

# DNA 微阵列制备的新进展\*

彭英杰<sup>1</sup> 刘之景<sup>1,†</sup> 刘磁辉<sup>2</sup>

(1 中国科学技术大学近代物理系 合肥 230026)

(2 中国科学技术大学物理系 合肥 230026)

**摘要** 随着人类基因组测序的完成和蛋白质组学工程的开展,具有高产测序特性的 DNA 微阵列技术的发展日新月异,其应用已经深入到了生命科学研究的很多方面.与此同时,几种新的 DNA 微阵列制备技术迅速发展起来.文章介绍了滚轮放大技术、聚酰胺胺表面法、三甲氧基对胺苯基硅烷/重氮化法、化学纳米印迹法等四种制备方法的新进展.

**关键词** DNA 微阵列,滚轮放大技术,聚酰胺胺表面法,化学纳米印迹法

## Recent developments in the fabrication of DNA microarrays

PENG Ying-Jie<sup>1</sup> LIU Zhi-Jing<sup>1,†</sup> LIU Ci-Hui<sup>2</sup>

(1 Department of Modern Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

(2 Department of Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** With the accomplishment of the Human Genome Project and the development of the Proteome Project, the high-throughput DNA microarray sequencing technology has developed very rapidly, and has been applied in many fields, including the measurement of global gene expression patterns, identification of complex genetic diseases, mutation/polymorphism detection, and drug discovery and toxicology studies. At the same time, several new methods to fabricate DNA microarrays have been developed. In this paper we shall describe the rolling circle amplification technique, polyamidoamine (PAMAM) method, ATMS/diazotization and chemical nanoprinting.

**Key words** DNA microarray, rolling circle amplification, polyamidoamine (PAMAM), chemical nanoprinting

## 1 引言

伴随着几种高产出的基因组测序技术的发展,研究者面临的挑战并不仅仅是对基因的鉴定,还包括对这些基因的功能和表达的理解<sup>[1]</sup>.常规方法在实现这一目的时存在着极大的局限,因为它们都无法在一次实验中实现对大量基因进行研究的目的是.最初由斯坦福大学的 Patrick Brown 和其同事发明的互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 微阵列技术<sup>[2]</sup>,可以同时成千上万的基因的表达模式进行高产出的测定.

### 1.1 DNA 微阵列技术的原理

DNA 微阵列的检测是基于微阵列上的探针与样品中的靶基因片段之间发生的特异性核酸杂交.其检测步骤如图 1 所示.

微阵列技术使用一种高速、精确的机器人将成千上万的 DNA 样品固定到固体支持物,如载玻片、硅片或者尼龙膜等的表面.这样获得了高的点样密度,也就增加了一次可分析的样品的数量.与此同时,使用有荧光标记的 cDNA 对其进行探测.每一个 cDNA 群体都用不同的荧光染料进行标记,以便在同一阵列上作直接的对比.

### 1.2 DNA 微阵列技术的主要步骤

主要步骤为微阵列的制备、cDNA 探针的荧光标记、探针与固定好的靶 DNA 的杂交,以及后续的对杂交结果的分析<sup>[1]</sup>.

DNA 微阵列制备的两种传统的方法是原位合

\* 国家自然科学基金(批准号 90201038)资助项目

2003-02-12 收到初稿 2003-05-06 修回

† 通讯联系人. E-mail: zjliu@ustc.edu.cn

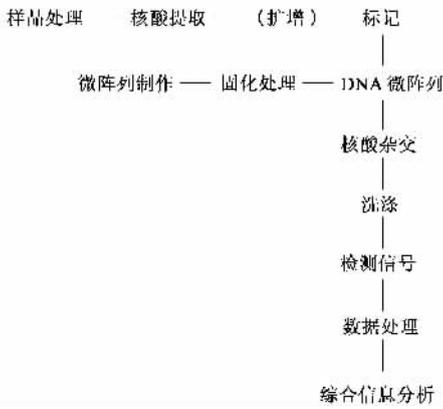


图1 DNA 微阵列的检测步骤

成法和点样法<sup>[1]</sup>. 用这两种方法生产的微阵列大约各占市场的 50%<sup>[3]</sup>.

