

## 用于寡核苷酸芯片制备载体的醛基载玻片的制备方法优化及性质研究

邹宗亮 王升启\* 王志清

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

**摘 要** 优化了醛基载玻片的制备方法,探讨了醛基修饰载玻片固定寡核苷酸探针的性质。研究发现氨基硅烷试剂的浓度是影响载玻片荧光背景的主要因素;2%氨基化试剂处理 16 min、戊二醛处理 30 min 可以得到荧光背景较低、固定效果较好的醛基载玻片。寡核苷酸固定过程中,末端氨基修饰没有明显的特异性,但是可以提高被固定探针的杂交容量。在较低的浓度(小于 10  $\mu\text{mol/L}$ )时,探针的浓度与杂交信号趋近线性关系,浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时杂交信号达到饱和。

**关键词** 寡核苷酸芯片,共价交联,玻璃,醛基修饰

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0498-05

基因芯片技术是目前最有应用前景的基因分析、基因表达研究的工具之一,影响着生物学研究的方法和途径。寡核苷酸芯片是基因芯片的一种,已成功应用于基因组测序<sup>[1]</sup>、基因点突变检测<sup>[2]</sup>、基因表达变化监控<sup>[3]</sup>、RNA 折叠研究<sup>[4]</sup>、反义药物筛选<sup>[5]</sup>等领域。

寡核苷酸芯片应用的前提是探针的有效固定,通常选用结合较为牢固的共价交联方法。理想的化学方法必须满足:连接稳定,间隔臂有足够长度不对杂交产生立体位阻,有足够的亲水性且不与载体发生非特异性吸附等。目前已有许多方法通过共价<sup>[6-8]</sup>或直接合成<sup>[9,10]</sup>将核酸分子固定在玻璃、硅片、膜、聚苯乙烯等载体上。光控寡核苷酸平行合成<sup>[9]</sup>和标准亚磷酰氨化学法<sup>[10]</sup>是目前最为成功的制造高密度寡核苷酸芯片的方法。对于用于诊断检测的低、中等密度的芯片而言,合成后固定法更为灵活适用。

已有多种官能团修饰的表面用于合成后固定方法制备寡核苷酸芯片<sup>[11-13]</sup>,但这些方法涉及高温(环氧表面<sup>[11]</sup>)、制备试剂昂贵(异硫氰酸酯表面<sup>[12]</sup>)、不稳定(巯基表面<sup>[13]</sup>)等制约因素。寻找制备方法简便、寡核苷酸固定稳定且密度高、成本低、荧光背景低的载体官能团修饰方法是目前寡核苷酸

芯片应用中的重要环节。

醛基修饰固体表面已经成功地应用于免疫组化、原位杂交<sup>[14]</sup>、生物传感器<sup>[15]</sup>等领域,具有成本低廉、反应条件温和等优点。目前市场上已有 CEL Associate、SIGMA 等厂家出售载玻片产品,但价格较高,有时会遇到荧光背景较高的情况。为了制备适合基因芯片应用、与荧光检测技术相匹配的载体,本文优化了醛基载玻片制备方法,考察了醛基载玻片固定寡核苷酸探针的性质。

### 1 材料及方法

#### 1.1 寡核苷酸合成

寡核苷酸合成在 ABI391 Z DNA 合成仪上完成,采用标准亚磷酰氨化学方法,5'氨基修饰用 N-MMTr-6-氨基-2-氰乙基-N',N'-二异丙基亚磷酰氨(自制)在合成的最后一步引入。合成完毕后浓氨水 55℃脱保护/切割 15 h,OPC 柱纯化。

#### 1.2 玻璃载体的硅烷化

市售载玻片用铬酸洗液浸泡过夜,蒸馏水洗,浸入 25%氨水中过夜,Milli-Q 水洗(> 18 m $\Omega$ )。载玻片浸入氨丙基三甲氧基硅烷(ACROS)的 95%乙醇溶液中,冰醋酸调节 pH 至 4.5,室温处理,95%乙醇超声清洗,水超声清洗,115℃烘干。

