

# 用氨基修饰的载玻片制作 cDNA 微阵列\*

朱 滨\*\* 景奉香 赵建龙 孙 悦 陈继锋 赵新泰<sup>1)</sup> 徐元森

(中国科学院上海冶金研究所, 传感技术国家重点联合实验室, 上海 200050)

**摘要** cDNA 微阵列已在基因差异表达、寻找新基因等研究方面获得广泛应用, 但有关 cDNA 微阵列的制作, 目前多采用多聚赖氨酸修饰的载玻片为探针固定载体, 固定效果较差. 用氨基硅烷处理的载玻片为载体制作 cDNA 微阵列, 然后考察其固定效率、检测灵敏度、稳定性、实用性等指标. 结果表明, 用氨基硅烷处理的载玻片具有比多聚赖氨酸更令人满意的核酸固定效率、检测灵敏度, 且稳定实用. 因此, 用氨基硅烷修饰的载玻片为探针固定载体制作 cDNA 微阵列较为理想.

**关键词** 微阵列, 生物芯片, 修饰, cDNA

**学科分类号** Q781

DNA 微阵列 (DNA microarray) 也称 DNA 芯片, 包括 cDNA 微阵列和寡核苷酸微阵列. 其在生命科学研究领域中的重要作用已经获得广泛的认同, 并在基因差异表达、基因突变、基因多态性研究、基因诊断等领域获得成功应用<sup>[1-3]</sup>. 寡核苷酸微阵列的制作国外主要采用光诱导的在位合成技术<sup>[4]</sup>, 也有用机器人 (或喷) 制的方法<sup>[5]</sup>, 对于大片的 cDNA 微阵列几乎都采用后一种方法来制作, 只是不同实验室所用的固相支持物有所不同. 早期的 cDNA 微阵列有许多是采用尼龙膜或硝酸纤维素膜为固相支持物, 虽然用膜相对便宜, 并且在膜上的杂交技术较成熟, 但由于液滴在膜上的扩散, 制作的微阵列密度很低; 同时因膜的荧光背景很高, 探针多用放射性同位素标记, 不仅存在放射性污染而且在基因差异表达研究时必需用两张膜, 从而带来较大误差. 因此对于较高密度的 cDNA 微阵列, 固相支持物几乎都采用经修饰的载玻片, 杂交时探针可用荧光标记, 用激光共聚焦扫描仪检测杂交信号, 对于基因差异表达研究还可采用双色荧光标记法<sup>[6]</sup>. 目前国内外制作 cDNA 微阵列时载玻片的修饰方法多用多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 处理<sup>[6,7]</sup>, 但其对 cDNA 的固定效率不高. 为此, 我们研究了用氨基硅烷处理载玻片并用于制作 cDNA 微阵列的方法.

## 1 材 料

### 1.1 仪器

PixSys 7500 DNA Microarray System, Cartesian Technologies Inc; ScanArray 3 000 激光共

聚焦扫描仪, General Scanning Inc; PTC-100 PCR 扩增仪, MJ Research Inc; UV-2000 紫外透射分析仪, 上海天能科技有限公司.

### 1.2 试剂和材料

3-氨丙基-三甲氧基硅烷, Sigma 公司; Cy3 荧光染料, Armashame 公司; 丙酮, 分析纯, 上海化学试剂有限公司; 肝组织 cDNA 克隆样品由上海肿瘤研究所提供;  $\lambda$  DNA 2000 PCR 扩增试剂盒, 华美生物技术有限公司; 载玻片 (75.5 mm × 25.5 mm × 1.2 mm), 上海工玻电器有限公司. 多聚赖氨酸修饰的载玻片, Sigma 公司.

## 2 方 法

### 2.1 载玻片的修饰

取载玻片数片, 置于 2 mol/L NaOH 的 70% 乙醇溶液中浸泡 2 h, 取出后用水荡洗数次, 110 °C 烘干并冷却至室温. 将玻片置于 1% 的 3-氨丙基三甲氧基硅烷-95% 丙酮溶液中浸泡 2 min, 取出用丙酮洗 10 次, 110 °C 烘 30 min 并冷至室温备用.