原位合成法是将低聚核苷酸直接地合成在微阵列上. 这是由 Stephen Fodor 及其同事在 20 世纪 90 年代早期发展起来的, 也就是经常提及的 Affymetrix 法. 在此过程中, 使用对光不稳定的保护基团, 并进行修饰, 以引导核苷酸的选择性添加. Affymetrix 公司在它们的微阵列平台上做出了重大的改进<sup>[3]</sup>, 他们利用从人类基因组研究得到的信息来设计他们最新的微阵列产品, 每一产品中含有超过 39000 个转录物, 并且探针选择技术也得到了很大的改进, 极大地减少了所需要的探针数. 最近 Hughes 等人<sup>[4]</sup>使用原位喷墨法来构建低聚核苷酸微阵列, 以系统地测定探针长度(20—60 个核苷酸)和杂交缺失对转录水平监控的灵敏性和专一性的影响. 使用这种技术的微阵列已经实现了商业化, 并且用于基因组范围的表达分析上.

点样法是将预先做好的 DNA 片断点样到载玻片或者膜等支持物上. 该技术对 cDNA 克隆的放大耗时很少<sup>[5]</sup>, 而且极大地提高了全长 cDNA 克隆的质量和可靠性<sup>[6-9]</sup>.

最近两三年, DNA 微阵列技术飞速发展, 应用日益广泛. 本文将重点介绍几种新近发展起来的 DNA 微阵列技术的制备方法.

## 2 几种新的微阵列的制备技术

### 2.1 滚环放大技术<sup>[10]</sup>

滚环放大(rolling circle amplification, RCA)技术是一种具有惟一产物定位特性的分子放大技术. 它在多元直接探测和微阵列上核苷酸的定量表示方面的应用潜力很大. 对于靶 DNA 和靶 RNA 的探测下限为每 200 $\mu\text{m}$  点阵中大约 150 个分子, 这意味着

在相同条件下, 杂交灵敏度至少提高了 8000 倍.

在 RCA 技术中, 一个 DNA 环和一个小的前体 DNA(与 DNA 环的一部分互补), 再加上酶的催化, 将脱氧核苷三磷酸( deoxynucleoside triphosphate, dNTP)转化为由成千上万的连接着的重复的环单元组成的单链连接的 DNA 分子. 见图 2.

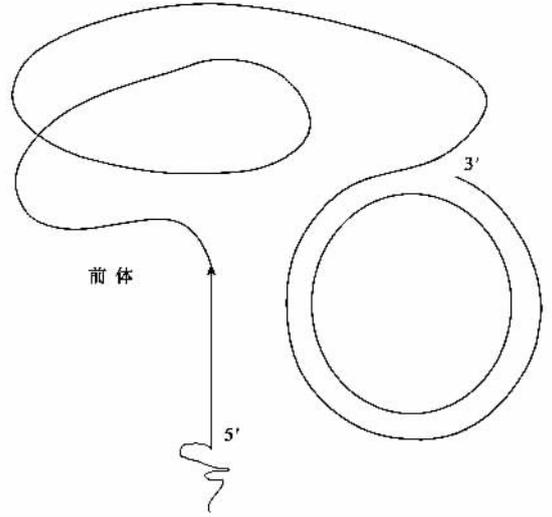


图2 RCA 前体分子 5'端被固定, 3'自由端进行环形杂交

RCA 产生了一个仍连接在 DNA 前体上的信号放大的产物. 因此, RCA 与固相微阵列, 如在特异的微阵列位置产生定位信号的微阵列有很好的相适性. RCA 放大技术一个重要的特点是可同时操作多个阵列而不相互干涉. 相反, 由于以下原因中的至少一个, PCR 或者其他液相放大方法, 都不能设计成在芯片上的放大法 (1)在放大位点处缺少放大后的信号的积累, 如产物在溶液中的扩散 (2)对反应物的毒性影响或者温度循环, 如裂解样品或者微阵列底物.

RCA 技术是在等温的条件下进行的, 因此克服了因温度循环而对昂贵且累赘的仪器的依赖. RCA 信号放大法已经应用于固体表面上的目标 DNA 的探测和微阵列上蛋白质的超敏感探测方面.

