维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2008年第17卷第4期
J Regional Anat & Operative Surg, 2008, Vol. 17, No. 4

交联型丙烯酸酯聚合物分子层用于固定寡核苷酸分子初探

吴清华，马文丽，朱利娜，张 宝 （南方医科大学基因工程研究所，广东 广州 510515）

［摘 要］ **目的** 探讨在显微玻片上衍生聚合物分子层用于固定寡核苷酸分子的方法，为基因芯片制备和应用提供技术支持。**方法** 利用交联聚合反应，在显微玻片表面衍生丙烯酸酯共聚物分子层，结合基因芯片技术制备寡核苷酸芯片。利用荧光标记的样品和CMT芯片杂交系统对所制备的芯片进行杂交实验，检测寡核苷酸在芯片表面的固定性能，并进行对照实验。**结果** 杂交后的荧光检测表明寡核苷酸在丙烯酸酯共聚物表面上杂交点阵的荧光信号多，信号强度强，杂交点圆润、同一性好。**结论** 利用化学交联法制备的芯片表面能用于寡核苷酸的固定且处理过程简单，为进一步运用到生物芯片制作打下了良好的基础。

［关键词］寡核苷酸的固定；基因芯片技术；丙烯酸类聚合物；共价交联
［中图分类号］Q81 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2008)04-0228-03

The study of oligonucleotides immobilization film prepared with acrylic acid-co-acrylamide copolymer

WU Qing-hua, MA Wen-li, ZHU Li-na, ZHANG Bao (Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To explore the key technologies in DNA microarray fabrication is immobilizing DNA or oligonucleotide efficiently on modified surface. **Methods** The glass slides were modified with acrylic acid-co-acrylamide copolymer and EDC/NHS by covalent linkage method. **Results** A covalent immobilization of unmodified oligonucleotide on the glass surface was achieved. The platform was prepared for oligo-microarray fabrication. Hybridization experiments were showed that the modified surfaces have high fluorescence intensity, low background in contrast unmodified slide. The uniform, steady and regular shaped signal spots of the microarrays indicated that the prepared surfaces were satisfactory in immobilizing unmodified oligonucleotides. **Conclusion** The process of the surface preparation is simple and cost effective and can be used for attachment of protein, PNA et cetra.

Keywords: oligonucleotides immobilization; DNA microarray; acrylic acid-co-acrylamide copolymer; covalent linkage

核酸分子的固定是生物分子固定化技术中重要的组成部分，该技术在核酸化学、分子遗传学及生物工程的研究中有着不可代替的作用。在近年发展起来的以特定核酸片段杂交检测技术为基础的基因芯片或生物传感器技术中，生物分子的固定尤其是核酸分子在载体表面的固定是这些技术在药物分析、基因表达和功能基因组研究、DNA测序、医学诊断等应用中的基础[1-4]。如何在平整致密的表面快速稳定地固定核酸分子是芯片制备首先要解决的问题。为了克服目前核酸特别是短片段寡核苷酸在玻片上固定率低和稳定性差的缺点，解决其在基因芯片制备和应用中需突破的化学上游技术问题，本实验采用丙烯酸、丙烯酰胺这两种常见的有机聚合物单体，利用共聚反应在氨丙基三甲氧基硅烷硅化后的玻璃表面上进行交联聚合，制备能共价结合（固定）寡核苷酸分子的表面，并打印寡核苷酸探针，最后对寡核苷酸芯片进行杂交检测与分析。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氨丙基三甲氧基硅烷（APS）、碳二亚胺（EDC）、N－羟基琥珀酰亚胺（NHS）、二甲基甲酰胺（DMF）、二甲基亚砜（DMSO）等购自美国Fluka公司；丙烯酸、丙烯酰胺、过硫酸胺、NaOH、HCl等购自汕头试剂厂（分析纯）；国产光学显微载玻片。CMT芯片杂交盒（美国Corning公司）；Pixsys5500基因芯片点样仪（美国Cartesin公司）；ScanArray Lite基因芯片扫描仪（美国Parkard公司）；GS Gene Linker紫外交联仪（美国BIO-RAD公司）。