### 2.2 cDNA 微阵列的制作

分别取人肝组织 cDNA 克隆的 2 099 号片段 (特异性克隆片段+载体) 和  $\lambda$  DNA 2 000 bp 扩增片段 (阴性对照) 溶液 (均为 0.3 mg/L) 各 17  $\mu$ l, 加入 20 × SSC 缓冲液 3  $\mu$ l 混匀, 转移至 384 孔板中, 将板置于 Cartesian Microarray 的点样平台上,

\* 中国科学院九五特别支持项目 (KY95T-12).

\*\* 通讯联系人. 上海博星基因芯片有限责任公司, 上海 200050.

<sup>1)</sup> 上海肿瘤研究所, 上海 200030.

Tel: 021-65633932-138, E-mail: zhubin66@sina.com

收稿日期: 1999-11-29, 接受日期: 2000-01-10

以 2 500 点/cm<sup>2</sup> 的密度在处理好的载玻片上制作微阵列。将制备好的微阵列置湿盒中水化 5 min, 取出置 100 °C 平台上 30 s, 然后面朝下置于 UV 透射分析仪上, 以功率为 0.5 mW/cm<sup>2</sup> 的 320 nm 紫外光照射 18 min 固定。

**2.3 探针的制备**

采用不对称 PCR 方法制备 Cy3 标记的 2 099 号 cDNA 克隆的单链探针。具体方法是: 取稀释 60 倍的 2 099 号 cDNA 克隆溶液作为模板, 以 10 μmol/L 的 SP6 启动子序列 1 μl 和 1/10 量的 T7 启动子序列为引物, 加 10 × 反应缓冲液 5 μl, 10 nmol 的 dATP、dCTP、dGTP 和 5 nmol 的 dTTP, 1 mmol/L 的 Cy3-dUTP 1 μl 和 3U Tag 酶, 加水调终体积为 50 μl。采用 0.2 ml 的薄壁管, 按 94 °C, 5 min, (94 °C, 40 s; 55 °C, 40 s; 72 °C, 90 s) × 30, 72 °C; 5 min 的扩增程序扩增得到 1 900 bp 的单链目的条带, 然后用 PCR 纯化试剂盒纯化扩增产物, 产物最终溶解在适量的 5 × SSC, 0.2% SDS 缓冲液中, 终浓度约为 50 mg/L。

**2.4 杂交**

取标记好的探针溶液加至预先 100 °C 煮沸 30 s 变性的微阵列上, 盖上盖玻片置于湿盒中 65 °C 杂交 4 h, 然后置 2 × SSC, 0.1% SDS 溶液中洗 5 min, 0.1 × SSC, 0.1% SDS 溶液中洗 5 min, 0.1 × SSC 溶液中荡洗数遍, 晾干。

**2.5 检测**

将杂交完毕晾干的 cDNA 微阵列用 ScanArray3000 激光共聚焦扫描仪在适当条件下扫描检测其杂交信号。

**3 结果与讨论**

**3.1 氨基修饰的载玻片对 cDNA 的固定效率**

用经修饰的载玻片固定 cDNA 分子时, 固定效果可以用固定效率来评价。测定固定效率可以将带荧光 (Cy3) 标记的大片段核酸分子直接点在已修饰好的载玻片上, 按照选定的固定条件固定, 在激光共聚焦扫描仪上测定荧光强度 (F<sub>1</sub>), 然后模拟真实杂交条件及洗片条件处理后再测荧光强度 (F<sub>2</sub>), 按照公式: 固定效率 = F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub> × 100%。计算在所选固定条件下该种载玻片对所述核酸片段的固定效率。载玻片的修饰方法不同, 核酸的固定条件不同, 核酸分子的大小结构等因素均会影响最终的固定效率。分别在氨基修饰和多聚赖氨酸修饰的载玻片上, 以 3 × SSC 为固定缓冲液在 320 nm 紫

外光照射下固定 Cy3 荧光标记的 cDNA, 然后测定 cDNA 在两种片子上的固定效率 (表 1)。经 *t* 检验, 氨基修饰的载玻片对 cDNA 的固定效率明显高于多聚赖氨酸修饰的载玻片 (*P* < 0.01)。

Table 1 Immobilization efficiencies of DNA fragments on the slides treated with polylysine and amino-silane

