

[研究快报]

## 超亲疏水图案改善阵列芯片质量

阴启明, 叶嘉明, 周勇亮

(厦门大学化学化工学院化学系, 化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

**关键词** 阵列芯片; 咖啡环效应; 超亲水; 超疏水; 图案化

**中图分类号** O647

**文献标识码** A

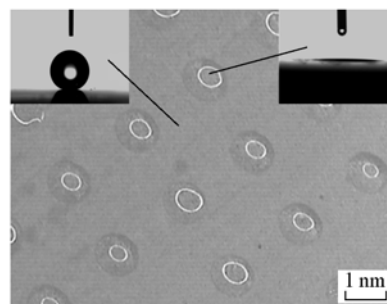
**文章编号** 0251-0790(2008)08-1647-03

近十多年来, 以基因芯片为代表的阵列芯片技术以其高通量的优点在生物、检疫、制药等领域中得到广泛应用<sup>[1]</sup>. 由于原位合成技术专利为 Affymatrix 等少数公司拥有且少量制作时成本过高, 目前普遍采用合成后点样技术制备阵列芯片, 即将含有探针分子的小液滴分散到固体基片表面, 蒸发后形成微点阵列. 由于“咖啡环效应”, 液滴被蒸干后微点通常呈现边缘浓度远高于中间浓度的不均匀现象<sup>[2]</sup>, 由此引起的微点不均匀性严重影响芯片质量<sup>[3,4]</sup>. 采用图像分析软件进行数据平均化<sup>[5]</sup>或在溶液中添加表面活性剂等<sup>[6,7]</sup>均不能很好地解决此问题. “咖啡环效应”的机理为固定的气-液-固三相接触线造成蒸发过程液滴内毛细管流方向朝外<sup>[2]</sup>. 超亲水表面具有移动的三相线, 对“咖啡环效应”具有一定抑制作用, 而超疏水表面抗拒液滴铺展<sup>[8]</sup>, 可用于约束微斑点大小. 因此本文提出在超疏水表面加工超亲水圆点图案为阵列基底制作免疫蛋白微阵列, 从而减轻“咖啡环效应”, 改善阵列芯片质量.

### 1 实验部分

**1.1 试剂与仪器** 铝片(新疆众和股份有限公司), 纯度 99.99%, 厚度 0.1 mm; 氟硅烷(Sigma 公司, 美国), 溶于乙醇配制成体积分数为 1% 的氟硅烷乙醇溶液; 荧光标记牛血清白蛋白(FITC-BSA, Sigma 公司, 英国); 卵清白蛋白(EA, 上海伯奥生物科技有限公司); 氨基硅烷(3-Aminopropyltrimethoxysilane, Alfa Aesar 公司, 英国); 羊抗 BSA 抗体由厦门大学生物系周克夫教授提供; 磷酸盐缓冲淋洗液(PBST, 16.5 mL 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液 + 33.5 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 + 8.5 g 氯化钠 + 2 mL Tween-20, 溶于 1000 mL 蒸馏水); 荧光素异硫氰酸酯(FITC, Sigma 公司, 美国); 其它试剂均为国产分析纯. MCO<sub>2</sub>-50F 二氧化碳激光打标机(北京创科源光电技术有限公司); OCA20 接触角测量仪(Dataphysics Inc., 德国); AE30 荧光倒置显微镜(Motic 公司, 中国).

**1.2 实验过程** (1) 超亲疏水图案阵列基底的制备. 将经过电化学抛光的铝片在 0.3 mol/L 的磷酸溶液中, 以 25 mA/cm<sup>2</sup> 恒电流密度电化学阳极氧化 20 min, 在金属铝表面形成超亲水氧化铝层, 修饰氟硅烷获得超疏水表面, 然后进行 CO<sub>2</sub> 激光局部烧蚀除去氟硅烷, 形成直径为(1 ± 0.2) mm 的超亲疏水图案阵列(图 1). (2) 抗体阵列制备及免疫反应. 通过浸泡法依次进行化学修饰(氨基化、醛基化)、固定羊抗 BSA 抗体及卵清白蛋白封闭, 然后将抗体阵列基片与不同浓度的 FITC-BSA 于 37 °C 下共孵育 1 h 进行免疫反应(图 2). 经 PBST 淋洗后进行荧光显微镜观察, 并采用 Motic 显微镜自带软件对斑点的光强度进行分析. 对照实验以电化学阳极氧化法



**Fig. 1 Superhydrophilic-superhydrophobic patterned AAO surface fabricated by CO<sub>2</sub> laser ablation and anodic oxidation**

Insets are photographs of 5  $\mu$ L water droplet on superhydrophobic(left) and superhydrophilic area(right).

