

两种氨基修饰的基因芯片表面制备方法比较

基因芯片(DNA微阵列)已逐渐成为现代分子生物学中一项强有力的工具,它具有高通量、微型化和平行分析的特点,在基因突变检测与多态性分析[1][2][3]、药物筛选[4]、基因表达变化监控[5][6]以及法医鉴定、环境监测等领域有着广泛的应用。

基因芯片表面的制备是芯片制作中一个关键步骤,它采用合适的功能基团修饰表面以便DNA(cDNA或寡核苷酸)连接在固相载体上。在基因芯片技术中化学通式为 $(RO)_3Si(CH_2)_nX$ 的双官能硅烷试剂已广泛地用于修饰和活化玻片[7][8]。许多化学反应如氨基修饰[9][10]、醛基修饰[7][11]、巯基修饰[12]、多糖修饰等[13]被研究,但是氨基修饰表面在芯片中应用更广泛。虽然玻片在化学修饰和低荧光背景上有优势,但是平整致密的表面结构使其在芯片制作时探针上样量受到限制,为了克服这一缺点,在本研究中对玻片进行表面化学处理,衍生出多分支连接系统或在玻片表面聚合上具有溶胀性的聚合物分子来克服上样量不足的缺点,同时对玻片进行化学预活化,使玻片带有3D活性功能。本研究设计了两种方法利用表面化学反应将富含氨基的化合物或聚合物以共价键方式连接到预先硅烷化的显微载玻片上,然后利用官能团交联分子活化玻片表面,使DNA能快速、稳定地结合在玻片上;为了确定玻片的性能,将两种表面化学处理的玻片应用在噬菌体基因组芯片的研制中,并与商业化玻片进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

玻片处理的化学试剂部分购自Sigma-Aldrich公司(US),一些常用的有机溶剂为国内生产;Cy3-Amidite购自Amersham Pharmacia(UK);CMT-GAPS氨基硅烷化玻片购自Corning公司;自处理的玻片为国产的光学显微载玻片(25×75×1mm); λ 噬菌体(Bacteriophage λ c I857 Sam 7, 48 502 bp)、大肠杆菌 E. coli XL-1为本室保存;Taq酶、dNTP、X-Gal、IPTG、pMD-18T载体等购自TaKaRa Biotech;3S PCR产物纯化试剂盒购自上海博采公司;通用引物U(5'-GTTTGGCTGGTGTGGATC-3'),Cy3标记的通用引物U(5'-Cy3-TTTGGCTGGTGTGGATC-3'),接头(SIP:5'-pGATCmCACACCAGCCAAACCCA-3')和SIR:5'-GGTTTGGCTGGTGTG-3'), λ 噬菌体PCR扩增引物F1/F2和S1/S2:F1(5'-ACGAATTCGAGCTCGTACC-3'),F2(5'-AGTGCCAAGCTTGCATGCCT-3'),S1(5'-CCGGGGATCCTCTAGAGATT-3'),S2(5'-ATGCCTGCAGGTCGACGATT-3'),上述引物由本室ABI3900DNA合成仪合成。

1.2 玻片的清洗与硅烷化

将玻片浸于1 M的NaOH中2 h,浸泡过程中放在摇床上震动,用灭菌水清洗干净后放入1 M HCL中浸泡过夜,再用灭菌水清洗干净。

玻片的硅烷化:清洗后的玻片放入硅烷化溶液中(9%的氨丙基三甲氧基硅烷(APS)溶于90%的甲醇)硅化30 min,用纯甲醇溶液清洗,再用灭菌水清洗三遍,110 °C烘干。

