

• 研究论文 •

## 蛋白质 DNA 混合微点阵和微流控芯片的整合

张志祥<sup>a</sup> 沈 铮<sup>b</sup> 赵 辉<sup>c</sup> 李 宾<sup>a</sup>  
宋世平<sup>a</sup> 胡 钧<sup>a,d</sup> 林炳承<sup>b</sup> 李民乾<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup>中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

(<sup>b</sup>中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

(<sup>c</sup>中国科学院上海微系统与信息技术研究所 上海 200050)

(<sup>d</sup>上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心 上海 200030)

**摘要** 在活化的石英片上制作蛋白质和 DNA 微点阵,并可逆地将其与含有通道的多聚二甲基硅氧烷弹性橡胶封接在一起,使蛋白质和 DNA 微点阵组装在微通道列阵内;实现在微通道列阵内同时检测和分析蛋白质与 DNA 的功能.为了降低多聚二甲基硅氧烷弹性橡胶的疏水性,增强其生物相容性,实验通过多聚赖氨酸对多聚二甲基硅氧烷弹性橡胶的修饰,提高了它的亲水性,使溶液能够在微通道内顺畅地流通.实验表明,这种混合芯片能够提高检测速度和增加检测的信息量.

**关键词** 微点阵;微流控芯片;修饰;多聚赖氨酸

## Microarrays of DNA and Protein Integrated on Microfluidic Chip

ZHANG, Zhi-Xiang<sup>a</sup> SHEN, Zheng<sup>b</sup> ZHAO, Hui<sup>c</sup> LI, Bin<sup>a</sup>  
SONG, Shi-Ping<sup>a</sup> HU, Jun<sup>a,d</sup> LIN, Bing-Cheng<sup>b</sup> LI, Min-Qian<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

(<sup>b</sup> Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

(<sup>c</sup> Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

(<sup>d</sup> Nanobiology Laboratory, Bio-X Life Science Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030)

**Abstract** To combine the advantages of high-throughput microarray and microfluidic chip technology, microarray was fabricated in channels. DNA and protein were arrayed on quartz slide, which was reversibly sealed by poly(dimethylsiloxane) (PDMS) slab containing pattern of channels. The hybridization carried out in channels indicated that target DNA and proteins were bound to their complementary DNA and protein probes specifically. In this method, PDMS conjugated with polylysine was contributed to imparting the wettability and decreasing unspecific adsorption of biomolecules. Our data demonstrated that the integrated chip speeded up the detection compared to microarrays, extended the parallel channels with serial properties and enhanced the throughput of probes and targets.

**Keywords** microarray; microfluidic chip; modification; polylysine

近年来,作为微型全分析系统(miniaturized total analysis systems,  $\mu$ TAS)发展的重心,微流控芯片(microfluidic chip)在基因组学<sup>[1~3]</sup>和蛋白质组学<sup>[4~8]</sup>中得

到广泛的应用.大量分析手段已经成功地整合到微流控芯片上,如提取、浓缩、过滤和纯化等<sup>[9~12]</sup>,样品不经预处理直接在芯片上被分析,从而能够迅速可靠地分

\* E-mail: liminqian@sinap.ac.cn

Received December 30, 2004; revised April 29, 2005; accepted May 25, 2005.

国家自然科学基金(Nos. 10335070, 30470441)、上海市纳米专项基金(No. 55040213)资助项目.

析检测样品并提供大量的信息,且可降低样品的消耗量<sup>[13]</sup>.通过微点阵技术,可以实现药物、免疫分析、基因和蛋白质等的高通量筛选<sup>[14~18]</sup>.对芯片设计而言,将微流控芯片和微点阵技术整合在一起是一项挑战,虽然已经有一些这方面的相关工作<sup>[8,20~24]</sup>,但在通量研究方面还有一些问题需进一步解决.

本研究将蛋白质与 DNA 混合微点阵组装在石英玻璃和多聚二甲基硅氧烷[poly(dimethylsiloxane), PDMS]弹性橡胶胶接的微通道阵列内.利用微通道阵列的物理分隔效应,在芯片上同时对蛋白质和 DNA 样品检测,避免了蛋白质在 DNA 杂交液中变性和 DNA 链在蛋白质溶液中可能降解等问题.为了增强溶液在微通道内的流动性,我们使用多聚赖氨酸(polylysine)对 PDMS 进行了修饰,提高了 PDMS 的亲水性.这种混合芯片提高了生物样品分析的信息量和检测速度.