收稿日期: 2008-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20675066)和中国科学院有机固体重点实验室开放基金资助.

联系人简介: 周勇亮, 男, 博士, 副教授, 主要从事微流控芯片物理化学研究. E-mail: ylzhou@xmu.edu.cn

制作的亲水氧化铝表面为基底, 表面修饰及免疫反应步骤均与图案化基底一致.

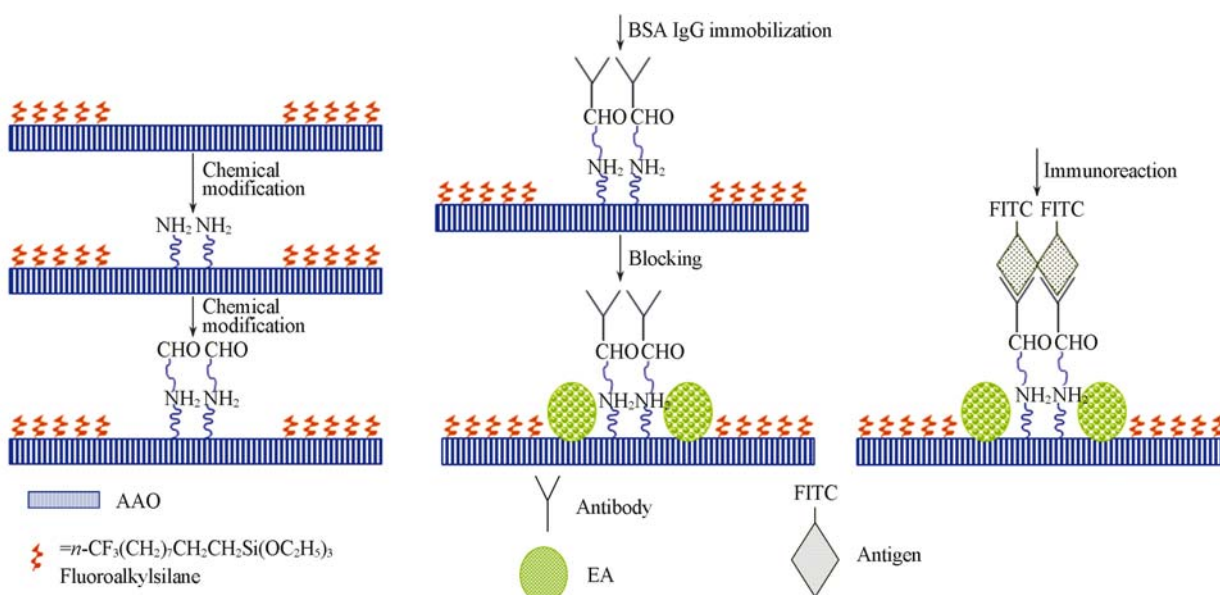


Fig. 2 Process of protein array preparation and immunofluorescence assay

## 2 结果与讨论

2.1 超亲疏水图案对荧光免疫阵列芯片质量的改善 通过对比实验发现, 当 FITC-BSA 的质量浓度处

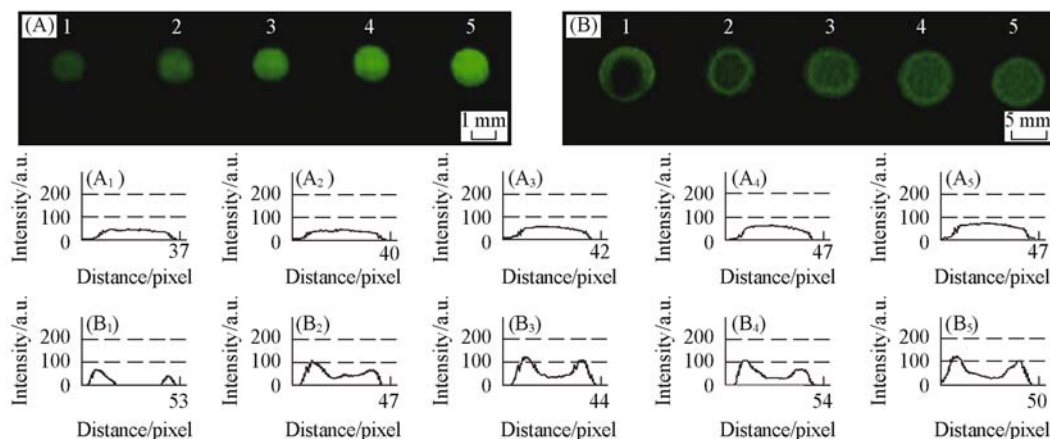


Fig. 3 Fluorescence microscope images and intensity profiles of spots on patterned surface (A) and hydrophilic surface (B) after immunoreaction

Mass concentrations of FITC-BSA for detection from top to bottom is 1.0, 0.2 mg/mL, 40, 8.0 and 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

于 1.0 mg/mL ~ 1.6  $\mu\text{g/mL}$  范围时, 亲水氧化铝表面斑点不很均匀, FITC-BSA 浓度越低, 均匀性越差, 而图案化氧化铝表面斑点的均匀性却改善明显, 即对“咖啡环效应”有明显的抑制作用(图 3). 在更高的浓度下, 两种基底的差异变小, 因为高浓度溶液中 FITC-BSA 很快铺满单层, 使“咖啡环效应”的影响减弱.