1.3 两种氨基敏感表面的生成与表面活化

1.3.1 多组分的多氨基化合物包被与表面活化 (1) 酰化反应: 硅烷化的玻片浸于1 mmol二异丙基乙胺和1 mmol丙烯酰氯的无水二氯乙烷溶液中摇晃反应2 h, 随后用二氯乙烷清洗, 烘干。(2) 氨化反应: 1 mmol氨化反应液的配制: 0.67 ml的四亚乙基五胺、0.65 ml 1.4-对-(3-氨丙氧基)-丁烷、0.56 ml 4-氨甲基-1, 8-辛二胺、0.66 ml 4, 7, 10-三氧-三二唑啉硫酮二胺、0.52 ml N, N-二甲基-1, 6-己二胺、0.30 ml 2-(2-氨乙氧基)乙醇、0.021 ml氨基-1, 2-丙二醇和0.73 ml Jeffamine八种氨基化合物溶解于100 ml无水的二甲基甲酰胺(DMF)中, 将酰化好的玻片置于氨化反应溶液中过夜, 反应时摇晃, 然后玻片依次用DMF, 甲醇和丙酮清洗, 烘干。以上两个反应可以重复, 直至所需的连接分子衍生在玻片表面。(3) 表面活化: 将上述氨化液处理的玻片用次亚苯基二异硫氰酸盐溶液(phenylenediisothiocyanate, PDITC)活化2 h, 192 mg PDITC 溶于40ml含10%无水吡啶的DMF中, 然后用DMF, 二氯乙烷清洗, 干燥。

1.3.2 丙烯酸-丙烯酰胺聚合物包被与表面活化 (1) 包被液的配制: 0.8%的国产丙烯酸和0.2%的国产丙烯酰胺溶于ddH₂O中并70 °C加热, 加热过程中缓慢加入0.8%的过硫酸胺做催化剂。包被液可以在4 °C保存备用。(2) 表面活化: 活化液组分: 0.1 M碳二亚胺(EDC)和20 mM N-羟基琥珀亚胺酯(NHS)溶于0.1 M PH 为6.0的K₂HPO₄和KH₂P0₄的缓冲液中。将APS硅烷化的玻片浸入1:1包被液和活化液的混合液中3 h, 反应时不断摇晃, 随后用的ddH₂O清洗玻片3次, 玻片放入离心机中500 r/min离心5 min, 烘干, 暗盒保存备用。

1.4 λ噬菌体基因组DNA探针的制备

λ噬菌体基因组DNA探针的制备主要步骤包括: (1) 酶切反应: λDNA用Sau3AI酶切; (2) 补平加A反应; (3) A-T克隆(载体为PMD18-载体, 感受态细胞为新鲜制备的大肠杆菌JM109感受态细胞); (4) 克隆鉴定; (5) 第一次PCR反应、电泳(引物为F1, F2); (6) 第二次PCR反应、电泳(引物为S1, S2); (7) PCR产物纯化, 收集探针, 详细的实验操作步骤参见文献[14]。

1.5 λ噬菌体基因芯片的制备

将收集好的探针溶解在50%DMSO中, 调整终浓度为1 mg/ml, 用Cartesian PixSys 5500 robot (Cartesian Technologies) 芯片打印仪将探针打印到所处理的两种氨基化玻片上, 并用CMT-GAPS氨基硅烷化玻片(Corning 公司)做比较。共打印396个样品, 其中λ噬菌体DNA探针有381个, 阳性对照有4个, 阴性对照(非λ噬菌体DNA探针)有4个, 空白对照7个(50% DMSO, 其中4个定位边角); 每个样品打印3个点, 打印成33×36的阵列; 每张玻片打印6个阵列。打印完后将芯片正面朝下至于3×SSC盐水湿盒上方再水合化, 然后迅速的置入100 °C温箱中干燥, 紫外交联仪以65 mJ/cm²的总能量进行交联固定, 使探针进一步交联在玻片表面, 干燥后室温、暗盒保存备用。

1.6 杂交样品的制备

1.6.1 λDNA用Sau3AI进行酶切 在200 μl的PCR反应管内加入10×H buffer 1 μl, λDNA (0.4 μg/μl) 2 μl, Sau3AI (10 U/μl) 1 μl, 补加超纯水6 μl至总体积10 μl。旋摇混匀后, 在37 °C水浴3 h; 然后于70 °C温育15 min, 终止反应。