1.2 丙烯酸酯聚合物表面的制备方法

显微玻片的清洗与硅烷化按文献[5]所述方法进行，其中硅烷化溶液为10%的APS溶于90%的甲醇溶液。将100片经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ddH_2O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。包被液的配制：0.8%丙烯酸和0.2%丙烯酰胺溶于ddH_2O中，70 ℃加热，加热过程中缓慢加入0.8%过硫酸胺作催化剂。包被液可

［作者简介］吴清华（1974－），女，湖南省岳阳市人，讲师，博士，主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。电话：(020)62789097
［通讯作者］马文丽，电话：(020)62789386
［收稿日期］2008-05-10 ［修回日期］2008-06-15

维普资讯 http://www.cqvip.com

以在4 ℃保存备用。活化液的配制:0.1 mol/L碳二亚胺和20 mmol/L N-羟基琥珀亚胺酯溶于0.1 mol/L pH为6.0的K_2HPO_4和KH_2PO_4的缓冲液中。

1.3 寡核苷酸探针的合成与纯化

本实验中寡核苷酸探针序列见表1,寡核苷酸的合成与纯化按照文献[6]的方法制备。

表1 寡核苷酸探针序列

探针	5'端至3'端序列
探针1	TCT GGG CCA CAG AAA TTG TTG TCG ACA TAG CGA GTG ACT GCA CCT CCA TTG AGC TCA CGA
探针2	ACT AGC ACG AGG AAC CCA GTA GGC ACG CTT ATT ATA GCA GCC AAC ATA GGC AAA CAC ACA
探针3	TTG ACT GCA ATA TAA ACC TGT GTA CGA ACC GAC TGC ACG CAC ACT TGT AAA GAC TGA AGT
探针4	AGC CAC TAC ATC GCC ATT CAA GTC TGG GAA GAA TGT GAC AGA TAG CTC TCG TGA AGC TGG
探针5	AGT AGG GTT GAT TGG TCT TTT AAA CTG GAG TGC CAA ATC ACG AGC AAC TTC ATC ACT AAT
探针6	TAG GAA ACT GTA TGA TGG AAC CAT CCA TAA GCA CAT AAC GAG TGT CTG GAC GAA GCT CAC
探针7	GCC TGA AGA GTA GCA CGG TTA TCG AGC ATT TCC TCG CAC AAC CTA TTA ATG TCT ACA GCA
探针8	CGC CAC ACA TGA CCA TCT CTC TTA ATA CTT GCG CAC ACT CGT TAG CTA ACC TGT AGA AAC
探针9	CTC TAC ATC AAA GCC AAT CCA CGC ACG AAC GTG ACG AAT AGC TTC TTC GCG GGT GAT AAA
探针10	ATA GCC ATC TAC AAC GAC ATA GTC TTT AAC ACC TGA GTG CCT ATC CTC AGA ATA ACC ACC
探针11	TCA AGC TGG TTC AAT CTG TCT AGC AGC AAT AGC GCG AGG GCA GTT TCA CCA CCT CCG CTA
探针12	GAA GGT GTG ACT TCC ATG CCA ATG CGT GAC ATT CCA AAG AAT GCA GAG GCA CTT GGA GCA

1.4 寡核苷酸微阵列的制备与杂交检测

1.4.1 寡核苷酸微阵列的制备 将探针1~探针12、阳性对照、阴性对照、空白对照(H_2O)溶于50% DMSO,充分混匀,终浓度分别调整至10 mol/L后转移到384孔板中备用。阵列设计成12×12的阵列,每个探针打印6个点,点与点之间的间距为300 m。用Cartesin Pixsys5500基因芯片点样仪将探针依次打印到未做任何处理洁净玻片和被丙烯酸酯聚合物修饰后的玻片上,同时进行对照实验。将打印好的玻片正面朝下置于3×SSC热水湿盒上方再水合化,然后迅速置入100 ℃烤箱中烤干,用紫外交联仪以每块玻片65 mJ的总能量进行交联固定。接着将玻片放入饱和的NaCl湿盒中42 ℃过夜,最后用50 mL封闭液(四氢呋喃、醋酸酐、吡啶的混合液,pH8.0)对芯片表面进行灭活处理,干燥后备用。

