to automation. However, a major drawback of microarray is the fact that all standard protocols available include time consuming optimization steps of several critical parameters such as DNA fixation to surface of the slides, hybridization conditions and washing procedures. The aim of this investigation was a rational design of DNA probes which were adapted to the standard protocol and could therefore be used without changing any parameter. A rapid microarray technique for quantitative analysis has

been recently introduced. For highly repetitive DNA probes the hybridization time and the number of washing steps were reduced considerably by formamide or equivalent denaturing chemical agents. Due to low stringency conditions major and minor binding sites of the probes showed visible hybridization signals well suited for quantitative image screening. The discrimination of minor and major binding sites to surface of glass slide was possible by automated image processing. With respect to the optimization it was necessary to verify two sensitive parameters (hybridization time and temperature, spotting buffer) of the given microarray protocol. By comparison of several candidate conditions, the optimized standard protocol was constructed.

Key words optimization, cDNA chip, DNA fixation, glass slide

* This work was supported by grants from the Foundation for Outstanding Scientists in PLA (the People's liberation army) the National Basic Research Programs of China (The study of genomics and DNA chip technology common in separation of genes, 39889001).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: May 21, 2001 Accepted: July 23, 2001

小经验介绍

微波在蛋白质电泳染色和脱色中的应用

张延凤

(第四军医大学药理教研室, 西安 710032)

张晓楠

(第四军医大学生化教研室, 西安 710032)

经过实验摸索和实践, 我们发现一种利用微波处理在 10 min 内可使聚丙烯酰胺凝胶染色及脱色完成的方法。

a. 将电泳后的凝胶 (厚度 0.75 mm) 取出, 置于培养皿中用蒸馏水冲去残留缓冲液。b. 加入染色液将凝胶完全浸泡其中, 放入微波炉内高火档照射 20 s, 停留 1 min, 再照射 10 s。c. 取出染色液 (回收还可再用 2 次), 用蒸馏水冲去凝胶上残留染色液。d. 加入脱色液, 高火档照射 20 s, 取出脱色液, 然后加入新鲜脱色液再照射 20 s, 重复

5~6 次, 直至背景清晰透明。

实践中我们认为应注意以下几点: a. 盛试剂的培养皿上面应盖一稍大的培养皿, 防止加热时试剂蒸发损害微波炉。b. 微波照射后试剂温度一般控制在 45~50℃, 以防温度太高损坏凝胶。c. 使用脱色液应少量多次。

通过实际应用, 我们发现这是一种快捷、方便、灵敏度高的方法, 可以在实验室推广和应用。