

[通 讯]

单晶硅作为新型的基因芯片基底的探索*

孙 幽 武 巍 洪 莲 赵新生

(北京大学化学与分子工程学院 分子动态与稳态结构国家重点实验室, 化学生物学系, 北京 100871)

摘要 成功地将单晶 Si(111)表面光化学引入官能团的技术与水溶性碳二亚胺催化多肽合成技术结合起来, 制备并表征了 ss-DNA 共价修饰的 Si(111)表面. 进一步证明了该表面具有特异性杂交的活性和反复使用的稳定性. 为制备出可靠的、可反复使用的基因芯片提供了一种新的方法.

关键词: 基因芯片, 硅(111)表面, 寡聚核苷酸, 酯缩合反应, 共价键合, 反复使用

中图分类号: O793

由于基因组及后基因组计划的开展, 近年来基于杂交特异性而发展起来的 DNA 识别技术得到了迅速的发展. DNA 芯片技术将大量 DNA 探针以一定的阵列固定在表面上, 通过一次实验即可得出大量的序列信息, 在基因组计划中起到了重要的作用并得到了长足的发展. 目前的 DNA 芯片技术主要是基于硅烷化处理的玻璃表面或纤维素膜的表面来固定 DNA 探针^[1-6], 虽然实验证明以上技术是可行的, 但由于表面活性基团数目的不确定性, 修饰上的 DNA 探针密度不能很好地重复, 造成各次实验之间缺乏可比性. 而且, 由于修饰表面的化学稳定性不够好, 芯片无法被反复多次使用.

本文将近年来发展的单晶 Si(111)表面光化学引入官能团的技术^[7-13]与水溶性碳二亚胺催化多肽合成技术^[14]结合起来, 成功地将 ss-DNA 通过共价键合的方式修饰在 Si(111)表面上, 并对其特异性杂交的活性和反复使用的稳定性进行了较为系统的研究. 为解决 DNA 芯片可控及可反复使用的问题提供了一种很有希望的途径.

1 实 验

1.1 试剂及仪器

硅片(p - (111), $(1-1.5) \times 10^{-2} \Omega \cdot \text{cm}$, 北京有色金属研究院提供); 1-(3-dimethylaminopropyl)

-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Acros, 98 + %), N-hydroxy succinimide (NHS, Acros, 98 + %), 2-(*N*-吗啉代)乙磺酸(MES)和三羟甲基氨基甲烷(Tris)均由 Sigma 公司购买; 超纯水(18.2 M $\Omega \cdot \text{cm}$), 汞灯(125 W); ω -十一碳烯酸甲酯(UME)由 ω -十一碳烯酸(99%, Acros)合成, 产品鉴定与文献中结果一致^[13]; Fluorescein Phosphoramidite (FAM)修饰的单链寡聚核苷酸, 与之互补的单链寡聚核苷酸, 以及与之错配的单链寡聚核苷酸均由上海生物工程公司合成, 序列见表 1.

表 1 寡聚核苷酸系列的序列及荧光标记
Table 1 Sequences and labels of oligonucleotides

Name	Sequence (5'-3')	Label
K38129	ATG GGC <u>GTC</u> ATG AAC	5'- FAM
K38130	GTT CAT <u>GCC</u> GCC CAT	None
K38131	GTT CAT <u>GAC</u> GCC CAT	None

自配杂交缓冲液 (0.2% SDS(十二烷基碘酸钠)溶于 $2 \times \text{SSPE}$ ^[15]中)^[7]和自配 R191 缓冲液 (50% 甲酰胺 1% SDS、2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、200 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶于 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH = 8.0), 所用试剂均为分析纯. 对样品的荧光检测在显微拉曼仪 (Renishaw 1000)上完成.

1.2 硅表面修饰

1.2.1 羧基终止硅表面的获得

将硅片经清洗、腐蚀处理制备成氢终止的硅表面,加入 UME 后在 N_2 保护下用紫外光照射一定时间,使表面形成致密的共价结合的有机膜^[12-13]. 超声清洗后将样品先后浸泡在饱和叔丁醇钾的二甲基亚砜(DMSO)液中 1min, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液中 5 min,使表面的酯键完全酸化,得到羧基终止的硅表面. 超声清洗后保存备用.

