

凝胶基片的制备与应用研究

周升平 王欣荣[#] 秦胜营 林志新 刘建华^{*}

(上海交通大学生命科学技术学院,上海 200240)

摘 要 在 Bind-Silane[®] 处理的玻片上交联聚丙烯酰胺凝胶层(15mm × 15mm × 20 μ m),戊二醛活化。与末端氨基修饰的寡核苷酸片段共价结合制成芯片。这种芯片能够区分液相中序列不同的 Cy-3 标记的目标核酸。与平面基片相比,凝胶基片具有背景低、固定探针量高、杂交时间短的优点。将细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、ANG、I-309 和 VEGF 的单克隆抗体加样于凝胶基片上制成蛋白质芯片,对乳腺癌患者和正常人的血清进行检测,发现乳腺癌患者细胞因子 IL-4、IL-5、I-309 和 VEGF 的表达量高于正常人的表达量,对临床诊断具有重要的参考意义。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶,三维芯片,寡核苷酸微阵列,蛋白微阵列

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0577-05

基片的制备在生物芯片的研制中具有举足轻重的作用。基片的研制主要是围绕制作成本、探针固定的密度、荧光背景以及应用前景开展工作。早期的芯片是将核酸或蛋白固定在尼龙膜上,尼龙膜荧光背景较高表面多孔、具有渗透性,所需的试剂体积较大。目前较常用的玻璃基片或硅基片^[1-4]虽然表面无渗透性,样品消耗少,但是单位截面积的基片表面所固定的探针量有限。

三维凝胶芯片^[5-14]是利用活化的聚丙烯酰胺凝胶层作基质来固定寡核苷酸、DNA、蛋白质以及其它的复合物^[7]。也有用丙烯酰胺单体与 5' 丙烯酰胺修饰的寡核苷酸在硅化玻璃板上共聚合而将寡核苷酸固定在凝胶层上^[14]。与平面芯片相比,三维凝胶芯片具有稳定、荧光背景低、检测灵敏度高、杂交时间短、单位截面积固定探针量多的优点^[6,7]。可以应用于基因诊断^[6]、多态性分析^[12]、免疫测定、受体-配体研究和蛋白组分析^[8]。

本文介绍了一种简单易行、成本低廉、利用自制模具制作聚丙烯酰胺凝胶基片的方法,评价了该凝胶基片的特点,并将这种基片应用于寡核苷酸芯片和蛋白质芯片。

1 材料与方法

1.1 材料

玻璃片基(76mm × 25mm × 1mm)购于 Gold Seal 公司。寡核苷酸片段由宝生物公司合成。Cy3-dUTP 和 Bind-silane 来源于 Pharmacia Biotech 公司。细胞因子单克隆抗体由 Perkin-elmer 公司王长城博士提供。生物素标记的细胞因子抗体购自 Research&Development 公司,荧光标记 Cy-3 链亲和素蛋白购自安法玛西亚公司。乳腺癌病人的血清来自上海市市长宁区妇幼保健院。正常人的血清来自上海市血液中心。DNA 抽提试剂盒购自赛百盛公司。3-氨基丙基三乙氧基硅烷购于 Sigma 公司。其它化学试剂购自中国医药集团上海化学试剂公司。芯片点样仪为 GMS 417 Arrayer,扫描仪为 GMS 418 Array Scanner。

1.2 方法

1.2.1 氨基化玻片的制作 将玻璃片事先用碱液洗净,再用浓盐酸泡洗 5min 后取出,用蒸馏水彻底淋洗。将玻片浸泡于 25% 的氨水溶液中过夜。再用去离子水冲洗玻片 10min,用丙酮清洗玻片。干燥后将玻片置于 2% 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,

收稿日期 2003-04-06,修回日期 2003-06-23。

基金项目 上海市科委重大招标项目(No.00JC14009)和上海交通大学 985 资助。

[#] 并列第一作者。

^{*} 通讯作者。 Tel 86-21-54743192; Fax 86-21-54743192; E-mail jianhualidl@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