本文对该法进行微阵列制作的过程作一简单介绍. 使用微阵列机器人将微阵列印刷到抗生蛋白链菌素包被的玻璃载玻片上. 在印刷之前, 应先将低聚核苷酸以适当的浓度溶解到含有 0.05mg/ml 的牛血清蛋白( bovine serum albumin, BSA)的磷酸缓冲盐水( phosphate-buffered saline, PBS)中. 在印刷之后, 将这些载玻片在 37 $^{\circ}\text{C}$  下在 1mg BSA/ml 的 PBS 溶液中烘培 1h. 然后用 PBS, 0.05% 吐温-20 (聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯, Tween-20)洗

涤两次,每次 2min. 将溶解到 300mM(1M = 1mol/L) pH 值为 8.5 的磷酸钠缓冲溶液中带有氨基端的低聚核苷酸沉积下来,微阵列就制作好了。

## 2.2 聚酰胺胺表面法<sup>[11]</sup>

基于 DNA 微阵列来分析单核苷多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)对于研究基因的变化与个体显型的关系和致病基因的定位是很重要的。最近发展起来一种新的构建 DNA 微阵列的技术——聚酰胺胺(polyamidoamine, PAMAM)表面法。此法使用预先制作好的聚酰胺胺淀粉树枝状大分子作为介体来实现 DNA 的表面固定。外部含有 64 个初级氨基的树枝状大分子共价地结合到硅烷化的玻璃支持物上,然后树枝状的大分子受到谷氨酰酐的修饰,再由 *N*-羟基丁二酰胺(*N*-hydroxysuccinimide)进行活化。由于这种树枝状的 PAMAM 连接系统,微阵列表面显示出对被氨基修饰的 DNA 低聚体的高固定效率,和在反复重建和多次使用中的高稳定性。

通过 PAMAM 表面法制备的 DNA 微阵列显示出很高的信号密度,并且在杂交过程中具有很高的灵敏度。固定到树枝状连接系统表面的低聚体探针也具有很好的杂交专一性。此外,基于树枝状大分子的微阵列能多次复原,并且不需额外点样也能维持高的均质性。

## 2.3 三甲氧基对胺苯基硅烷/重氮化法<sup>[11]</sup>

简单地讲,三甲氧基对胺苯基硅烷/重氮化法(*p*-aminophenyl trimethoxysilane(ATMS)/diazotization)的整个过程就是,先用水虎鱼溶液清洗玻璃底物,然后用 ATMS 使之功能化。在与核苷酸反应之前,将与 ATMS 反应过的表面置于 HCl-NaNO<sub>2</sub> 溶液中,使之转变成重氮苯的形式。最初的芳香性氨基酸与亚硝酸反应,产生重氮盐。因为重氮盐不稳定,因此所有的步骤,包括核苷酸的点样,都应该在 4℃ 的条件下进行。30min 后,将 ATMS 处理过的底物依次用冰水预冷过的醋酸钠缓冲液、双蒸馏水(double-distilled H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)和 100% 乙醇进行洗涤。温和的酸性缓冲液能保持重氮盐在载玻片上的活性。然后将 DNA 点样到重氮化的载玻片上,再在室温下风干 1—2h。DNA 会与重氮化表面的含氮端形成共价键。为了将未反应的重氮基团中和掉,并减少探针和载玻片的非特异性结合,可将表面浸在 1% 的甘氨酸溶液或者将其放在含有 50% 甲酰胺、标准柠檬酸盐溶液(standard saline citrate, SSC)、0.1% 十二磺基钠(sodium-dodecyl sulphate, SDS)和 1% BSA 的缓冲液中进行预杂交(参见图 3)。

具体的步骤如下:

第一步, DNA 的准备。从丝状真菌 *Neurospora crassa* 分离得到其基因组 DNA。

第二步, 探针的标记。用 Cy3<sup>TM</sup>-dCTP 或者 Cy5<sup>TM</sup>-dCTP 对 DNA 探针进行荧光标记。标记时可使用用于放射性或非放射性的探针制备的切口平移工具包进行处理。标记之后,把这些探针用含有 1 倍体积 4M 的醋酸铵(利尿药)和 5 倍体积 100% 的乙醇的混合液进行沉淀,然后再溶解到 7—9 μl 的无菌双蒸馏水中。

