分子印章法 DNA 芯片合成(Ⅲ)——反应条件的优化

肖鹏峰 陆祖宏* 刘正春 贺全国 何农跃*

(东南大学分子与生物分子电子学教育部重点实验室, 南京 210096. * 联系人, E-mail: zhlu@seu.edu.cn, nyhe@seu.edu.cn)

摘要 对分子印章法制备寡核苷酸微阵列芯片的工艺条件进行了探索. 研究了对寡核苷酸压印偶联反应影响较大的 3 个因素: 核酸反应液反应活性的稳定性、点阵上不同核酸单体残留物的交叉污染和封闭反应对寡核苷酸微阵列杂交结果的影响. 实验研究表明, 在氩气保护(水和氧含量低于 5×10^{-6})下四唑和核苷酸单体的乙腈混合液的反应活性可保持 10 h 以上. 采用了一种含羟基小分子的液体对压印偶联反应后的芯片进行处理, 成功地清除了芯片上大量剩余的活性核酸单体分子, 解决了它们对临近点阵可能产生的污染问题. 最后指出了在寡核苷酸微阵列制备过程中可以舍弃通常 DNA 固相合成工艺中的封闭反应步骤, 有效地提高了 DNA 芯片的制备效率. 上述研究表明: 分子印章法制备寡核苷酸微阵列芯片不仅可行, 而且经济.

关键词 寡核苷酸微阵列 核酸化学合成 分子印章法

DNA 芯片把大量已知序列的核酸探针集成在同一个固体基片上, 被检测的核酸分子经过标记处理后, 与芯片上特定位点的核酸探针进行杂交, 通过检测杂交探针的位置, 可以对细胞或组织中大量的核酸信息进行分析. DNA 芯片在分子生物学、医学和药学等领域中已经得到应用^[1~3]. DNA 芯片的在片合成方法通过把微细加工技术与 DNA 化学合成技术相结合, 可实现高密度寡核苷酸微阵列芯片的标准化和规模化制备, 具有十分诱人的前景. 目前国际上只有 Affymetrix 公司应用光去保护并行在片合成法制备高密度基因芯片^[1]. 我们提出了利用分子印章法进行 DNA 芯片在片合成的技术^[4]. 该技术的特点是直接采用商品化的 DNA 合成试剂, 通过应用一组表面有一定弹性的硅橡胶分子印章, 在玻璃基片表面原位合成寡核苷酸阵列. 这样不仅可节省大量的试剂开发费用, 缩短研发周期, 而且亚磷酸酰胺法合成寡核苷酸的单步合成效率高, 可提高制备 DNA 探针的正确率. 另外, 硅橡胶分子印章分辨率高, 可达到亚微米量级, 被称为软光刻技术^[5], 有望进一步提高基因芯片制备的集成度. 对分子印章法 DNA 芯片的制备技术已进行了大量的基础和工艺研究^[6~10]. 本文对分子印章法制备寡核苷酸微阵列芯片的条件进行了研究, 主要解决对寡核苷酸压印偶联反应影响较大的 3 个工艺因素: 核酸反应液反应活性的稳定性、点阵上不同核酸单体残留物的交叉污染和封闭反应对寡核苷酸微阵列的影响.

1 材料与方法

(i) 仪器和药品. 寡核苷酸合成单体与试剂除氧化剂外^[7]均为 PE Biosystems 产品. 荧光单体为上海生物制品公司产品, 与之结合的发光基团为六氯-6-羧基-荧光素(HEX). 其余化学试剂均为分析纯.

DNA 合成仪为 391 DNA Synthesizer (Applied Biosystems); 基因芯片荧光扫描仪为 ScanArray Lite Microarray Analysis System (Packard Biochip Technologies).