95%的丙酮溶液中反应 15min。取出后用丙酮清洗玻片 5 次,每次 5min。最后在 110℃烘烤 45min。

1.2.2 三维凝胶基片的制作 将酸碱洗净后的玻片在 0.4% Bind-Silane 乙酸溶液(pH 3.5)中浸泡 1h,然后用蒸馏水淋洗,离心干燥。

根据需要在 20 μ m 厚的塑料片上刻制 15mm \times 15mm 的小孔作为模具(图 1)。将模具置于经 Bind-Silane 处理的玻片上。在模具框中加入新鲜的凝胶溶液(1mol/L 丙烯酰胺, 0.02mol/L N,N'-亚甲基双丙烯酰胺, 5×10^{-3} mol/L 过硫酸铵, 8.6×10^{-4} mol/L N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED))。然后盖上一片普通玻片,在室温下聚合 3h。撤除模具后,用双蒸水淋洗凝胶基片数次,直到没有成胶的单体洗净为止。离心干燥,放入 4℃冰箱中保存。

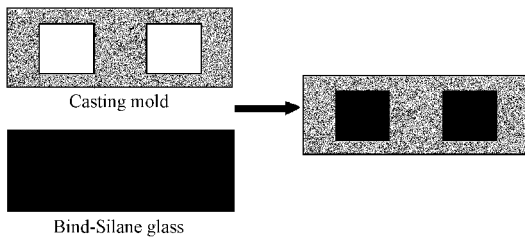


图 1 凝胶基片的制备

Fig.1 Manufacture of gel chip

1.2.3 活化 氨基化玻片或聚丙烯酰胺凝胶基片在 12.5%戊二醛, 50mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.5, 室温下浸泡 12h。然后用蒸馏水浸泡数次,并用蒸馏水淋洗直至无戊二醛的味道。于 4℃保存。

1.2.4 探针的固定 氨基修饰的寡核苷酸片段(1: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCC AGG TGA TAC TTG AAA C-3'; 2: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TTT TTT TTG TAA AAC GAC GGC AGT GAA-3'; 3: 5'-末端是氨基的荧光标记 DNA 片段)水溶液点样于醛基活化的基片上,然后置于 37℃, 90%的湿度箱中过夜。在 10%的氨基乙醇中,室温反应 10min 封闭尚未反应的醛基。再用双蒸水洗 3 次,每次 1min。

1.2.5 荧光标记 DNA 片段的制备 待测样品荧光标记的制备:用 DNA 抽提试剂盒从人白血细胞分离人基因组 DNA, 50 μ L 样品荧光标记反应液含有 2ng 人类基因组 DNA, 前向引物(5'-CCCCTCTACAAG-GAAATAGAC-3')和反向引物(5'-AGAAAAGGTCAC-CAAGTTGCC-3')各 20 μ mol, 40nmol/L Cy3-dUTP, dNTP (每种 1mmol/L), 1 \times PCR buffer, 2.5u Taq DNA 聚合酶。94℃ 变性 3min,接着在 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 循环 40 次。最后在 72℃ 延伸 10min。纯

化荧光 PCR 产物,溶于 50 μ L TE 缓冲液中。

5'-末端是氨基末端荧光标记 DNA 片段的制备:方法与上同,唯一差别是前向引物被替换成 5'-NH₂-CCCCTCTACAAGGAAATAGAC-3'。

1.2.6 杂交 8 μ L 荧光 PCR 产物与 57 μ L 杂交缓冲液(1mol/L NaCl, 1% Tween20, 0.01mmol/L Sodium phosphate)混合后,在 95℃ 变性 3min,迅速置于冰上冷却。在 42℃ 与固定的寡核苷酸芯片杂交。然后用杂交缓冲液在室温下洗涤 3 次,每次 1min。平板离心干燥,荧光扫描。