第三步,在底物上形成甲硅烷层。玻璃底物的清洗可以先浸泡在水虎鱼溶液(其中硫磺酸与 30% 双氧水的体积比为 7:3)中 30min,然后再用去离子水洗涤(注意:水虎鱼溶液会与大多数有机物发生剧烈的反应,因此使用时必须很小心)。将清洗过的底物浸泡到 1mM 的 AMTS 乙醇溶液中 30min,就能覆盖上一层 ATMS。然后用乙醇洗涤玻璃底物并让其在氮气流中干燥。这样就可以在玻璃底物上形成带胺端的甲硅烷层(amino-terminated silane layer)。甲硅烷层的形成可以用 X 射线光电子波谱学来确定,其厚度可用椭圆偏振光法(ellipsometry)来测定,一般厚度为 4.9 ± 0.2 Å。

第四步, ATMS 处理过的表面的重氮化。这一步可以用含 40ml 水、80ml 400mM HCl 和 3.2ml 新配置的 200mM 的 NaNO<sub>2</sub>(亚硝酸钠)的溶液在 4℃ 下处理 30min 来实现。30min 后,用预冷的醋酸钠缓冲液(50mM, pH4.7)洗涤 ATMS 处理过的表面 3 次,每次 3min,然后用预冷的去离子水洗涤,最后用乙醇洗涤两次,每次 5min。重氮化后的表面在 4℃ 下空气中自然干燥,并用称为 Kimwipes 的点样工具进行点样。

第五步,重氮化表面上 DNA 阵列的形成。将样品 DNA 印刷在冰冷的重氮化表面上(手工操作或者使用微点样装置),再在空气中室温下自然干燥 1—2h。之后,可以有两种处理方法:一是将重氮化表面浸入到 1% 甘氨酸溶液中(pH7.2)两次,每次 5min,再浸入到双蒸馏水中以去除甘氨酸残基,再在空气中自然干燥;二是使用名为 Stratalinker<sup>TM</sup> 的试剂进行紫外线交联(UV-crosslink),并在 80℃ 下烘烤 2h。印刷后的表面在室温下阴暗处储存,直至杂交。

第六步, DNA 阵列的杂交。将印刷有 DNA 的玻璃片放置于科普林缸(Coplin jar)中,在含有 50% 甲酰胺, SSC 0.1% SDS 和 1% 牛血清蛋白(BSA)的体系中,于 42℃ 下预杂交 45min。在此之后,将玻片在室