需要注意的是在实际应用体系中, 高浓度的生物样品往往不容易获得. 此外, 在超亲水表面“咖啡环效应”也能得到抑制, 使用超亲疏水图案的目的是对液滴及斑点的尺寸和形状进行约束, 更有利于检测和数据分析.

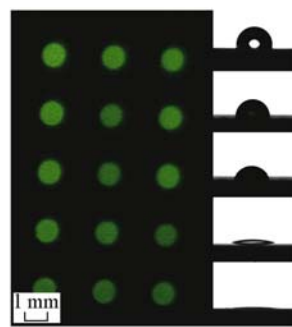


Fig. 4 Fluorescent image of dried spots containing 1 ng FITC on the surface of patterned AAO

Volume of the droplets from top to bottom is 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2  $\mu\text{L}$ , respectively and their beginning shapes are shown on the right.

2.2 点样体积对斑点均匀性的影响 将 0.2 ~ 1.0  $\mu\text{L}$  含有相同质量(1 ng)的 FITC 水溶液分别滴加在图案化氧化铝表面, 随着点样溶液体积的增加, 液滴高度变高, 但由于图案的约束, 固液接触面积保持一致. 待液滴蒸干后使用荧光显微镜观察液滴蒸干后斑点的均匀性. 结果发现, 当单位面积上 FITC 的量相同时, 随着体积变化, 斑点质量无明显改变, 都能保持较好的均匀性(图 4). 这说明以超亲疏水图案化表面为阵列芯片基底, 可在较大的点样体积范围内保持很好的斑点均匀性, 显著提高阵列芯片质量.

本文部分工作在中国科学院有机固体重点实验室完成, 感谢江雷研究员、翟锦研究员在接触角测量方面和韩东研究员在显微摄影方面给予的帮助.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Uchida T. , Fukawa A. , Uchida M. , *et al.* . J. Proteome Res. [J] , 2002 , 1 : 495—499
- [ 2 ] Deegan R. D. , Bakajin O. , Dupont T. F. , *et al.* . Nature[J] , 1997 , 389 : 827—829
- [ 3 ] Auburn R. P. , Kreil D. P. , Meadows L. A. , *et al.* . Trends Biotechnol. [J] , 2005 , 23 : 374—379
- [ 4 ] Glen M. . Analyst[J] , 2007 , 132 : 192—195
- [ 5 ] Heyer L. J. , Moskowitz D. Z. , Abele J. A. , *et al.* . Bioinformatics[J] , 2005 , 21 : 2114—2115
- [ 6 ] Rickman D. S. , Herbert C. J. , Aggerbeck L. P. . Nucleic Acids Res. [J] , 2003 , 31 : e109
- [ 7 ] Moran-Mirabal J. M. , Tan C. P. , Orth R. N. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2007 , 79 : 1109—1114
- [ 8 ] JIN Mei-Hua(金美花) , FENG Lin(冯琳) , FENG Xin-Jian(封心建) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2004 , 25(7) : 1375—1377

## Improving Quality of Microarray Chip Based on Superhydrophilic-Superhydrophobic Patterned Surface

YIN Qi-Ming, YE Jia-Ming, ZHOU Yong-Liang\*

(Department of Chemistry, the Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Microarray chip including genechip has been of great application in fields of biology, quarantine, pharmacy and so on. Most of microarray chips were prepared by spotting aqueous droplet on the surface of substrate. Due to “coffee-ring stain effect”, there always was a denser perimeter where sample was concentrated during the process of droplet drying after spotting. So the ununiformity of spot caused by “coffee-ring stain effect” was one troublesome problem of the chip quality. Herein, superhydrophilic spot arrays on superhydrophobic AAO surface were fabricated to ease the “coffee-ring stain effect”. Furthermore, a protein array is prepared on this patterned surface where immunoreactions are carried out. As a result, spot uniformity is greatly improved in a wide range of concentration and volume.

**Keywords** Microarray chip; Coffee-ring stain effect; Superhydrophilicity; Superhydrophobicity; Patterning

(Ed. : V, I)