(ii) 实验方法. 为了比较寡核苷酸在片合成的效率, 我们比较了 3 种不同的寡核苷酸合成方法. 用 DNA 自动合成仪在控孔玻璃珠柱上合成寡核苷酸. 偶联效率^[1]通过收集每步合成中产生的二对甲氧基三苯基阳离子(DMT)溶液, 并用 0.1 mol/L 对甲基苯磺酸/乙腈溶液稀释, 在 498 nm 测定其吸光值; 用 DNA 自动合成仪在玻璃载片上合成寡核苷酸. 先在聚二甲基硅氧烷膜片刻出一定形状的凹槽并将其与玻璃载片相贴合, 然后盖上连有进出管的聚四氟乙烯薄板, 聚四氟乙烯薄板上的进样与出样口分别对准聚二甲基硅氧烷膜片凹槽的上下端, 并用铁夹将三者固定, 将聚四氟乙烯薄板上的进样与出样管连在合成仪上. 偶联效率的检测同上. 分子印章法在片压印合成寡核苷酸的方法和检测技术均与以前我们的文献报道相同^[7]. 分子印章法 DNA 芯片的制备是在无氧无水(水和氧含量低于 0.0005%(体积比))氩气手套箱中进行的. 偶联效率通过杂交检测方法获得. 荧光信号检测与荧光强度定量分析用基因芯片荧光

<https://engine.scichina.com/doi/>

扫描仪及其图像处理软件进行. 由于影响荧光强度的因素较多, 通过多次平行实验表明其测定的荧光强度值大约有 5% 的偏差. 合成序列均为 5'-GGA CTC TCT GAA TCG GAG GA-3'.

2 结果与讨论

2.1 四唑和核苷酸单体混合液的反应活性

DNA 固相合成反应物的乙腈溶液中催化剂四唑和核苷单体相互反应将会形成过渡中间化合物四唑负离子. 四唑负离子的增加会影响核苷偶联反应的产率^[11]. 分子印章法 DNA 芯片在片合成中每步需要偶联反应液的量很少, 但整个芯片的制备时间较长, 压印偶联反应的次数多. 如果上述中间化合物对偶联反应效率影响较大, 则四唑和单体混合液必须临时配制, 将造成印章法偶联反应时试剂的浪费, 以及耗费大量的时间去配制反应液. 因此, 研究在整个 DNA 芯片压印合成期间核酸反应液反应活性的稳定性是十分重要的. 我们用两种实验方法研究了在氩气保护下四唑和核苷单体的混合液反应活性随时间的变化情况. 一种方法是用注射器将反应液注入安装在 DNA 自动合成仪上的控孔玻璃珠柱中进行偶联反应, 通过测定脱保护形成的对甲氧基三苯基阳离子(DMT)的吸光值确定其偶联效率(以完全自动合成为基数). 图 1(a)为混合液不同放置时间与偶联效率的关系, 从图中可以看出在 10 h 内其反应活性依然保持较高的水平, 偶联效率达 99.5%, 与新配制的反应液活性相当; 另一种方法是用荧光单体与四唑混合, 将不同放置时间的反应液直接在玻璃载片上偶联反应, 脱保护后测定其荧光强度. 图 1(b)为荧光强度与放置时间的关系. 该实验结果表明放置 18 h 的荧光强度与新配反应液相当. 两个实验都同时证实了四唑和单体在混合后对偶联效率的确有影响, 并有相同的变化趋势. 由于在控孔玻璃珠柱中进行偶联反应, 通过测定 DMT 的吸光值确定的偶联效率误差最多在 0.5%, 因此可以断定在我们的实验条件下新配置的核酸反应液在放置时间 10 h 内四唑负离子副作用的影响不大, 反应液活性依然很好. 从图 1 中还可以发现: 混合液的最佳活性在混合后 0.5 h 附近. 这一结果表明四唑的最佳催化作用需要一定的时间. Dahl 等人^[11]在研究中曾发现四唑催化剂的加入次序影响核苷单体的偶联活性, 他们的实验结果可以用上述实验来解释.

图 1 四唑和核苷单体乙腈溶液反应活性随混合放置时间的变化

(a) 控孔玻璃珠柱上寡核苷酸合成的偶联效率, (b) 玻璃基片上偶联荧光单体的荧光强度

2.2 压印偶联反应后过剩反应物的清除

压印反应完成后, 尚有大量未参加反应的过剩核苷反应物, 这些过剩核苷反应物在用乙腈冲洗时容易造成不同点阵上不同核苷反应物沿冲洗液流经的区域发生偶联反应, 形成不同点阵之间的核苷单体的错误连接. 实验表明, 若不对过剩反应物进行处理, 合成 20 个碱基的寡核苷酸序列, 除了在应该合成的阵点有荧光外, 其周围也有较弱的荧光背景. 其合成区域与非合成区域的荧光强度比为 1 : 0.12. 我们提出了多种消除过剩反应物方法, 如消除反应单体的活性或者消除四唑的催化功能等. 通过实验, 使用含羟基的小分子溶液来冲洗未参加反应的过剩反应物可以满足此种要求. 由于这些分子含有与单体