## 1 实验

### 1.1 试剂

甲胎蛋白(Alpha-Fetoprotein, AFP),甲胎蛋白抗体[anti AFP monoclonal antibody, Ig G (mouse)]购自 Fitzgerald 公司.多聚赖氨酸,1,4-二缩水甘油基丁二醚(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDGE),3'-缩水甘油醚氧基三甲氧基硅烷(3'-glycidoxypropyltrimethoxysilane, GOPS),4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyrimidine, DMAP),牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA),荧光素标记的亲合素(avidin modified by fluorescein isothiocyanate, FITC-avidin),荧光素标记的羊抗鼠抗体[FITC-anti Ig (sheep anti mouse)]和 *N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)购自 Sigma 公司. DNA 杂交液(50% formamide, 6× standard SSC, 0.1% SDS, 5× Denhardt and 100 μg/mL ferimine DNA), PBS 溶液(1.0 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.18 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13.7 mmol/L NaCl, 0.27 mmol/L KCl, pH 7.4),氨基标记的单链 DNA(single-strand DNA, ssDNA)和其配对的生物素或 FITC 标记的 ssDNA 购自上海生工,ssDNA 的序列列于表 1.石英玻璃(75 mm×25 mm)购自江苏宜兴光学仪器厂.载玻片购自上海齿轮玻璃公司.所用水都经过 Millipore Q (Millipore Co.)纯化.其他试剂购自 Aldrich 公司.

### 1.2 表面修饰

石英玻璃在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [V(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):V(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)=1:3]溶液中煮沸 1 h,先后用水、乙醇和水洗并用氮气吹干.经过预处理后,浸泡到 1% GOPS 乙醇水溶液 [V(乙醇):V(水)=1:9]中,放置 5 min,用乙醇和水洗,

表 1 DNA 探针和互补 DNA 的序列

Table 1 Oligonucleotide sequences of the probes ssDNA and targets ssDNA

ssDNA	Sequence
Probe ssDNA	
A <sup>a</sup>	5'-Amino-ACG TGG CAT GCT GGC CAC CGG C
B <sup>b</sup>	5'-Amino-ACG TGG CAT CCT GGC CAC CGG C
C <sup>b</sup>	5'-Amino-ACG TGG CAT CGT GGC CAC CGG C
D <sup>a</sup>	5'-Amino-TGA GCA CAT CCC ACG CCT TAC GAA
E <sup>a</sup>	5'-Amino-GTT TCC ACC ACT TCA GCG GAG TAA
F	5'-Amino-GTT TCC ACC ACT TCA GCG GAG TAA
Target ssDNA	
A <sup>a</sup>	5'-FITC-GCC GGT GGC CAG CAT GCC ACG T
D <sup>a</sup>	5'-Biotin-UUC GTA AGG CGT GGG ATG TGC TCA
E <sup>a</sup>	5'-Biotin-UUA CTC CGC TGA AGT GGT GGA AAC

<sup>a</sup> Sequence of A, D or E was completely matched with A', D' or E', respectively. <sup>b</sup> There was difference in single base between A and B, two bases between A and C.

氮气吹干,120 °C中烘 4 h,得到环氧石英片.将其浸泡在多聚赖氨酸溶液(0.1 mg/mL 多聚赖氨酸,0.2 mg/mL DMAP)中反应 2 h 后,水洗,氮气吹干,得到多聚赖氨酸石英片.

### 1.3 多聚赖氨酸石英片的活化

将上述制成的多聚赖氨酸石英片浸泡在含 1% BDGE 的 DMF 溶液中,反应 12 h,乙醇洗后,氮气吹干.

### 1.4 DNA 和蛋白质探针点样

DNA 和蛋白质探针样品分别溶解在 1×TeleChem's ArrayIt™ buffer (TeleChem International, Inc.)中,浓度为 50 μg/mL,转移到 384 孔板中,用高速点样仪点样,点的直径为 150 μm.微点阵排列方式见图 1:

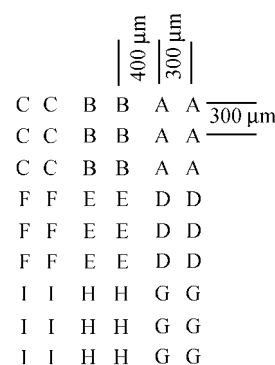


图 1 ssDNA 和蛋白质探针组装排列

点 A~F 样品是氨基修饰的寡聚脱氧核苷酸,其中点 E 为探针 D 和 E 的混合样品(浓度比为 100:1),其它点为相应的探针,序列列于表 1;探针 G~I 为蛋白质: Ig, BSA, AFP