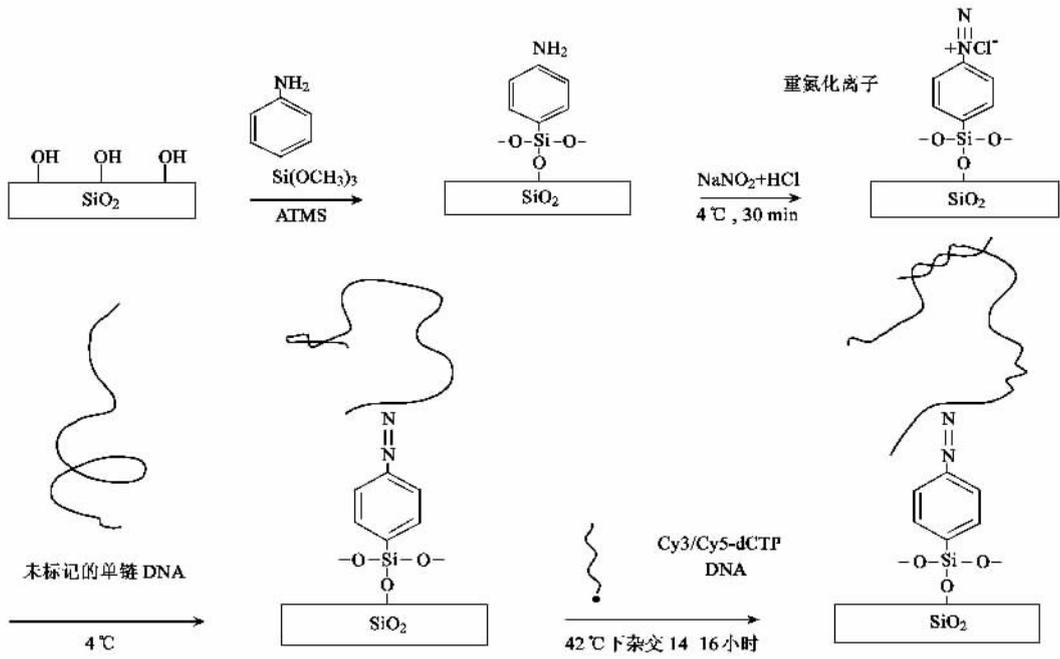


图3 用 ATMS/重氮化法把 DNA 共价地固定到玻璃表面及与 DNA 探针杂交的示意图

温下用双蒸馏水洗涤,再用异丙醇洗涤,然后风干。Cy5-标记的探针用等体积的杂交缓冲液(50% 甲酰胺,SSC,0.2 SDS)进行联合,然后在沸水中煮沸5min以使之变性。杂交混合物用到阵列上,再用盖玻片盖上。将阵列放到潮湿的 ArrayIt Hybridization Cassette 试剂中,并浸入到42℃水浴中恒温14—16h。在杂交之后,将阵列在室温下依次用在SSC和0.1% SDS各洗涤5min。最后用双蒸馏水洗涤,再次风干。

第七步,扫描玻片。最初使用尼康公司的激光共聚焦显微镜进行手工扫描,现在可以用共聚焦激光扫描仪进行扫描。

第八步,图像处理。这一步要确定每个点的位置、强度和荧光背景,并计算出每个点的背景-底物强度。

第九步,脱模(stripping)。将玻片浸入到脱模缓冲液(2.5mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.1% SDS)中在95℃下处理30s,重复3到4次。然后浸入到双蒸馏水中,再风干,室温下储存在阴暗处。

实验的结果显示,DNA与用ATMS重氮化的表面的共价结合在很大程度上增加了固定的稳定性,并且减小了DNA在杂交过程中的损失。同时,与从使用商业固定技术得来的结果相比较,本方法产生了更好的杂交结果和更小的背景荧光量。在固定的过程中,阵列面在剥离后可重复使用至少4次,并且

不影响质量。

#### 2.4 化学纳米印迹法(chemical nanoprinting)<sup>[12]</sup>

传统的DNA微阵列构建技术的最大缺点就是速度很慢,因此提高了芯片产品的成本,并限制了它的更广泛的应用。这里我们将介绍一种能在极大程度上提高DNA芯片构建速度的新技术——化学纳米印迹法。

化学纳米印迹法是一种可行的快速制取大量DNA芯片的技术。它的构建速度(平均每45s一块芯片)是现有的技术的几百倍。更重要的是,理论上,它的印刷速度并不依赖于芯片的规模,这一性质使得此技术在超高密度芯片制造方面有广阔的前景。微印迹法已经用于制造有不同生物特性的表面模式上,但是它在DNA芯片制造方面的应用还未有尝试。最近,有报道称已经实现在聚丙烯酰胺中进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)克隆的复制。只是因为需要芯片上所有的实体同一地放大,而所有的低聚核苷酸芯片和大多数其他的DNA芯片都不能满足这一需求,这种方法就不大可能应用在普通DNA芯片的制造中来。这种化学纳米印迹法技术第一次证明了印刷机制能成为一种新的普通DNA芯片的构建的尺度。这种方法导致了一种比其他芯片直接负载法(如原位合成法和原位点样法)具有更低的DNA负载的DNA芯片的出现。可以预见,这种技术与其他现有的芯片构建技术相互结

合,将使 DNA 芯片构建速度系数提高 10 到 100 倍。

在化学纳米印迹法技术中,将合成的 5' 端被硫醇标记的低聚核苷酸硅烷化,并将其共价地粘附到未经修饰的玻璃面上。这个 DNA 芯片即是我们的主芯片(master-chip)。将丙烯酰胺、重丙烯酰胺(bis-acrylamide)、腺苷-5'-磷酸硫酸酯(adenosine-5'-phosphosulfate, APS)和 *N,N,N,N*-四甲基乙烯二胺(*N,N,N,N*-Tetramethylethylenediamine, TEMED)的混合物用在主芯片上,并在主芯片上覆盖一块事先做好的结合有硅烷的玻片。在室温下让凝胶混合物聚合 1min,然后将这样的“夹心”玻片在 95℃ 下加热 5s 到几分钟不等。再将这两张玻片分开。这样聚丙烯酰胺层就能粘附到结合有硅烷的面上,并且凝胶层和载玻片共同包含印刷片(print-chip)。当与互补的低聚核苷酸杂交时,印刷片以与在主芯片上观察的图像成严格的镜像关系的空间格局上显示出强的杂交信号。这意味着,如上所述的印刷过程能实现低聚核苷酸从主芯片到印刷片的高效的转移。