1.2.2 寡聚核苷酸在硅表面的共价修饰

将合成用溶液($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单链寡聚核苷酸、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDC、 $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NHS 溶于 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES 缓冲液中(pH = 6.5)), 取约 $20 \mu\text{L}$ 滴在处理好的羧基终止的硅表面上,放置于冰箱中过夜. 取出后用超纯水彻底冲洗,然后浸泡在 R191 缓冲液中, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 5 min, 超纯水冲洗. 重复以上洗涤过程两次,超纯水彻底冲洗后,将制备好的硅片置于 $5 \times \text{SSC}$ ^[15]液里, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用.

对比实验中将所用合成液改为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单链寡聚核苷酸的 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES(pH = 6.5)的溶液,不加入缩合剂 EDC 和 NHS. 其余条件与样品制备完全一致.

1.3 芯片与荧光标记目标分子的杂交和洗脱条件

将固化了寡聚核苷酸的硅片在 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光标记的目标分子的杂交缓冲液中浸泡 20 min,使表面探针与目标分子充分杂交. 在无目标分子的杂交缓冲液中 2 次浸泡 5 min,以充分洗去未杂交的荧光标记分子^[6]. 然后直接在该缓冲液中检测杂交后荧光光谱. 以上操作均在室温下进行.

1.4 去杂交及再杂交条件

将使用过的芯片在 R191 溶液中室温下浸泡 6 min,然后用超纯水充分洗涤后即可进行下一次的杂交过程,杂交条件同上.

2 结果和讨论

2.1 DNA 探针在硅(111)表面的共价修饰

光化学合成的硅羧表面和 FAM 修饰的寡聚核苷酸片断 K38129 在 EDC 和 NHS 的催化下发生酯缩合反应,将寡聚核苷酸片断以酯键共价结合在单晶硅表面. 其化学过程的示意图见图 1.

图 2 为酯合成后硅片的荧光表征. 线 a 是 K38129 与羧基终止硅表面发生酯缩合反应后的硅片在杂交缓冲液中被 488 nm 激光激发的荧光光谱,

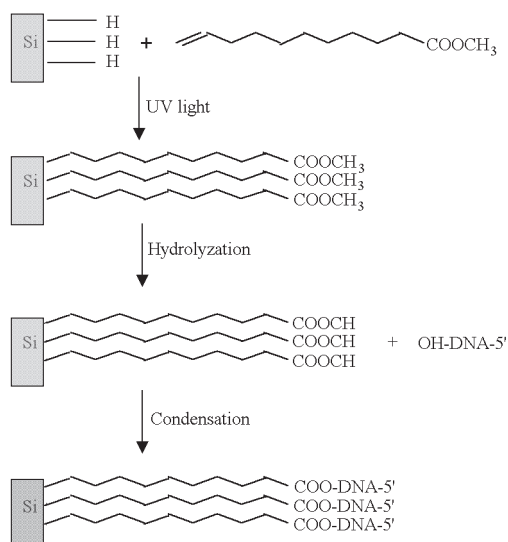


图 1 寡聚核苷酸共价结合在单晶硅表面化学过程的示意图

Fig. 1 Illustration of oligonucleotide immobilization procedure on Si(111) surface

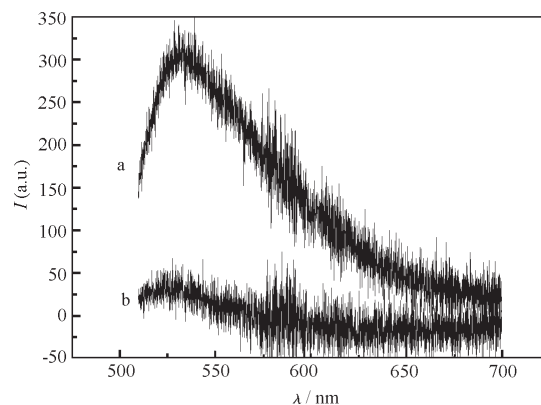


图 2 FAM 修饰的寡聚核苷酸片断在硅表面上的共价键合(a)及吸附(b)的荧光信号

Fig. 2 FAM labelled oligonucleotide synthesis on carboxyl terminated silicon (111) surface
Line a is from chemically immobilized sample and b is from control