Figure 1 ssDNA probes and protein probes array mode

Probes A~F were amino modified oligonucleotides, whose sequences were listed in Table 1, and probes G~I were proteins: Ig anti-AFP, BSA and AFP

### 1.5 微通道的设计和制作

PDMS 微通道的设计和制作过程与文献[25]相同. 简而言之, 掩膜用高分辨率打印机打印后, 1:1 覆盖在 SU-8 光敏胶(MicroChem, Newton, MA)上, 曝光洗脱, 在玻璃上制成凸形图形. 后者作为模具浇注 PDMS. 加热后成型的 PDMS 含 3 组共 9 根微通道(宽 180  $\mu\text{m}$ , 中心距 300  $\mu\text{m}$ , 长 2.5 cm, 高 30  $\mu\text{m}$ ). 用 18 号注射针头在每组微通道两端打孔, 乙醇洗后, 浸泡在多聚赖氨酸溶液中, 60  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h, 水洗, 70  $^{\circ}\text{C}$  下加热 1 h. 以经过多聚赖氨酸修饰的 PDMS 倒扣在载玻片上, 微通道面背向载玻片, 在显微镜(ECLIPSE E800, Nikon)的 4 倍物镜下细心地将 PDMS 上的每一微通道与石英片上微点阵的每一行对应吻合后, 对两者进行封接, 然后将载玻片从 PDMS 上揭下来. 这样将 PDMS 和点有 DNA 和蛋白质探针的石英片封接在一起, 每一行探针点分别封接在相应的通道内(图 2).

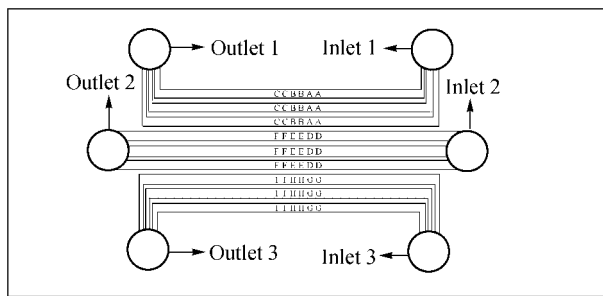


图 2 DNA 和蛋白质微点阵组装在微通道内

将含 DNA 和蛋白质微点阵的多聚赖氨酸石英片与含微通道的 PDMS 封接在一起, 使微点阵排列在微通道内

Figure 2 DNA microarray and protein microarray assembled in channels

Polylysine-slide and replica of PDMS were reversibly sealed; probe dots were arrayed in microchannels

### 1.6 杂交

互补 DNA 溶解在 DNA 杂交液中(3.3 ng 互补 DNA, 1 mL DNA 杂交液), Ig 溶解在 BSA 溶液(1  $\mu\text{g}$  Ig, 20 mg BSA, 1 mL PBS)中, 进样口(inlet 1, 2)加入 DNA 预杂交液(10  $\mu\text{g}$  Triss, 1 mL DNA 杂交液), inlet 3 加入蛋白质预杂交液(10  $\mu\text{g}$  Triss, 1 mL 2% BSA 磷酸缓冲液), 溶液很快充满通道; 吸去 inlet 中液体, 在 inlet 1, 2 中分别加入互补 DNA 杂交液, inlet 3 中加入 IgG 溶液, 出样口(outlet)连接真空水泵, 控制流速, 在 42  $^{\circ}\text{C}$  下 10 min 内使杂交液缓慢地流过, inlet 1, 2 用 DNA 杂交液, inlet 3 用 0.05% Tween 20 溶液(0.5  $\mu\text{L}$  Tween 20, 1 mL PBS)快速洗后, inlet 1 用 PBS, inlet 2 用 FITC-avidin 溶液(体积比 1:250), inlet 3 用 FITC-antiIg (体积比 1:250)置换, 反应时间 10 min, inlet 2, 3 加入 0.05% Tween 20 溶液并

抽真空, 继续用 PBS 置换.

### 1.7 荧光检测

荧光显微镜 E800 上装备了 CCD (Princeton Instrument MicroMax, Roper Scientific), 激发光聚焦在微通道上. 荧光图像由 CCD 拍摄并用 MetaMorph (Universal Imaging Corporation)软件分析.