1.2.7 蛋白质芯片的制备与应用 将 1 μ g/ μ L 抗体蛋白(含 40%甘油的 PBS, pH 7.2)点在醛基化凝胶基片上,每个抗体蛋白重复 4 点,同时在抗体阵列中加相同浓度 4 个重复点的 BSA 做阴性对照和 Biotin-IgG 做阳性对照。置于 37℃, 90%的湿度箱中过夜。然后在 10%的氨基乙醇中,室温反应 10min。PBST 0.5%(含 0.5%吐温 20 的 PBS, pH 7.2)洗涤 3 次,每次 3min。加 50 μ L 血清室温反应 1h,振荡 200r/min。PBST 0.5%洗 3 次,每次 5min,振荡 70~80r/min,离心干燥。取 2 μ L 混合的生物素标记的 7 个细胞因子二抗用 50 μ L PBS 稀释进行第二次免疫反应,室温 1h,振荡 200r/min。再洗片,离心干燥。加 50 μ L 0.1% Cy-3 链亲和素进行标记,室温暗处反应 1h,振荡 200r/min。洗片,离心干燥。荧光扫描。

2 结果与讨论

2.1 凝胶基片

Yershov G 等^[6]先在 Bind-Silane 处理的玻片上蚀刻出 40 μ m \times 40 μ m \times 20 μ m 凝胶元件微阵列,然后用毛细管把寡核苷酸加载到凝胶元件上形成分子微阵列,每一凝胶块只能固定一种寡核苷酸,这种基片及其微阵列的制造比较麻烦。我们制造的凝胶基片是交联于玻片上的 15mm \times 15mm \times 20 μ m 的凝胶层,然后将探针点样于基片上构建寡核苷酸微阵列和蛋白微阵列,制作简单。由于聚丙烯酰胺凝胶层经 Bind-Silane 与玻片共价结合的面积大,玻片上凝胶层更稳定,能够耐受更为剧烈的杂交-洗涤条件而不脱落,具有加工和使用方便的优势。

聚丙烯酰胺凝胶层质地均一,不含荧光杂质。戊二醛活化前后的凝胶基片的荧光背景低且均一。

2.2 特异性杂交的检测

两种浓度相同但序列不同的探针(1: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCC AGG TGA TAC TTG AAA C-3'; 2: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TTT TTT TTG TAA AAC GAC GGC AGT GAA-3')

AAC GAC GGC AGT GAA-3'), 重复 5 次点样于凝胶基片上。然后与荧光标记的 PCR 产物杂交(彩版 I -A)。与目标序列完全配对的 1 号探针杂交信号强度是与目标序列不配对的 2 号探针杂交信号强度的 112 倍。

通过对 4 ~ 55℃ 不同温度梯度特异杂交进行比较, 发现杂交温度越高信号差异越明显, 但是当杂交温度升高, 芯片的荧光背景也会升高。在较低温度下杂交可以获得较好的荧光背景, 但不能很好的区分目标序列。综合考虑选择 42℃ 杂交, 既可以较好区分目标序列又具有较低的荧光背景。

2.3 单位截面积基片固定寡核苷酸片段量的比较

氨基修饰的荧光标记片段溶于 1000 pmol/μL 的 6-氨基-1-己醇溶液。然后用相同的溶液稀释。这些溶液的氨基浓度相同, 但是荧光强度是等比例稀释的。用微阵列仪点样于基片上。每一浓度重复点样 5 次, 交联过夜后水洗 5 次, 每次 2 min。用微阵列扫描仪检测, 平面基片上的信号强度很弱, 从 3 # 样品就几乎检测不到荧光。而凝胶基片上的信号强度随样品浓度变化较大, 6、7 # 样品荧光信号才检查不到。而且三维基片上 2 #、3 # 样品与对应平面 2 #、3 # 样品的荧光强度之比超过 100 倍。可见三维凝胶基片固定的氨基密度是平面醛基化玻片的 100 倍