1.6.2 酶切片断加接头 酶切片段两端加上的通用接头由两条单链寡核苷酸SIP(500 μg/μl)、SIR(600 μg/μl)逐渐降温退火而成, 含有可与Sau3A I酶切位点互补的粘性末端。在EP管中加入10 μl cDNA酶切反应液, 1 μl通用接头, 1 μl T4 DNA连接酶, 2 μl 10×buffer, 6 μl ddH₂O, 反应总体积20 μl, 16 °C保持2 h。

1.6.3 λDNA样品荧光标记 根据接头序列和内切酶粘端序列设计荧光标记的通用引物U(Cy3-UP), 于PE公司9700型PCR仪进行扩增并荧光标记, 反应体系为1 μl Cy3-UP, 5 μl加接头的cDNA反应液, 10 μl 2×PCR预混液, 4 μl ddH₂O, 反应总体积20 μl。反应参数为95 °C变性5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s)共25个循环, 72 °C延伸5 min, -20 °C储存。使用3S PCR产物纯化试剂盒对标记的λDNA样品(PCR产物)进行纯化。

1.7 杂交与检测

在标记的样品5 μl中加入5 μl 2×杂交液(50%甲酰胺, 10×SSC, 0.2%SDS), 混匀; 95 °C变性5 min; 最大转速离心2 min; 滴加到阵列上, 盖上盖玻片封闭, 42 °C杂交2 h。然后依次在2×SSC/0.1%SDS, 0.1×SSC/0.1%SDS, 0.1×SSC溶液中清洗玻片, 灭菌水漂洗后, 无水乙醇脱水, 室温下干燥。用Agilent基因芯片扫描仪进行扫描。

2 结果

在本研究中我们设计了两种方法来制备氨基修饰的基因芯片表面，玻片表面处理完毕后，并将目的DNA固定在芯片表面，化学反应过程如图1A、B所示。图1A代表性地画出了多氨化合物四亚乙基五胺和1,4-对-(3-氨丙氧基)-丁烷在玻片上分支结构形成的过程。

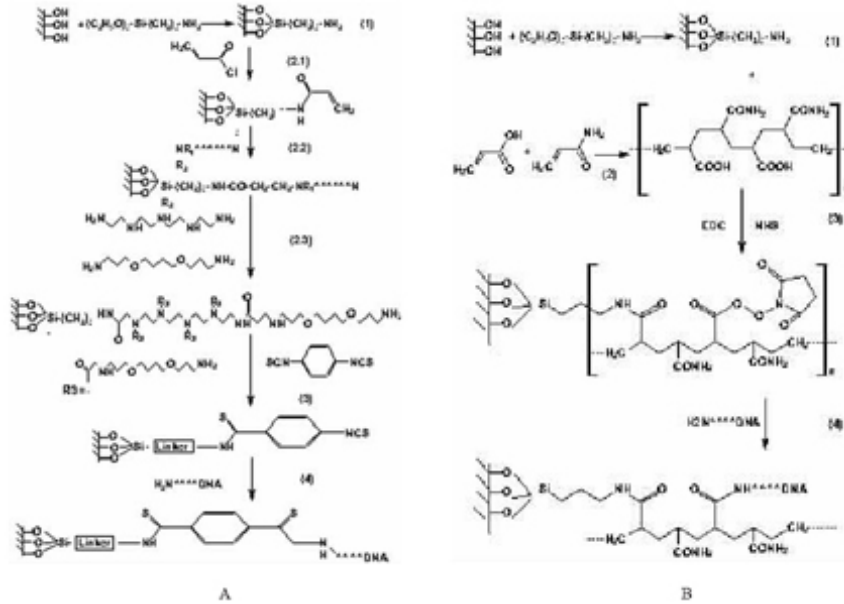


图1 玻片修饰的化学过程

Fig.1 Chemical process of microslide modification

A: Microslide modified by poly-amine chemicals; B: Microslide modified by poly (acrylic acid -co-acrylamide) copolymer