结合的活性羟基,可以在很短的接触时间内消除核苷单体的活性反应,从而使单体与玻璃基片上活性羟基反应的机会降低.实验表明,水及低级醇均能满足上述要求,但水的引入将会污染寡核苷酸合成的环境.使用乙醇清除过剩反应物后,其合成区域与非合成区域的荧光强度比降为 1:0.04.这说明采用此种抑制剂后,压印反应后的过剩反应物的活性已经基本消失,不会因在清洗液流经的区域发生偶联反应而对其他区域造成污染.实验同时表明了经过乙醇冲洗后对偶联效率和 DNA 合成的后续反应均无影响,也证明在手套箱反应池中乙醇非常容易被清除.

2.3 封闭反应的舍弃

封闭反应是否该舍弃,自寡核苷酸原位合成以来就有争论^[12,13].对于 DNA 芯片离片合成而言,封闭反应是有其独特意义的.因为不进行封闭反应,其合成的失败片段将会给后续的纯化带来困难.但对于 DNA 芯片的在片合成而言,它是直接在基片上合成寡核苷酸探针,无后续的纯化过程.决定是否进行封闭反应的前提是这些合成的失败片段是否会对杂交反应所获取信息的正确性产生影响,并因而提供错误的结果.我们对合成中可能产生的失败片段对杂交荧光信号的贡献通过实验进行了研究.在讨论下列情况时,应该注意一个事实就是只要寡核苷酸在片合成是成功的,那么任何一种失败片段所占的比例都是不高的(例如,偶联效率为 98%,则失败片

段中一个碱基错误的片段为 2%;碱基数越多,其失败片段量的比例将越低,而 20 个碱基正确寡核苷酸的含量为 68%).

图 2 为自动合成仪上合成 3'(或者 5')的缺失个数不同的寡核苷酸在不同温度下与 5'-HEX-TCC TCC GAT TCA GAG AGT CC-3'序列杂交的荧光强度.图中可以看出,相对于 5'-GGA CTC TCT GAA TCG GAG GA-3'序列的片段都有一定的荧光强度,且在缺失个数相同的情况下,5'缺失的失败片段比 3'缺失的荧光强度稍强.随着温度的升高,两端缺失数目的寡核苷酸的荧光强度与完全正确的 20 个碱基寡核苷酸的强度相比,其值是逐渐减少的(表 1).当温度为 55℃时,只有缺失 2~4 个碱基的寡核苷酸有一定量的贡献,而此时即使采用封闭反应,5'缺失的这些失败片段的贡献依然存在.压印反应制备 DNA 芯片实验也证明了同样的结论.虽然缺失片段与 20 个碱基寡核苷酸的荧光强度比值随温度的升高而减少,但偏离最佳杂交温度太远,其荧光强度数值小,不利于检测.

图 2 中还发现,并非杂交温度越低荧光强度值越大,而是在 45℃左右值最大,这与文献推荐的最佳杂交条件相一致,即比 T_m 低 20~25℃^[14].从化学动力学观点看,一种可能的合理解释为氢键的形成由于空间效应而需要越过一定的能垒,也可以理解为正配和错配竞争的结果^[15].

表 2 为合成 20 个碱基寡核苷酸序列采用封闭反

图 2 不同温度下, 3'(5') 碱基缺失数不同的寡核苷酸与 5'-HEX-TCC TCC GAT TCA GAG AGT CC-3' 靶序列杂交的荧光强度

表 1 3′(5′)碱基缺失数不同的寡核苷酸片段与 20 个碱基寡核苷酸在不同杂交温度下荧光强度的比值

温度/℃	缺失位置	缺失个数					
		0	2	5	7	9	12
35	3′	1	0.749	0.459	0.099	0.059	0.047
	5′	1	0.809	0.484	0.341	0.251	0.053
45	3′	1	0.699	0.254	0.036	0	0
	5′	1	0.953	0.493	0.217	0.136	0
55	3′	1	0.631	0.170	0.075	0	0
	5′	1	0.788	0.185	0.112	0.093	0
65	3′	1	0.463	0	0	0	0
	5′	1	0.697	0.204	0	0	0

应和不采用封闭反应在不同温度下的荧光强度的比值. 当温度较低时不采用封闭反应的值比采用封闭反应的值大, 而当温度为 55℃时, 两者的值几乎相等.