## 2 结果和讨论

采用活化的多聚赖氨酸衬底, 而不是采用 GOPS 修饰的衬底, 是因为研究中发现, 多聚赖氨酸的结合容量为 GOPS 结合容量的 6 倍<sup>[26]</sup>. 可能由于多聚赖氨酸在衬底表面修饰后, 导致衬底的粗糙度增大, 而 GOPS 修饰的衬底基本没有变化, 同时, 多聚赖氨酸是分枝分子, 在表面上, 前者的自由度高于后者.

多聚赖氨酸对 PDMS 修饰的机理究竟是物理吸附还是化学键合有待进一步研究. 修饰过的 PDMS 亲水性提高, 与玻璃可逆封接的微通道阻力减小, 无需抽真空, 溶液就可以顺畅地流过通道, 而未经修饰的 PDMS 需要抽真空, 溶液才能通过且容易产生气泡.

用 FITC 标记直接显色和借助 biotin-avidin 体系间接反应显色来指示反应与否. 根据微通道内 DNA 杂交结果, 判断检测溶液中是否存在靶 DNA. 在微通道组 1 中, 探针 A 与 B 和 C 存在 1 到 2 碱基差异, 结果显示: 靶 ssDNA 特异地结合在探针 A 的位置上, 在探针 B 和 C 的位置上荧光信号很弱, 显示探针 A 与靶 ssDNA 序列完全配对. 不同长度的 DNA 可以组装在不同的通道内, 组 2 中 ssDNA 的长度为 24 个碱基, 比组 1 中多两个碱基. 由于点 E 为探针 D 和 E 的混合样品(浓度比为 1:10), 互补 ssDNA D' 可以同时结合探针 D 和 E, 而点 E 中的探针 D 含量低, 导致杂交后点 E 的荧光强度下降, 而探针 F 和靶 ssDNA D' 完全不匹配, 不能结合靶 ssDNA D', 在荧光显微镜下几乎观测不到点 F. 在一些情况下, 在普通的平板 DNA 微点阵中由于 DNA 中 G+C 的含量不同,  $T_m$  亦不同, 导致配对的特异性下降, 增加了检测的假阳性; 但如果将不同  $T_m$  的 ssDNA 组装在不同的微通道内, 通过改变通道内的反应条件, 则可以提高反应的忠实性, 降低检测的假阳性. 在平板芯片中很难将 DNA 和蛋白质整合在一起, 这是因为 DNA 和蛋白质杂交体系存在很大的差异: DNA 杂交液中的 SDS 以及甲酰胺或者杂交的高温能导致蛋白质的变性, 而蛋白质溶液中可能存在核酸酶能够降解 DNA, 但在微流控芯片中, 通过微通道的物理分隔, 就不存在这样的问题. DNA 和蛋白质微点阵的整合在此研究中得到实现. 在微通道组 3 中, 通过甲胎蛋白(点 K)捕获其抗体, 再结

合二抗来显示反应. 一抗(点 I)的反应在通道中亦得到验证. 结果显示, 点 K 和 I 在反应后都发出荧光, 而点 BSA 处无荧光, 说明甲胎蛋白可以捕获其抗体. 结果见图 3.

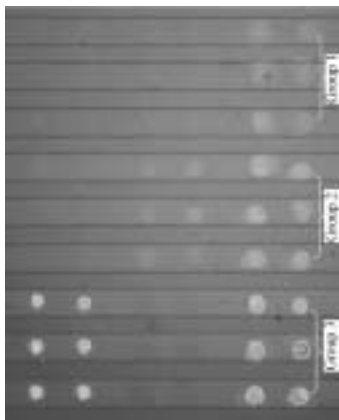


图 3 芯片杂交后的荧光图像

微通道组 1 中靶 ssDNA A' 可以特异性和探针 A 结合在一起; 组 2 中点 D 和 E 都含有探针 D, 在和靶 ssDNA D' 杂交后, 点 D 和 E 都同时发出荧光, 探针 D 在点 D 的含量高于点 E, 其荧光强度亦高于点 E; 通过甲胎蛋白(点 K)和其抗体结合, 二抗显色, 一抗(点 I)同时可以捕获二抗发出荧光

Figure 3 Fluorescent micrography of hybridized chip

Groups were hybridized with target ssDNA A' (group 1), ssDNA D' (group 2) and anti-AFP (group 3), respectively; then group 2 was stained by FITC-avidin and group 3 was stained by FITC-anti Ig; image showed: each target molecule was specifically attached to its probe

Soper 组<sup>[21]</sup>做了微通道内杂交和平板芯片上杂交动力学比较, 发现在 5 min 时, 杂交就达到饱和, 远快于平板芯片杂交所需的时间. 可能由于通道限制了分子的扩散, 同时流动的液体增加了探针分子和靶分子间的碰撞几率. 本研究中, DNA 杂交时间采用 10 min 的结果, 同采用杂交时间为 2 h 的结果没有明显区别.