收稿日期:2001-02-26,修回日期:2001-07-05。

基金项目:国家自然科学基金重点项目资助(39889001)。

\* 通讯作者。 Tel:86-10-66932211; Fax:86-10-68234653; E-mail:sqwang@nic.bmi.ac.cn

### 1.3 玻片的醛基化

室温下 5% 的戊二醛水溶液与氨基载玻片作用,水洗 2 次。

### 1.4 玻片固定荧光探针效率的测定

3'TMRA(四甲基罗丹明)、5'氨基修饰的寡核苷酸稀释成浓度为 15  $\mu\text{mol/L}$  的 1  $\times$  Microspotting solution 点样液 (Telechem international, Inc), Pix sys 5500 芯片制备仪 (Cartesian Technologies, Inc) 将寡核苷酸点到醛基化玻片上,室温下放置过夜,然后 0.2% SDS 洗 2 次,水洗 2 次。

### 1.5 芯片的制备及后处理

寡核苷酸探针稀释成合适浓度的 1  $\times$  Microspotting solution 点样液。Pix sys 5500 芯片制备仪将寡核苷酸点到醛基玻片上,斑点间距为 0.5 mm。点样完毕后,室温下放置过夜,0.2% SDS 洗 2 次,水洗 2 次,空气干燥后  $\text{NaBH}_4$  溶液 (100 mL 20% 乙醇的 0.01 mol/L PBS 溶液中加入 1.3 g  $\text{NaBH}_4$ )。还原 10 min,0.2% SDS 洗 1 次,水洗 1 次,空气干燥后杂交。

### 1.6 杂交及清洗

TMRA 标记的寡核苷酸用 1.25  $\times$  Unihyb™ (Telechem international, Inc) 配成杂交液,寡核苷酸终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。杂交时,按照 2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  将杂交液转移到盖玻片上,利用盖玻片与载玻片之间的毛细现象将溶液均匀平铺到载玻片上,置于杂交盒中,加入 5  $\mu\text{L}$  3  $\times$  SSC 溶液保持湿度,杂交时间为 1 h;杂交完毕后,室温下分别用洗液 A (1  $\times$  SSC, 0.2% SDS)、B (0.2  $\times$  SSC)、C (0.1  $\times$  SSC) 清洗。

### 1.7 信号的荧光检测及数据处理

清洗完毕后激光共聚焦荧光扫描仪 ScanArray3000 (General Scanning, Inc) 检测,扫描分辨率为 10  $\mu\text{m}$ , Laser 及 PMT 设置为 80%。TMRA 的激发及检测波长分别为 550 nm、580nm。图像用 Imagen 3.0 (Biodiscovery, Inc) 分析软件定量。

## 2 结果

### 2.1 醛基载玻片制备方法对寡核苷酸探针固定效率的影响

戊二醛是最常用的同型双官能团化合物,戊二醛分子两端醛基与载体及核酸的氨基形成希夫碱,以五碳桥的形式将它们连接起来。载玻片醛基化及核酸固定过程包括表面氨基化、醛基化、氨基修饰寡核苷酸的交联及还原等步骤,化学过程见图 1。这里主要讨论醛基化的优化过程及其固定寡核苷酸的特性。