No of slide	Immobilization efficiency of the fragments on the slides/ %	
	Treated with amino-silane	Treated with polylysine
1	35.8	14.6
2	38.7	14.4
3	38.6	12.9
4	40.4	10.6
5	36.9	14.8
6	39.2	14.0
7	40.6	14.2
8	40.5	12.1
$\bar{x} \pm s$	38.8 ± 1.8	13.5 ± 1.5
<i>t</i>		31.378
<i>t</i> <sub>99%</sub>		4.032

大片段核酸分子在氨基修饰和多聚赖氨酸修饰的载玻片上的固定主要是靠紫外照射产生多点交联, 但过多的紫外照射会损伤 DNA, 造成 DNA 断裂而降低固定强度, 因此紫外交联固定核酸分子存在最佳照射时间 (强度) 的问题。实验表明, 功率为 0.5 mW/cm<sup>2</sup> 的 320 nm 紫外光对 cDNA 的最佳紫外照射时间是 18 min。但在测定固定效率时, 由于分布在 cDNA 上的荧光标记基团对紫外光的屏蔽作用, 其最佳照射时间延长为 30 min。

**3.2 cDNA 微阵列的检测灵敏度**

cDNA 微阵列主要被用来研究基因表达等, 由于许多基因表达水平很低, 为了获得这些基因的表达信息, 就要求 cDNA 微阵列的检测灵敏度较高。为此我们考察了氨基修饰的载玻片制成的 cDNA 微阵列的检测灵敏度, 并与多聚赖氨酸修饰的载玻片制成的微阵列进行了比较 (表 2)。从表 2 数据可知, 当标记样品的浓度小至 0.19 μg/L 时, 用后者已检测不到信号, 而氨基修饰的载玻片制成的 cDNA 微阵列还有明显的信号, 因此具有更高的灵敏度。

**3.3 cDNA 微阵列的稳定性**

我们考察了温度、湿度、光照以及暴露于空气中 4 种因素对用氨基修饰的载玻片制成的 cDNA 微阵列使用性能的影响。具体方法是: 分别取 4 片制好的 cDNA 微阵列置于 80 °C 恒温、75% 恒湿、

3 600Lx照度和正常实验室空气 4 种环境中放置 10 d, 然后依法进行杂交实验, 将杂交信号平均强度分别与放置前的杂交信号平均强度进行比较 (表 3), 经  $t$  检验 4 种因素对依法制成的 cDNA 微阵列

的使用没有显著影响 ( $P > 0.1$ ). 但杂交后产生的荧光信号随着贮存时间而衰减. 常温常压下, Cy3 标记信号的半衰期约为 35 d. 若将杂交后的微阵列密封贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$ , 可明显抑制信号衰减.

Table 2 Detectivity of cDNA microarrays made by different modified slides

$\rho$ (Cy3-dUTP labeled cDNA) / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Related fluorescent intensity of cDNA microarray	
	With amino-silane treated slides	With polylysine treated slides
3.12	$23\,632 \pm 1\,931$	$17\,710 \pm 3\,289$
0.78	$13\,374 \pm 1\,042$	$1\,714 \pm 505$
0.19	$3\,867 \pm 556$	—*

\* none signal was detected.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ .

Table 3 Comparison of the hybridization signals of cDNA microarrays made by different modified slides stored in four conditions

Stored conditions	Related fluorescent intensity of cDNA microarray ( $\bar{x} \pm s$ )		$t$	$t_{90\%}$
	Before store ( $n = 10$ )	After store ( $n = 4$ )		
Constant temperature, $80^{\circ}\text{C}$	$16\,961 \pm 1\,879$	$18\,224 \pm 2\,574$	0.49	2.353
Constant humidity, 75%	$16\,961 \pm 1\,879$	$19\,557 \pm 2\,250$	1.15	2.353
Illuminance, 3 600Lx	$16\,961 \pm 1\,879$	$16\,423 \pm 1\,768$	0.30	2.353
Exposed in air, RT	$16\,961 \pm 1\,879$	$16\,598 \pm 1\,681$	0.21	2.353

### 3.4 用 cDNA 微阵列检测基因表达水平

按照以上研究建立的方法, 由上海肿瘤研究所考察了用氨基修饰的载玻片制成的由 1 538 个克隆组成的 cDNA 微阵列检测人正常肝组织基因表达水平的可行性, 获得了较满意的结果 (图 1).

