



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510040597.3

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100334229C

[22] 申请日 2005.6.17

[21] 申请号 200510040597.3

[73] 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

[72] 发明人 肖鹏峰 陆祖宏 程璐

[56] 参考文献

CN1524180A 2004.8.25

DE102004048685 A1 2005.5.25

CN1584052A 2005.2.23

CN1412557A 2003.4.23

CN1483083A 2004.3.17

WO2004024955 A1 2004.3.25

WO03083475 A1 2003.10.9

CN1343887A 2002.4.10

审查员 周洋

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 楼高潮

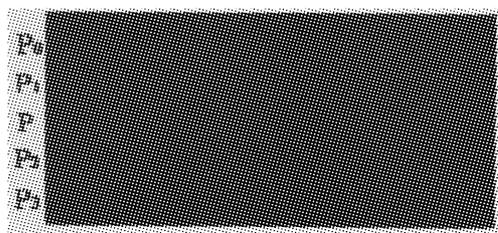
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，将丙烯酰胺修饰的核酸、丙烯酰胺单体、过硫酸铵、丙三醇和水混成预聚合物，其中，核酸的浓度在 0.001 - 100 $\mu$ M 之间，丙烯酰胺单体重量浓度在 1 - 30% 之间，过硫酸铵重量浓度在 0.01 - 5% 之间，丙三醇的重量浓度为 10 - 50%，然后将预聚合物点样于固体基板上，点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺的密闭盒中，使四甲基乙二胺挥发，挥发的四甲基乙二胺与固体基板上预聚合物阵点接触并使其发生聚合反应，使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。由本发明制得的 DNA 微阵列芯片具有很好的均匀性、重复性和高的准确性和高的灵敏性，并能提高杂交效率。



1、一种基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，其特征在于将丙烯酰胺修饰的核酸、丙烯酰胺单体、过硫酸铵、丙三醇和水混合成预聚合物，其中，核酸的浓度在 0.001-100  $\mu\text{M}$  之间，丙烯酰胺单体重量浓度在 1 - 30%之间，过硫酸铵重量浓度在 0.01 - 5%之间，丙三醇的重量浓度为 10-50%，然后将预聚合物点样于固体基板上，点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺的密闭盒中，使四甲基乙二胺挥发，挥发的四甲基乙二胺与固体基板上预聚合物阵点接触并使其发生聚合反应，使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。

2、根据权利要求 1 所述的基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，其特征在于核酸的浓度范围在 0.1-10  $\mu\text{M}$  之间，丙烯酰胺单体的浓度重量范围在 3-15%之间，过硫酸铵的重量浓度范围在 0.1-1%之间。

3、根据权利要求 1 所述的基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，其特征在于四甲基乙二胺挥发方式可采用自然挥发、蒸发或真空挥发。

4、根据权利要求 1 所述的基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，其特征在于放置四甲基乙二胺的密闭盒中的湿度为 80-100%。

5、根据权利要求 1 所述的基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法，其特征在于固体基板采用玻璃、硅片、凝胶、塑料、橡胶或陶瓷中的一种。

## 基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种 DNA 微阵列芯片的制备方法,尤其涉及一种基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法。

### 背景技术

基因芯片是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术。所谓基因芯片就是按特定的排列方式固定有大量基因探针(寡核苷酸探针或 cDNA 探针)的硅片、玻片、塑料片。基因芯片技术是高效地大规模获取相关生物信息的主要手段。目前,该技术应用领域主要有基因表达谱分析、新基因发现、基因突变及多态性分析、基因组文库作图、疾病诊断和预测、药物筛选、基因测序等。九十年代初以美国为主开始进行的各种生物芯片的研制,不到十年的功夫,芯片技术得以迅速发展,并呈现发展高峰。目前基因芯片的制备可以分成点样制备和原位合成制备法。以 Affymetrix 公司为代表的原位合成制备法是构建高密度寡核酸阵列的最有效方法,但由于其缺乏灵活性而使单片芯片的价格高而不能被广泛使用,况且该方法也无法制备通过 PCR 扩增的 cDNA 芯片。点样法具有相当的灵活性适合大多数研究和临床应用。对于中低密度的芯片而言,点样法比原位合成具有更快的生产速度。该方法目前被大多数研究单位所采用。点样法制备的基因芯片质量好坏的由下列两个因素决定:一是固定核酸的载体,另一个是在载体上固定核酸所采用的化学方法。换一种方法说就是核酸固定的效率和核酸杂交的效率是决定基因芯片的准确性和灵敏性的两个最重要因素。在载体使用方面:目前广泛使用的载体是玻璃,石英等硬质载体,这类载体由于只能在其表面固定核酸,而且核酸固定密度太高往往会由于空间位阻效应而导致杂交效率的降低。在采用的化学固定方法方面:不管使用玻璃等硬质载体还是凝胶载体,目前广泛使用的化学方法均需要多步化学反应过程对载体进行活化获得与核酸连接的诸如醛基等活性基团,过程繁琐,不但耗时长、工作量大,而且稳定性和重复性差,使得芯片质量很不稳定。