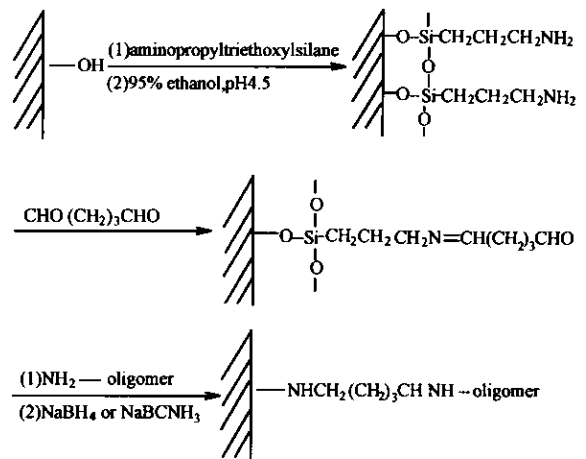


图 1 寡核苷酸固定到醛基载玻片上的化学过程

Fig.1 The chemical process of amino modified oligonucleotide immobilized onto aldehyde slide

2.1.1 载玻片醛基化时间对寡核苷酸探针固定效率的影响:2% 氨基试剂处理 15 min 的氨基片与戊二醛溶液作用不同时间,检测 3'TMRA、5'氨基标记的寡核苷酸探针 RA (见表 1) 在醛基片上的固定效率。结果见图 2。从图上可以看出,醛基片处理 30 min 时探针固定效率最佳。

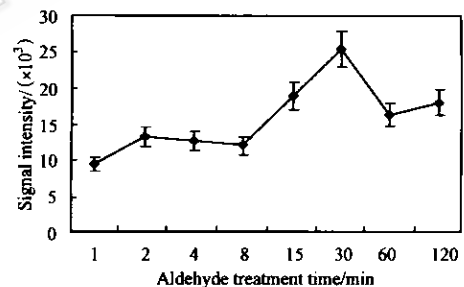


图 2 醛基片处理不同时间对寡核苷酸固定效率的影响

Fig.2 Oligonucleotide immobilization efficiency on microscopic slide with different aldehyde treatment time

表 1 本文使用的寡核苷酸及其序列

Table 1 Sequences of oligonucleotide probes used in this study

| Oligo name | Sequence 5' to 3' | 5' Amino modification |
|------------|-------------------|-----------------------|
| RA         | CTC CTC CTC CTA   | —TMRA                 |
| R          | CTC CTC CTC CTA   | —TMRA                 |
| Probe A    | ACCCAACACTACTCG   |                       |
| Non-A      | ACCCAACACTACTCG   |                       |
| RCA        | CGAGTACTGTTGGGT   | —TMRA                 |

TMRA: tetramethylrodamine. +: amino modification.

2.1.2 氨基硅烷化试剂的浓度、作用时间对载玻片荧光背景的影响:在制备氨基载玻片的过程中发现,

载玻片荧光背景与氨基试剂浓度及氨基化时间有关。考察了不同浓度氨基化试剂处理载玻片后,荧光背景随时间的变化。研究发现(图 3),3%氨基试剂从处理载玻片一开始,玻片荧光背景就比较高,荧光背景强度大约是 1%、2%氨基化试剂的 4~8 倍。1%、2%氨基片随着氨基化时间的延长,荧光背景缓慢增高,二者荧光背景差别不大。

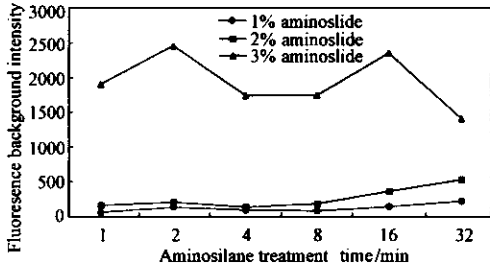


图 3 氨基硅烷化试剂的浓度对载玻片荧光背景的影响  
Fig.3 Effect of aminosilane concentration on microscopic slide fluorescence background

2.1.3 氨基硅烷化试剂浓度、作用时间对载玻片固定寡核苷酸探针效率的影响:考虑到载玻片的背景对寡核苷酸芯片的应用非常重要,这里只优化了 1%、2%氨基化试剂处理载玻片的过程。用 1%、2%氨基化试剂制备不同时间点的氨基片,醛基化后,检测探针 RA 的固定效率。