530 nm 处峰为 FAM 标记的寡聚核苷酸的荧光信号. 线 b 是合成时不加入 EDC 和 NHS, 其它条件与样品完全相同的结果,其信号可视为寡聚核苷酸在表面的物理吸附,其光谱与未经处理的硅羧表面几乎重合,可见核苷酸在表面上的物理吸附非常微弱. 由此图可以判定寡聚核苷酸通过酯缩合反应被共价键合在了羧基终止的单晶硅表面上.

2.2 表面探针与荧光标记目标分子的特异性杂交

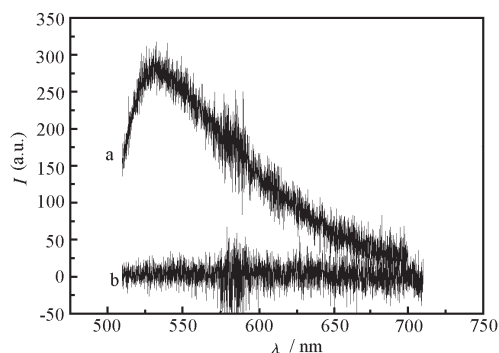


图3 寡聚核苷酸共价修饰的单晶硅片作为核酸探针与目标分子杂交前后荧光强度的改变

Fig. 3 The fluorescence spectra after probe-target hybridization

(a) the probe is complementary to the target

(b) the probe is not complementary to the target

图3显示了共价合成在硅表面上的寡聚核苷酸片断作为核酸探针针对目标分子的特异性识别. 所用硅片为未经标记的寡聚核苷酸 K38131(与 K38129 互补)和 K38130(与 K38129 不互补)共价修饰的硅表面, 与目标分子杂交前是没有荧光信号的. 线 a 是与 FAM 修饰的与探针序列完全互补的目标分子 K38129 杂交后的荧光信号, 530 nm 处出现明显荧光峰. 线 b 是 K38130 修饰的硅表面与 FAM 修饰的 K38129 杂交后的荧光光谱. 可见当表面探针与目标分子不是完全互补时, 观测不到标记目标分子的荧光信号, 说明杂交反应不会发生. 而当表面探针与目标分子完全互补时可以观测到明显的荧光信号, 可见用我们的方法共价固定在单晶硅表面的基因探针具有预期的杂交活性和序列特异性识别能力. 实验证明其检测的灵敏度至少可达到皮摩尔量级.

2.3 芯片的反复使用性

基因芯片昂贵的价格一直是阻碍其更广泛使用的一个重要因素. 制备出可反复使用的基因芯片必然会使单次实验的价格成倍降低, 为基因芯片被更为广泛的应用提供可能. 为了重复多次使用芯片, 我们采用 R191 缓冲液作为杂交后探针再生的去杂交溶液. 图4为芯片多次使用时表面探针与互补目标分子杂交前后 FAM 荧光峰的积分光强的比较.

由图可见, 用 R191 洗后(空心柱), FAM 的荧光信号几乎完全消失, 表明杂交在表面上的目标分子

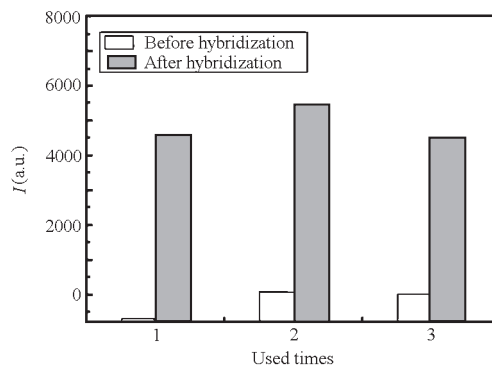


图4 芯片反复多次使用性

Fig. 4 The reusability of the chip

The filled column is the integrated intensity of the chip after hybridization with the complementary target; and the unfilled column is that of the chip after denaturation and before rehybridization