在 λ 噬菌体基因组DNA探针收集过程中，对二次PCR反应后电泳条带单一、清晰、片段大小在200~1000 bp的PCR产物纯化后作为探针、共收集381个不同大小的基因片段。 λ 噬菌体部分探针收集的第一、二次PCR克隆鉴定结果如图2、3所示。

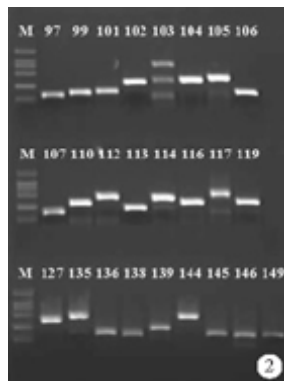


图2 第一次PCR克隆鉴定电泳图

Fig.2 Electrophoresis of the first PCR products from the white clones of lambda phage genomic fragments

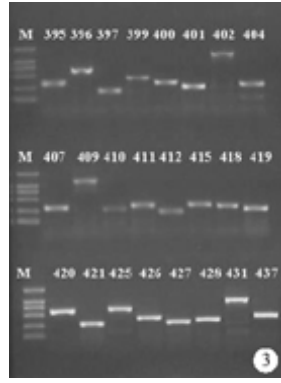


图3 第二次PCR产物电泳图

Fig.3 Electrophoresis of the second PCR products

所制得的λDNA芯片用于限制性荧光标记的样品杂交后扫描。扫描参数：Green PMT(%)=70，Scan resolution=10 μm；Dye channel=green。用 Feature Extraction 软件阅读和分析所扫描的芯片杂交结果，两种芯片和对照的CMT-GAPS氨基硅烷化芯片杂交结果如图4A、B、C所示。

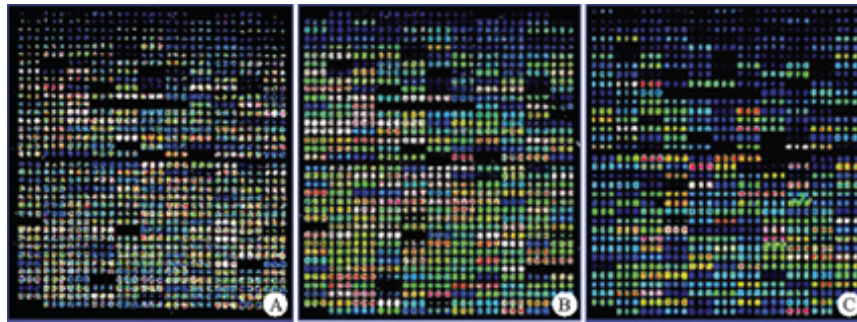


图4 芯片的杂交结果

Fig.4 Results of microarray hybridization

A, B, C: Display the hybridization results of poly-amine slides, poly(acrylic acid - co-acrylamide)copolymer slides and Corning CMT-GAPS slides respectively