在这种热控制的过程中,通过二硫键共价地结合到一个高度负载的主芯片上的低聚核苷酸,化学地转移到印刷片上的丙烯酰胺层上。复杂的同一性的印刷片可以由单一的主芯片制得。这种复制的过程比其他任何一种现有的方法快几百倍,并且这种方法的速度和成本不受 DNA 芯片的规模的影响。

### 3 DNA 微阵列的应用和展望

最近一两年 DNA 微阵列技术发展得非常迅速,其应用早已超出了最初的应用范围——测定基因的全局表达模式,扩展到了包括复杂基因疾病的鉴定、突变/多态性的探测、新药物的发现、以及毒理学等方面在内的研究领域。

DNA 微阵列技术的发展对科学研究和临床医学都有着非常重大的意义。但是,就目前的形势而言,DNA 微阵列技术所面临的最大的问题就是价格不菲,这在很大程度上限制了其向更加广泛的领域中扩展。经济上不是很强大的国家在这方面的问题尤为明显。在现阶段,DNA 微阵列技术的发展不仅仅与科技能力有关,还与经济的发展有很大关系。

2002 国际生物芯片会议于 2002 年 11 月 9—13 日在北京隆重召开。与会的当今生物芯片界的知名人物向世人展示了 DNA 微阵列的最近的发展,并且提出了对 DNA 微阵列技术的展望。在未来的几年里,DNA 微阵列技术必将取得长足的发展。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Patricia L D , Yang W , Linnea K I *et al.* *Nucleic Acids Research* ,2001 ,29( 21 ) : e107
- [ 2 ] Schena M ,Shalon D ,Davis R W *et al.* *Science* ,1995 ,270 : 467
- [ 3 ] Daniel D S. *Current Opinion in Microbiology* ,2002 5 334
- [ 4 ] Hughes T R ,Mao M ,Jones A R *et al.* *Nat Biotechnol* 2001. , 19 342
- [ 5 ] Beaucage S L. *Curr. Med. Chem.* ,2001 8 :1213
- [ 6 ] Kim S K ,Lund J ,Kiralay M *et al.* *Science* ,2001 293 2087
- [ 7 ] Miki R ,Kadota K ,Bono H *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,2001 98 2199
- [ 8 ] Strausberg R L ,Riggins G J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2001 98 :11837
- [ 9 ] Riggins G J ,Strausberg R L. *Hum. Mol. Genet.* ,2001 ,10 : 663
- [ 10 ] Nallur G ,Luo C H ,Fang L H *et al.* *Nucleic Acids Research* , 2001 29( 23 ) : e118
- [ 11 ] Benters R ,Niemeyer C M *et al.* *Nucleic Acids Research* , 2002 30( 2 ) : e10
- [ 12 ] Kumar A ,Liang Z. *Nucleic Acids Research* ,2001 29( 2 ) : e2

## 《凝聚态物理学》(上卷) 冯端、金国钧著,高等教育出版社出版)

本书于 2003 年 9 月隆重推出,首发式将在南京大学举办的第一届凝聚态与材料物理学学术研讨会暨冯端院士八十华诞庆贺活动期间举行。本书视野开阔、论述融贯、内容新颖,在把握从固体物理学到凝聚态物理学的历史发展脉络的基础上,为凝聚态物理学建立了一个逻辑上合理明晰的概念体系,并对学科涵盖的丰富内容进行了全面系统的论述。

精装本定价 77 元,书号:7040127393(加 15%

的邮费);

平装本定价 56 元,书号:7040127385(加 15% 的邮费)

如欲邮购,请与北京高教沙滩读者服务部联系。地址:北京市沙滩后街 55 号,电话:800-810-0598(免费电话),010-64014089;E-mail: gjdzfwb@public2.bta.net.cn。请在汇款单上注明书名、书号 and 是否需要发票。