1.4.2 寡核苷酸分子的杂交实验与检测 首先杂交样品的制备、杂交样品的荧光标记按文献[7]的方法进行。然后把荧光标记的样品杂交前加入等体积的2×杂交液(50%甲酰胺、10×SSC、0.2% SDS)95 ℃变性5 min,最大速度离心2 min后冷却,取2 μL滴加到阵列上,盖上盖玻片,42 ℃杂交2 h,再依次在2×SSC\0.1% SDS、0.1×SSC\0.1% SDS、0.1×SSC溶液中清洗芯片,最后灭菌水清洗后,无水乙醇脱水,室温下干燥。检测过程:用ScanArray Lite进行荧光信号扫描检测,扫描分辨率5 μm,PMT设置为70%,扫描时激光强度为90%。

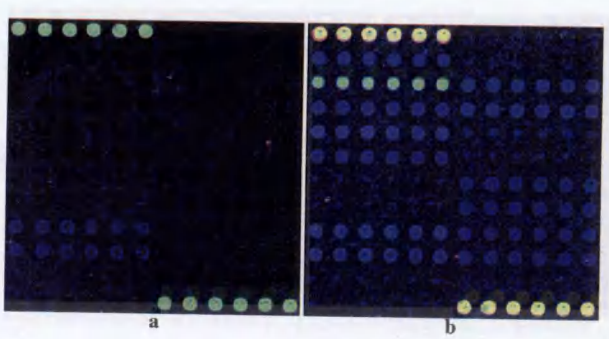
2 结果

经丙烯酸酯聚合物表面修饰,寡核苷酸微阵列的制备及杂交检测,玻片处理前后的杂交结果见图1。玻片处理后的探针在芯片上的点杂交荧光信号多,信号强度强,杂交点圆润,阵列第1行1~6列和第12行7~12列为阳性信号点。而未处理的芯片效果明显较差,仅阳性对照的信号强度比较强。ScanArray Lite基因芯片扫描仪扫描结果用ArrayPro软件进行图象分析和数据采集,将每点所有像素的荧光强度均值输出到Excel软件进行统计处理。采用公式:均一化值=(该探针所有点荧光强度均值-空白对照所有点荧光强度均值)/(阳性对照所有点荧光强度均值-空白对照所有点荧光强度均值),对数据进行扣除背景及均一化处理,结果显示玻片处理后的芯片同一性较好(表2)。

3 讨论

2.1 丙烯酸-丙烯酰胺共聚物表面制备的化学过程

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。图2表示了丙烯酸-丙烯酰胺聚合物表面的连接策略。化学反应过程中丙烯酸和丙烯酰胺单体的



a:玻片未处理的芯片;b:玻片处理后的芯片

图1 玻片处理前后的芯片杂交结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 芯片点阵的荧光强度及均一化值

编号	玻片未处理芯片		玻片处理后的芯片	
	荧光强度	均一化值	荧光强度	均一化值
探针1	369.92185	0.0000000	3231.64576	0.0738124
探针2	377.17405	0.0000000	14133.07502	0.3729850
探针3	199.43242	0.0000000	3333.96066	0.0766202
探针4	258.48797	0.0000000	4567.85323	0.1104825
探针5	190.76372	0.0000000	2704.13484	0.0593357
探针6	179.40853	0.0000000	1225.80888	0.0187653
探针7	176.11936	0.0000000	976.83920	0.0119327
探针8	316.66338	0.0000000	1911.35911	0.0375792
探针9	331.67195	0.0000000	2360.47557	0.0499045
探针10	150.92179	0.0000000	548.86423	0.0001876
探针11	482.46613	0.0065164	3658.03796	0.0855140
探针12	1056.42290	0.0760305	4793.40805	0.1166725
阳性对照	8685.35341	1.0000000	36980.61993	1.0000000
阴性对照	303.82897	0.0000000	1749.30915	0.0331320
空白对照	428.66254	0.0000000	542.02705	0.0000000