3 讨论

在基因芯片研究中，能否快速、稳定、精确地将目的DNA片段连接到被修饰的表面，直接影响到基因芯片的质量。本研究中我们衍生了两种氨基化敏感芯片表面：一种是多组分的多氨化合物连接系统，另一种是丙烯酸-丙烯酰胺聚合物系统。这两种方法在硅烷化反应和化学结合到表面的主要过程基本相同，主要包括以下化学反应步骤：(1) 玻片的硅烷化；(2) 用氨基化合物(或聚合物)包被玻片，形成氨基化表面；(3) 表面活化；(4) DNA固定到活化表面。在多组分的多氨化合物连接系统中，硅烷化的玻片先经过酰化试剂反应后，再与氨化物反应，产生多元胺分支，形成树状结构。因此，玻片表面的上样量以与多氨化合物反应提高的方式而高效增加。同时表面经PDITC交联分子活化在聚合物表面形成多重活化位点，能沿着表面的修饰链牢固的固定目的DNA片段。在丙烯酸-丙烯酰胺聚合物系统中，丙烯酸和丙烯酰胺在玻片表面发生聚合反应，以共价键连接的方式形成聚合物分子层，经EDC和NHS官能团分子活化，能与DNA中的氨基发生共价结合将目的片段稳定地固定在玻片上；且利用聚合物溶胀性的特点，进一步增加上样量。以上两种玻片有一个共性，即表面富含带正电的氨基，氨基的数量控制着正电荷的数量，从而影响表面的性能。在基因芯片中，特别是对短的寡核苷酸芯片而言，正电有利于杂交。另一方面，带正电的表面探针片段因静电反应不易脱落而有利于提高芯片的性能。

本研究中制备两种玻片在入噬菌体基因组DNA芯片制备中取得了良好结果,对扫描后三个微阵列用Genepix pro提取全部点阵数据并进行阵列相关性分析。分析结果表明,三个阵列的一致性很高,平均荧光信号强度达到 2.6×10^4 ,所有点的直径在 $350 \sim 500 \mu\text{m}$ 的范围,完全符合芯片检测分析的要求。从图4a, b, c杂交结果可以看出,芯片点阵所显示的探针杂交信号均匀、稳定、清晰、信号强度高,杂交点饱满。与商业化的CMT-GAPS氨基硅烷化玻片(corning公司)比较,本研究芯片的信号强度、背景和点的同一性都好,完全适宜于基因芯片的研制,玻片的处理也能实现国产化生产。比较两种芯片表面的研制过程,多组分的多氨化合物玻片修饰中玻片表面处理流程较复杂、处理能力小、成本较高(处理所用试剂种类多)、毒性大(用到甲酮、丙酮、二氯乙烷等有毒溶剂),而丙烯酸-丙烯酰胺聚合物玻片的表面处理毒性低,成本低,能进行大规模的生产,是一种更理想的芯片载体表面的制备方法。

参考文献:

- [1]Hacia JG, Collins FS. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays[J]. J Med Genet, 1999, 36(10): 730-6.
- [2]Hacia JG, Sun B, Hunt N, et al. Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays [J]. Genome Res, 1998, 8(12): 1245-58.
- [3]Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays [J]. Nat Genet, 1999, 21(1 Suppl): 42-7.
- [4]Milner N, Mir KU, Southern EM. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 537-541.
- [5]Hyung-Lae Kim. Comparison of oligonucleotide-microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) in transcript profiling analysis of megakaryocytes derived from CD34+ cells [J]. Exp Mol Med, 2003, 35(5): 460-6.
- [6]Li S, Ross DT, Kadin ME, et al. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray[J]. Am J Pathol, 2001, 158(4): 1231-7.
- [7]Zammatteo N, Jeanmart L, Hamels S, et al. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays[J]. Anal Biochem, 2000, 280:143-50.
- [8]Halliwell CM, Cass AE. A Factorial Analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotide on glass surfaces[J]. Anal Chem, 2001, 73: 2476-83.
- [9]Strother T, Hamers RJ, Smith LM, et al. Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(18): 3535-41.
- [10]Véronique Le Berre, Emmanuelle Trévisiol, Adilia Dagkessamanskaia, et al. Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: e88.
- [11]Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:10614-9.
- [12]Anderson S, Roger YH, Huang ZJ, et al. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays[J]. Anal Biochem, 1999, 266: 23-30.
- [13]Afanassiev V, Hanemann V, Stefan W, et al. Preparation of DNA and protein microarrays on glass slides coated with an agarose film [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28 (12):

66e-66.

[14]Wang HM, Ma WL, Huang H, et al. DNA microarray probes preparation by gel isolation nested PCR[J]. J Biochem Mol Biol, 2004, 37(3): 281-7.

[回结果列表](#)