以上(彩版 I -B、C、D)。

在聚丙烯酰胺凝胶中, 丙烯酰胺与 N,N'-二甲基双丙烯酰胺在过硫酸胺的作用下聚合形成网孔结构, 大量的氨基暴露于凝胶表面和网孔中, 形成了三维共价交联效果。客观上导致单位截面积凝胶上的外露表面积相当于同样截面积的平面玻璃的数百倍, 使凝胶固定的探针量大大提高。

2.4 杂交动力学的比较

将 10 pmol/μL 氨基修饰的寡核苷酸片段重复点样 5 次于不同基片上, 然后与荧光标记的 PCR 产物进行杂交, 检测不同杂交时间的荧光信号强度。凝胶基片信号强度在杂交 2h 达到饱和, 而平面基片在杂交 8h 后才达到饱和状态(彩版 I -E)。

杂交反应是一种二级反应。由于凝胶基片所固定探针量比平面基片高 100 倍, 客观上增加了该反应的一种反应物的浓度, 因此反应的速度远远高于平面基片。另一方面, 反应物的增加也大大增加了产物的产量(即杂交信号的强度)。

2.5 蛋白芯片应用于乳腺癌检测

我们对 10 例正常人和 20 例乳腺癌患者血清进行检测, 分别将正常人和患者各因子的荧光强度平均值和标准偏差列于表 1 中(已减去背景值)。

表 1 抗体微阵列检测结果

Table 1 Detection result of protein microarrays

	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	ANG	I-309	VEGF	Biotin-IgG	BSA
Normal Person	962.87 ± 281.20	94.56 ± 40.89	40.85 ± 42.84	592.41 ± 164.47	46.15 ± 35.09	39.80 ± 67.59	49.87 ± 45.05	1699.07 ± 99.36	35.13 ± 37.72
	$\bar{x} \pm s, n = 10$								
Patients	1326.05 ± 296.79	380.32 ± 131.40	41.6994 ± 46.29	566.18 ± 182.59	45.60 ± 43.33	736.3835 ± 179.6887	208.70 ± 91.15	1724.42 ± 115.49	35.95 ± 35.21
	$\bar{x} \pm s, n = 20$								

检测到乳腺癌患者细胞因子 IL-4、IL-5、I-309 和 VEGF 的荧光信号强度高于正常人的。乳腺癌患者和正常人的 IL-6 和 ANG 的荧光信号强度都很弱, 而 IL-4、IL-7 荧光信号相对较强。其中 8 例恶性乳腺癌患者 I-309 检测到的荧光信号较良性患者强。

利用这种凝胶基片制备的蛋白芯片具有潜在的应用前景, 对临床诊断有重要的参考意义, 但要进行准确诊断还有待进一步扩大凝胶层上固定单克隆抗体的种类。

3 结 论

利用自制模具制作的聚丙烯酰胺凝胶基片, 增大了聚丙烯酰胺凝胶层与 Bind-Silane 化玻片共价结

合的面积, 使凝胶层更稳定。能根据需要灵活调整模具制备不同厚度与大小的凝胶层。制作简单可行、成本低廉。这种凝胶基片可制备寡核苷酸微阵列, 具有荧光背景低、固定探针密度高、杂交时间短、检测灵敏的特点。还可制备蛋白微阵列。应用于乳腺癌检测, 所需样品量少, 检测灵敏, 并发现乳腺癌患者的细胞因子 IL-4、IL-5、I-309 和 VEGF 的表达量高于正常人, 而 IL-6、IL-7、ANG 的表达量与正常人相当。对临床诊断具有重要的参考意义。