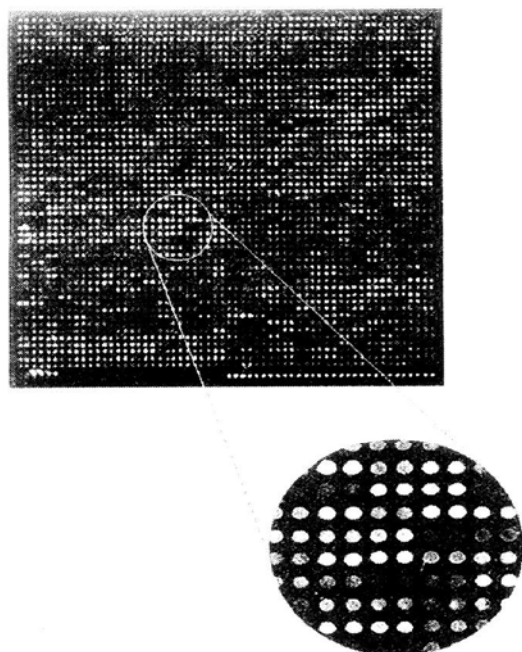


Fig. 1 Gene expression monitored with the use of cDNA microarray made by amino modified slide  
Total 3132 dots in  $1.2\text{ cm} \times 1.2\text{ cm}$  area, each cDNA fragments from human liver tissue was dotted two times.

## 4 结 论

对于 cDNA 微阵列的制作, 氨基修饰的载玻片具有比多聚赖氨酸更令人满意的核酸固定效率和检测灵敏度. 用其制成的 cDNA 微阵列, 在正常范围内, 温度、湿度、光照和空气中暴露等因素不影响其使用.

致谢 郑养钵、章洪生、翁建华、郑庆云等同志对本研究给予了极大帮助, 特此致谢.

## 参 考 文 献

- 1 Wang D G, Fan J B, Siao C J, *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, **280** (5366): 1077~ 1082
- 2 Service R F. Microchip arrays put DNA on the spot. *Science*, 1998, **282** (5388): 396~ 399
- 3 Winzeler E A, Richards D R, Conway A R, *et al.* Direct allelic variation scanning of the yeast genome. *Science*, 1998, **281** (5380): 1194~ 1197
- 4 Pease A C, Solas D, Sullivan E, *et al.* Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (11): 5022~ 5026
- 5 Zhen G, Richard A G, Andrew J T, *et al.* Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl Acids Res*, 1994, **22** (24): 5456~ 5465

- 6 Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (5235): 467~ 470
- 7 DeRisi J L, Lyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, **278** (5338): 680~ 686

## Manufacture of Complementary DNA Arrays on Amino-modified Slides\*

ZHU Bin\*\*, JIN Fei-Xiang, ZHAO Jiar-Long, SUN Yue, CHEN Ji-Feng, ZHAO Xir-Tai, XU Yuan-Sen  
(State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Metallurgy Institute, The Chinese Academy of Science, Shanghai 20050, China)

**Abstract** The use of microarrays of oligonucleotides or cDNA is considered to be a promising approach for DNA and RNA sequence analysis, diagnostics of genetic diseases, gene polymorphism studies and analysis of gene expression. To manufacture cDNA microarrays the samples were printed onto glass microscope slides treated with poly-L-lysine, and then the slides were processed by heat and UV light treatment to attach the cDNA sequence to the glass surface. But the immobilization efficiency of cDNA on the glass surface was low. A simple procedure for manufacture cDNA microarrays on a slide treated with 3-aminopropyltrimethoxysilane is described. The efficiency for attaching cDNA to the amino-modified slides is greater than that to the slides treated with poly-L-lysine. The cDNA microarray made by the amino-modified slides is stable for use in 80 °C, 75% humidity, 3 600Lx light, exposure in air, respectively.

**Key words** microarray, biochip, modification, complementary DNA

\* This work was supported by a grant from the 9th Five Years Plan Special Research Programs of the Chinese Academy of Sciences (KY95T-12).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-21-65633932-138, E-mail: zhubin66@sina.com

Received: November 29, 1999 Accepted: January 10, 2000