反应是一个加成聚合反应，所形成的聚合物中富含羧基(-COOH)，为与硅烷化的玻片表面连接和活化分子的引入打下了基础。在玻片的处理中聚合反应和表面活化反应同时进行。活化液组成中的EDC是一种优良的固定化试剂，能够加速羧酸和氨基之间形成酰胺键，保证了硅化的氨基与丙烯酸－丙烯酰胺聚合物反应。另外一种活化分子NHS，除了能与聚合物中的羧基反应外，还可作为活化基团同氨基形成酰胺键，这样所形成的表面成为活化状态，易于寡核苷酸分子或DNA分子固定。同时这种衍生方式类似在表面增加的是网格状的分子层，有利于增加样品的上样量。



图2 丙烯酸－丙烯酰胺聚合物表面的连接策略

2.2 寡核苷酸分子在聚合物表面的固定

利用基因芯片技术，寡核苷酸沉积在芯片表面后，在加热或紫外照射下，核酸分子与活化表面的N－羟基琥珀酰亚胺发生共价连接，使DNA分子稳定地固定在表面上。有研究报道在寡核苷酸的固定过程中紫外交联有利于DNA的固定[8]。这主要是由于在紫外光照射下能促进核酸中的T碱基与玻片上的氨基作用产生交联连接。本实验采用了每块玻片65 mJ的总能量对芯片进行照射，促进其固定。

2.3 寡核苷酸芯片的杂交检测

基因片段在载体表面的固定效率，是指连接在载体上的有效探针量，直接反应了芯片制作质量的高低。特别在寡核苷酸固定中，固定效率的高低主要通过杂交实验后的荧光检测强度来判断，它直接影响检测的灵敏度，并衡量核酸分子的杂交动力学范围。由图1和表2的结果显示，玻片处理后的探针在芯片上的点杂交荧光信号多，信号强度强，杂交点圆润、同一性好，说明处理后芯片的固定效率好，达到芯片检测的要求。

本实验重复多次，结果表明以丙烯酸、丙烯酰胺为聚合单体采用共价交联法，在玻片上衍生聚合物分子层的方法是可行，处理过程简单，该分子层能用于未修饰寡核苷酸分子的固定。在基因芯片制作的应用中，固定在该膜表面上的寡核苷酸分子固定效率高，杂交点阵的荧光信号强，稳定性好，有着较好的应用前景。

[参考文献]

[1] Gong P, Harbers GM, Grainger DW. Multi-technique comparison of immobilized and hybridized oligonucleotide surface density on commercial amine-reactive microarray slides[J]. Anal Chem, 2006,78(7):2342－2351.

[2] Lee CY, Gong P, Harbers GM, et al. Surface coverage and structure of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by XPS, NEXAFS, and fluorescence intensity measurements[J]. Anal Chem, 2006,78(10):3316－3325.

[3] 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):1245－1258.

[4] Abdueva D, Skvortsov D, Tavare S. Non-linear analysis of GeneChip arrays[J]. Nucleic Acids Res, 2006,34(15):e105.

[5] Qinghua Wu, Wenli Ma, Rong Shi, et al. An activated GOPS-poly-L-lysine-coated glass surface for immobilization of 60mer oligonucleotides [J]. Eng Life Sci, 2005,(5):467－470.

[6] Efcavitch JW. The electrophoresis of synthetic oligonucleotides in gel electrophoresis of nucleic acids-A practical approach [M]. Oxford: Oxford University Press, 1990.25－149.

[7] Shi R, Ma WL, Wu QH, et al. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection[J]. Chinese Sci Bull, 2003,48(12):1165－1169.

[8] Maskos U, Southern EM. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ[J]. Nucleic Acids Res, 1992,20(7):1679－1684.

(编辑:余汇洋)

《局解手术学杂志》——热忱欢迎投稿和订阅