已被完全洗去. 再生后的芯片与完全匹配目标分子杂交后(实心柱)有明显的荧光信号且多次反复使用的芯片杂交前后荧光强度与第一次使用相比没有出现减小的趋势, 说明芯片在再生后仍然具有序列特异性识别的能力. 探针与基底共价键合的化学稳定性使其在多次的杂交、洗涤和去杂交过程中表面探针的数量几乎没有损失. 可见用我们的方法制备出的基因芯片是可以被反复使用的.

3 结论

制备并表征了 ss-DNA 共价修饰的 Si(111) 表面. 并进一步证明了其特异性杂交的活性和反复使用的稳定性. 为制备出可靠的、可反复使用的基因芯片提供了一种有希望的新途径.

References

- 1 Yang M, Kong R Y C, Kazmi M, Leung K C. *Chem. Lett.*, **1998**, 3: 257
- 2 Henke L, Piuino P A E, McClure A C, Krull U J. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, **344**: 201
- 3 Chrisey L A, Lee G, O'Ferrall C E. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, **24**: 3031
- 4 Rogers Y, Jiang-Baucom P, Huang Z, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino M T. *Anal. Biochem.*, **1999**, **266**: 23
- 5 Piuino P A E, Krull U J, Hudson R H E, Damha M J, Cohen H. *Anal. Chim. Acta*, **1994**, **288**: 205
- 6 Xiao PF, He NY, He QG, Zhang CX, Wang YW, Lu ZH, Xu JQ. *Science in China, Series B*, **2001**, **44**: 442 [肖鹏峰, 何农跃, 贺全国, 张春秀, 王轶文, 陆祖宏, 徐吉庆. 中国科学(B 辑)]

- (*Zhongguo Kexue B*), **2001**, **44**: 442]
- 7 Strother T, Hamers R J, Smith L M. *Nucleic Acid Res.*, **2000**, **28**: 3535
- 8 Linford M R, Fenter P, Eisenberger P M, Chidsey C E D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**: 3145
- 9 Boukherroub R, Morin S, Bensebaa F, Wayner D D M. *Langmuir*, **1999**, **15**: 3831
- 10 Strother T, Cai W, Zhao X S, Hamers R J, Smith L M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, **122**: 1205
- 11 Terry J, Linford M R, Wigren C, Cao R Y, Pianette P, Chidsey C E D. *J. Appl. Phys.*, **1999**, **85**: 213
- 12 Boukherroub R, Wayner D D M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, **121**: 11513
- 13 Wu RG, Ouyang JH, Zhao XS, Huang XH, Huang HZ, Wu NZ. *Acta Phys-Chim. Sin.*, **2001**, **17**(10): 931 [吴瑞阁, 欧阳贱华, 赵新生, 黄小华, 黄惠忠, 吴念祖. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2001**, **17**(10): 931]
- 14 Deepak S, Inder K V. *Anal. Biochem.*, **1994**, **218**: 87
- 15 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术, 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 743

Single Crystal Silicon Surface as a Novel Substrate of Gene-chip*

Sun Bin Wu Wei Hong Lian Zhao Xin-Sheng

(*State Key Laboratory of Molecular Dynamic and Stable Structures, and Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871*)

Abstract Single strand oligodeoxynucleotide was covalently attached to the alkyl modified silicon (111) surface through ester condensation reaction and the result was characterized by fluorescent spectra. The wafers modified by ss-oligodeoxynucleotide were used as DNA probes and the reusability of the resultant wafer was investigated. Its perfect stability in target detection process may promote the wider and more efficient application of the gene chip technology.

Keywords: Gene-chip, Silicon(111) surface, Oligodeoxynucleotide, Ester condensation reaction, Covalent immobilization, Reusability