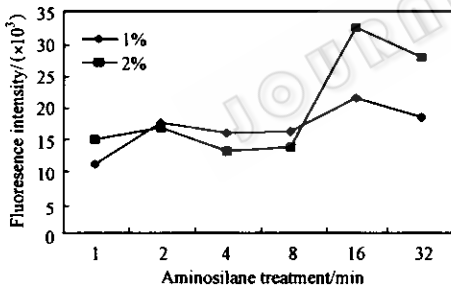


图 4 氨基硅烷试剂的浓度对寡核苷酸探针固定效率的影响  
Fig.4 Effect of aminosilane reagent concentration on oligonucleotide probe immobilization

由结果(图 4)可知,总体上,氨基化试剂处理时间越长,醛基化后玻片固定探针的效率也越高。对 1%、2%氨基化试剂而言,氨基化最佳时间都是 16 min。

为此后续研究均采用 2%氨基片试剂处理 16 min、5%戊二醛处理 30 min 的载玻片作为实验用载体。

2.2 醛基表面固定探针的特性研究

2.2.1 固定效率与时间的关系:考察了载玻片上荧光探针 RA 固定效率随时间的变化情况。结果见图 5。可以看出,在前 3 h,固定量呈直线上升;3 h 后,

固定量到达平台期。

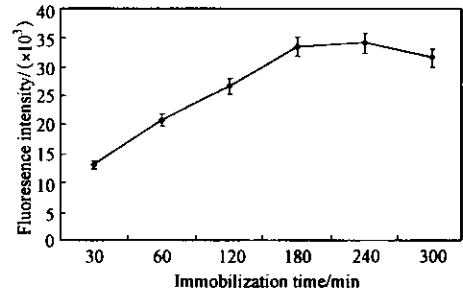


图 5 寡核苷酸固定效率随时间的变化  
Fig.5 Attachment density of oligonucleotide onto glass slide with different attachment time

2.2.2 醛基表面固定氨基修饰探针的特异性:考察醛基表面的氨基化修饰与没有氨基化修饰的探针 RA、A(序列见图 1)的固定效率。结果见图 6。定量结果可以看出,不同浓度下,二者在固定总量上没有明显区别。因此,醛基载体固定末端氨基修饰核酸时,没有明显的特异性。

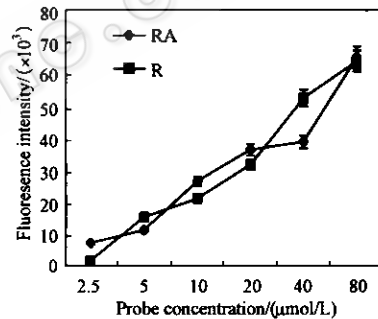


图 6 末端氨基修饰对寡核苷酸探针固定效率的影响  
Fig.6 Effect of terminal amino modification on oligonucleotide probe immobilization

2.2.3 氨基修饰对探针杂交容量的影响:为了进一步了解这种非特异固定对探针杂交的影响,考察了 5'氨基修饰探针 probe A 及其对应的没有氨基修饰的探针 Non A 与其互补荧光标记探针 RCA 的杂交能力。两种探针的杂交信号在不同的时间点上都有较大的差别,末端氨基修饰探针的杂交能力明显高于没有修饰的探针,结果见图 7。这可能是由于没有氨基修饰的探针 Non A 在固定过程中非特异性参与过多导致探针的自由度下降,与靶核酸亲和力降低。由此可见,醛基载玻片上,氨基修饰探针的固定是一个较为复杂的过程,固定包括特异性固定与非特异性固定两种。有伯氨基修饰时,既有特异性固定,也有非特异性固定;没有伯氨基修饰时,以非特异性固定为主。