表 2 两种方法合成 20 个碱基寡核苷酸探针(舍弃封闭反应/封闭反应)与靶序列杂交的荧光强度比值

	温度/℃			
	35	45	55	65
印章法	1.36	1.15	1.02	1.00
合成仪合成法	1.34	1.17	1.06	1.00

3 结论

图 3 为采用上述工艺条件压印偶联反应合成 20 个碱基寡核苷酸序列正(错)配杂交的荧光扫描图. 从图中可以看到 20 个碱基寡核苷酸正配序列的荧光强度好, 非合成区域无明显的荧光强度. 荧光强度完全正配: 中央位置错配 1 个: 2 个: 3 个为 1: 0.68: 0.39: 0.19, 其比值与采用封闭反应的 1: 0.66: 0.42: 0.14 非常接近.

图 3 舍弃封闭反应压印合成正配与错配寡核苷酸探针与靶序列杂交的荧光图谱
1 示完全正配, 2 示中央错配 1 个, 3 示中央错配 2 个, 4 示中央错配 3 个

致谢 本工作为国家“八六三”高技术项目(批准号: 103-13-05-01,101-01-01)、国家重点基础研究发展规划项目(批准号: G1998051204)、国家自然科学基金(批准号: 60071001)、江苏省高新技术项目(批准号: BG2001010)和教育部“高等学校骨干教师资助计划”资助项目.

参 考 文 献

1 陆祖宏, 何农跃, 赵雨杰, 等. 基因芯片的研究和应用(第 8 章). 陈竺, 强伯勤, 方福德, 主编. 基因组科学与人类健康. 北京: 科学出版社, 2000. 113~136

2 Gerhold D, Rushmore T, Thomas C C. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Techniques*, 1993, 3: 168 ~ 173

3 Khan J, Bitter N L, Chen Yidong, et al. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochemicaet Biophysca Acta*, 1999, 1423: 127~128

4 陆祖宏. 多次压印定点合成法制备化合物微阵列芯片的方法. 中国专利申请号: 98/1/11220.X. 1999-01-27

5 Xia Younan, Whitesides G M. Soft lithography. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1998, 37: 550~575

6 肖鹏峰, 何农跃, 陆祖宏, 等. 分子印章法 DNA 芯片的合成 (I): PDMS 印章的固定与收缩研究. *东南大学学报(自然科学版)*, 2001, 2: 6~10

7 肖鹏峰, 何农跃, 陆祖宏, 等. 分子印章法 DNA 芯片的合成 (II): 接触压印反应在片合成寡核苷酸. *中国科学, B 辑*, 2001, 31(5), 399~404

8 Xiao P F, He N Y, Lu Z H, et al. Soft lithography for oligonucleotide arrays fabrication. *Proceedings-23rd Annual Conference-IEEE/EMBS (CD-ROM)*. Istanbul, 2001. 85~165

9 Xiao Pengfeng, He Nongyue, Lu Zuhong, et al. Fabrication of microstamps used for oligonucleotide arrays synthesis. *Proceedings of SPIE*, 2001, 4601: 401~405

10 He Quanguo, Liu Zhengchun, Lu Zuhong, et al. Hydrophilic surface formation on PDMS stamp by microwave plasma-induced grafting. *Proceedings of SPIE*, 2001, 4601: 406~411

11 Dahl B H, Nielsen J, Dahl O. Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(4): 1729~1743

12 Engels J W, Uhlmann E. Gene synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1989, 28: 716~734

13 Uhlmann E, Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chemical Reviews*, 1990, 90(4): 544~584

14 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 编. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社. 1999, 565~569

15 Maskos U, Southern E M. Oligonucleotide hybridization on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised *in situ*. *Nucleic Aids Research*, 1992, 20(7): 1679~1684

http://cn.ingenta-sichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-3-189

(2001-08-01 收稿, 2001-12-28 收修改稿)