致谢 感谢上海市长宁区妇幼保健院和上海市血液中心的大力支持以及王长城、王坚、刘喜朋、周宇波在实验过程中给予的指导和帮助。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Larsson L I , Hougard D M . Glass slide models for immunocytochemistry and *in situ* hybridization . *Histochemistry* , 1994 , **101** (5) 325 - 331
- [2] 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
- [3] Lamture J B , Beattie K L , Burke B E *et al.* Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a change coupled device . *Nucleic Acid Res* , 1994 , **22** (11) 2121 - 2125
- [4] 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
- [5] Timofeev E , Mirzabekov A . Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray . *Nucleic Acid Res* , 2001 , **29** (12) :2626 - 2634
- [6] Yershov G , Basky V , Belgovsky A *et al.* DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** 4913 - 4918
- [7] Guschin D , Yershov G , Zaslavsky A *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide microchips to enhance sequencing by hybridization . *Anal Biochem* , 1997 , **250** 203 - 211
- [8] Pavel Arenkov , Alexander Kukhtin , Anne Gemmell *et al.* Protein microchips : use for immunoassay and enzymatic reactions . *Anal Biochem* , 2000 , **278** :123 - 131
- [9] Girish Nallur , Luo Chenghua , Fang Linhua *et al.* Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays . *Nucleic Acids Res* , 2001 , **29** (23) :e118
- [10] Timofeev E N , Kochetkova S V , Mirzabekov A D *et al.* Regioselective immobilization of short oligonucleotide to acrylic copolymer gels . *Nucleic Acids Res* , 1996 , **24** 3142 - 3148
- [11] Proudnikov D , Timofeev E , Mirzabekov A . Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips . *Analytical Biochemistry* , 1998 , **259** (1) 34 - 41
- [12] Dubiley S , Kirillov E , Mirzabekov A . Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers . *Nucleic Acid Res* , 1999 , **27** (18) :e19
- [13] Vasiliskov A V , Timofeev E N , Surzhikov S A *et al.* Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization . *Biotechniques* , 1999 , **27** (3) :592 - 594
- [14] Rehman F N , Audeh M , Abrams E S *et al.* Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization . *Nucleic Acid Res* , 1999 , **27** (2) 649 - 655

Preparation and Application of Gel Chip

ZHOU Sheng-Ping WANG Xin-Rong[#] QIN Sheng-Ying LIN Zhi-Xin LIU Jian-Hua^{*}

(School of Life Science & Technology , Shanghai JiaoTong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract A new method for manufacturing three-dimensional gel film-coated chips was described in this paper and its advantages were evaluated by its application. A patch of polyacrylamide gel (15mm × 15mm × 20 μ m) was fixed on the glass surface with Bind-Silane treatment , then activated by glutaraldehyde. The aldehyde groups in gel provided reactive sites that allowed covalent immobilization of molecules containing amino groups. Oligonucleotides were mechanically spotted by GMS 417 Arrayer. After hybridization with Cy-3 labeled probes , fluorescence signals of perfect binding can be discriminated from mismatched ones. Compared with two-dimensional glass chip , the capacity of oligonucleotides immobilized on gel film-coated chip is over 100 times. And the gel film-coated chip have lower background and shorter hybridization time. Monoclonal antibodies of cytokine IL-4 , IL-5 , IL-6 , IL-7 , ANG I-309 and VEGF were also immobilized on the gel film-coated chips to make protein microarrays. After incubation with serum of breast cancer patients or normal persons , the microarray reacted with biotin-labeled second antibodies of cytokines and Cy-3-labeled streptavidin sequentially. Results show IL-4 , IL-5 , I-309 and VEGF of patients have higher expression level than normal persons. This kind of protein microarrays can be potentially helpful to clinical diagnosis. Furthermore different oligonucleotides or proteins can be performed in parallel in a single reaction with minimal amount of binding reagents. Such gel film-coated chips can be used widely in the fabrication of oligonucleotides and proteins microarrays.

Key words polyacrylamide gel , three-dimensional gel chip , oligonucleotides microarray , protein microarray

Received : 04-06-2003

This work was supported by Grant from the Key Project of Shanghai (No.00JC14009) and 985 Project of Shanghai JiaoTong University.

[#] WANG Xin-Rong is the coordinate author.

^{*} Corresponding author. Tel 86-21-54743192 ; Fax 86-21-54743192 ; E-mail: zhuangshu@sjtu.edu.cn ; <http://journals.im.ac.cn>