2.2.4 探针浓度 Probe A 对杂交信号的影响:结果(见图 8)显示,在较低的浓度(小于 10  $\mu\text{mol/L}$ )时,探

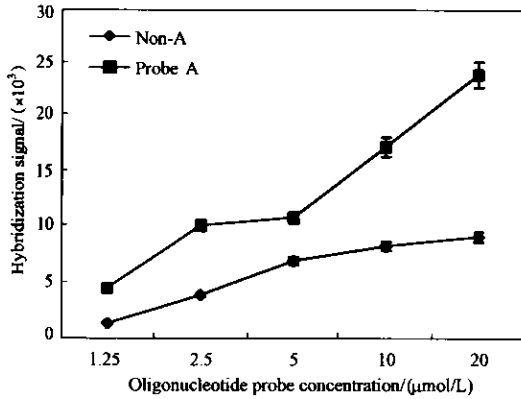


图7 末端氨基修饰对寡核苷酸探针杂交容量的影响

Fig.7 Effect of terminal amino modification on oligonucleotide probe hybridization capacity

针的浓度与信号趋近线性关系,浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时杂交信号达到饱和。

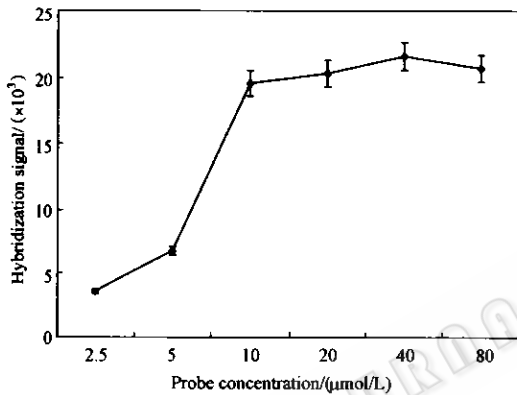


图8 固定探针浓度对杂交信号的影响

Fig.8 Effect of probe concentration on hybridization signal intensity

### 3 讨论

戊二醛是目前最常用的同型双官能团化合物,戊二醛分子的两端醛基可以与载体及配基上的氨基形成希夫碱,将它们以五碳桥的形式连接起来。该反应条件温和,可在 4~40 $^{\circ}\text{C}$  及 pH6.0~8.0 内进行,操作简单,价格便宜,应用较为广泛。以  $\text{NaBH}_4$  或  $\text{NaCNBH}_3$  还原希夫碱可以形成稳定的单键。根据偶联的要求不同,这一步也可以省略。

在制备玻片过程中发现,影响玻片背景的主要因素是在进行硅烷化处理时氨基化试剂的浓度。可能是由于高浓度的硅烷试剂形成的大量聚合物,吸附或固定到载玻片的表面上所致。醛基化时,水作为反应介质时,玻片荧光背景低且均一,优于 PBS。玻片氨基化、醛基化处理时,试剂预先超声处理是一种较好的选择。超声的作用可能有两个,一个是混匀,另外一个作用就是脱气,使试剂与玻片接触较为

良好,制备玻片表面活性较为均一。

文献研究表明,核酸骨架及碱基上活泼基团用来固定寡核苷酸易造成固定探针杂交能力的部分丧失<sup>[16,17]</sup>,稳定的末端特异共价交联<sup>[18]</sup>可以增加固定化核酸的杂交能力。因此,现在通常寡核苷酸的 3' 或 5' 端引入活化官能团进行寡核苷酸的末端固定化,本文选取 5' 端氨基修饰在醛基表面进行固定。