### 3 结论

实验结果说明, 并行的微通道增加了芯片筛选样品的类型, 而微点阵技术增加了芯片筛选的通量. 多聚赖氨酸对 PDMS 的修饰提高了通道的亲水性和实验的可操作性.

### References

- Emrich, C. A.; Tian, H.; Medintz, I. L.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5076.
- Dai, J.; Ito, T.; Sun, L.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13026.
- Liu, J.; Hansen, C.; Quake, S. R. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4718.
- Russom, A.; Ahmadian, A.; Andersson, H.; Nilsson, P.; Stemme, G. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 158.
- Zheng, B.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11170.
- Astorga-Wells, J.; Jornvall, H.; Bergman, T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5213.
- Astorga-Wells, J.; Bergman, T.; Jornvall, H. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2425.
- Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5161.
- Hosokawa, K.; Fujii, T.; Endo, I. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4781.
- Schilling, E. A.; Kamholz, A. E.; Yager, P. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1798.
- Dai, J.; Ito, T.; Sun, L.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13026.
- Footz, T.; Wusam, S.; Kulak, S.; Crabtree, H. J.; Glerum, D. M.; Backhouse, C. J.; Broyles, B. S.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2761.
- Huber, D. L.; Manginell, R. P.; Samara, M. A.; Kim, B.-I.; Bunker, B. C. *Science* **2003**, *301*, 352.
- Cronin, M. T.; Pho, M.; Dutta, D.; Frueh, F.; Schwarcz, L.; Brennan, T. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 586.
- Gosalia, D. N.; Diamond, S. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 8721.
- Scorilas, A.; Bjartell, A.; Lilja, H.; Moller, C.; Diamandis, E. P. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1450.
- Li, T.-X.; Wang, J.-K.; Bai, Y.-F.; Sun, X.-D.; Lu, Z.-H. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e45.
- Lueking, A.; Horn, M.; Eickhoff, H.; Bussow, K.; Lehrach, H.; Walter, G. *Anal. Biochem.* **1999**, *270*, 103.
- Kohara, Y. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3079.
- Jin-Lee, H.; Goodrich, T. T.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5525.
- Wang, Y.; Vaidya, B.; Farquar, H. D.; Stryjewski, W.; Hammer, R. P.; McCarley, R. L.; Soper, S. A.; Cheng, Y.-W.; Barany, F. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1130.
- Zhan, W.; Seong, G. H.; Crooks, R. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4647.
- Lenigk, R.; Liu, R. H.; Athavale, M.; Chen, Z.; Ganser, D.; Yang, J.; Rauch, C.; Liu, Y.; Chan, B.; Yu, H.; Ray, M.; Marrero, R.; Grodzinski, P. *Anal. Biochem.* **2002**, *311*, 40.
- Baum, M.; Biela, S.; Rittner, N.; Schmid, K.; Eggelbusch, K.; Dahms, M.; Schlauersbach, A.; Tahedl, H.; Beier, M.; Güimil, R.; Scheffler, M.; Hermann, C.; Funk, J.-M.; Wixmerten, A.; Rebscher, H.; Hönig, M.; Andrae, C.; Büchner, D.; Moschel, E.; Glathe, A.; Jäger, E.; Thom, M.; Greil, A.; Bestvater, F.; Obermeier, F.; Burgmaier, J.; Thome, K.; Weichert, S.; Hein, S.; Binnewies, T.; Foitzik, V.; Müller, M.; Stähler, C. F.; Stähler, P. F. *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31*, e151.
- Dertinger, S. K. W.; Chiu, D. T.; Jeon, N. L.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1240.
- Zhang, Z.-X.; Zhang, F.; Zhao, H.; Li, B.; Hu, J.; Li, M.-Q. *J. Instrument Anal.*, submitted (in Chinese). (张志祥, 张峰, 赵辉, 李宾, 胡钧, 李民乾, 分析测试学报, 已投稿.)

(A0412301 SHEN, H.; DONG, H. Z.)