在研究氨基修饰寡核苷酸的固定效率时发现,氨基化修饰并不能提高寡核苷酸固定效率,但是可以提高杂交容量。也就是说,寡核苷酸碱基上环外氨基也可以参与寡核苷酸的交联。观测结果提示在用合成后点样方法制备芯片时,也许可以利用这种非特异性来固定较长的 cDNA 片段。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Chee M, Yang R, Hubbell E *et al*. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 1996, **274**(5287): 610 ~ 614
- [2] Ahrendt S A, Halachmi S, Chow Jt *et al*. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(13): 7382 ~ 7387
- [3] Lee C K, Klopp R G, Weindruch R *et al*. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 1999, **285**(5432): 1390 ~ 1393
- [4] Sohail M, Akhtar S, Southern E M. The folding of large RNAs studied by hybridization to arrays of complementary oligonucleotides. *RNA*, 1999, **5**(5): 646 ~ 655
- [5] Milner N, Mir K U, Southern E M. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(6): 537 ~ 541
- [6] Ghosh S S, Musso G F. Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(13): 5353 ~ 5372
- [7] Joos B, Kuster H, Cone R. Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports. *Anal Biochem*, 1997, **247**(1): 96 ~ 101
- [8] Nikiforov T T, Rogers Y H. The use of 96-well polystyrene plates for DNA hybridization-based assays: an evaluation of different approaches to oligonucleotide immobilization. *Anal Biochem*, 1995, **227**(1): 201 ~ 209
- [9] Pease A C, Solas D, Sullivan E J *et al*. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(11): 5022 ~ 5026
- [10] Southern E M, Case-Green S C, Elder J K *et al*. Arrays of complementary oligonucleotides for analyzing the hybridization behavior of nucleic acids. *Nucleic Acid Res*, 1994, **22**(8): 1368 ~ 1373
- [11] Lamture J B, Beattie K L, Burke B E *et al*. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acid Res*, 1994, **22**(11): 2121 ~ 2125
- [12] Guo Z, Guifoye R A, Thiel A J *et al*. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays

- on glass supports. *Nucleic Acid Res*, 1994, 22(24): 5456 ~ 5465
- [13] Rogers Y H, Jiang-Baucom P, Hung Z J *et al.* Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem*, 1999, 266(1): 23 ~ 30
- [14] Larsson L I, Hougaard D M. Glass slide models for immunocytochemistry and in situ hybridization. *Histochemistry*, 1994, 101(5): 325 ~ 331
- [15] Graham C R, Leslie D, Squirrell D J. Related Articles Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor. *Biosens Bioelectron*, 1992, 7(7): 487 ~ 493
- [16] Polsky-Cynkin R, Parsons G H, Allerdt L *et al.* Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. *Clin Chem*, 1985, 31(9): 1438 ~ 1443
- [17] Lund V, Schmid R, Rickwood D *et al.* Assessment of methods for covalent binding of nucleic acids to magnetic beads, Dynabeads™, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16(22): 10861 ~ 10880
- [18] Wilchek M, Bayer E A. The avidin-Biotin complex in bioanalytical application. *Analytical Biochem*, 1988, 171(1): 1 ~ 32

## Preparation Optimization and Properties of the Aldehyde Microscopic Slides for Oligonucleotide Microarray Fabrication

ZOU Zong-Liang WANG Sheng-Qi\* WANG Zhi-Qing

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract** The process for preparing the aldehyde slides was optimized and the properties of the aldehyde microscopic slides for immobilizing oligonucleotide were explored. The result shows that the concentration of aminosilane reagent plays an important role in the fluorescent background. Aldehyde slides with 2% aminosilane and 5% aldehyde treatment for 16 min and 30 min respectively immobilize oligonucleotide efficiently and have low fluorescence background. During oligonucleotide immobilization, terminal amino modification has no obvious specificity, but it can enhance the hybridization capacity of immobilized oligonucleotides. At low concentration (less than 10  $\mu\text{mol/L}$ ), hybridization signal has linear relationship with probe concentration, the hybridization signal reaches saturation when probe concentration is more than 20  $\mu\text{mol/L}$ .

**Key words** covalent immobilization, oligonucleotide, glass, DNA microarray

Received: February 26, 2001

This work was supported by Grant from NSFC(39889001).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66932211; Fax: 86-10-68214653; E-mail: sqw@nic.bmi.ac.cn