## 发明内容

本发明提供一种反应可控的基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法, 由本发明制得的 DNA 微阵列芯片具有很好的均匀性、重复性和高的准确性和高的灵敏性, 并能提高杂交效率。

本发明采用如下技术方案:

一种基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法, 将丙烯酰胺修饰的核酸、丙烯酰胺单体、过硫酸铵、丙三醇和水混合成预聚合物, 其中, 核酸的浓度在 0.001-100  $\mu\text{M}$  之间, 丙烯酰胺单体重量浓度在 1 - 30%之间, 过硫酸铵重量浓度在 0.01 - 5%之间, 丙三醇的重量浓度为 10-50%, 然后将预聚合物点样于固体基板上, 点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺的密闭盒中, 使四甲基乙二胺挥发, 挥发的四甲基乙二胺与固体基板上预聚合物阵点接触并使其发生聚合反应, 使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。

与现有技术相比, 本发明具有如下优点:

本发明利用一步不受外界影响的聚合反应在三维多孔凝胶上获得更多的核酸固定容量, 同时三维多孔凝胶能够提供类似于液相的环境有利于杂交提高杂交效率, 使制备的基因芯片具有好的准确性和高的灵敏性。核酸分子通过一步不容易受外界影响的聚合化学反应形成稳定的 C-C 键方式实现固定, 因此具有很高的核酸固定效率及其获得高稳定性的固定核酸, 由于所用化学试剂的质量可以通过丙烯酰胺单体的现场聚合得到确认, 因此重复性好。另一方面由于四甲基乙二胺是在丙烯酰胺修饰的核酸, 丙烯酰胺单体, 丙三醇, 过硫酸铵和水等混合的预聚合物点样于固体基板后通过真空挥发使预聚合物阵点聚合的, 从而使这种聚合可控, 预聚合物在点样前不会发生聚合反应, 点样溶液的核酸浓度和样品粘度保持不变, 因此这种核酸固定方法制备的 DNA 微阵列具有很好的均匀性和重复性。

## 附图说明

图 1 是一种寡聚核苷酸微阵列芯片的杂交荧光图象。

图 2 是一种 cDNA 微阵列芯片的杂交荧光图象。

## 具体实施方式

### 实施例 1

本实施例将丙烯酰胺修饰的不同核酸，分别与一定的比例的丙烯酰胺单体，丙三醇，过硫酸铵和水混合成预聚合物，然后将不同核酸的预聚合物置于点样板的不同位置上，通过手工或者点样仪器将核酸预聚合物点样于固体基板的不同位置上（利用位置编码使固体基板每个位置上的核酸分子为已知样（序列）），点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺密闭潮湿盒中，在真空作用下四甲基乙二胺挥发并与固体基板上预聚合物阵点接触使其发生聚合反应，使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。（参见图1）将5'端丙烯酰胺修饰的不同序列的寡聚核苷酸和不含核酸的空白样品（例如，分别与Cy3染料标记序列Cy3-TGC TGT GAG TGA ACC TGC TGT GTT GA-3'完全正配，中央位置错配1，2，3个碱基的序列5'-TCA ACA CAG CAG GTT CAC TCA CAG CA-3'（P<sub>0</sub>）；5'-TCA ACA CAG CAG CTT CAC TCA CAG CA-3'（P<sub>1</sub>）；5'-TCA ACA CAG CAC GAT CAC TCA CAG CA-3'（P<sub>2</sub>）；5'-TCA ACA CAG CAC CAT CAC TCA CAG CA-3'（P<sub>3</sub>）（下表带下划线的字母表示错配碱基）分别与3%的丙烯酰胺单体，30%丙三醇，0.1%过硫酸铵和水混合成1 $\mu$ M探针的预聚合物，然后将这四种不同核酸的预聚合物置于点样板的不同位置上，通过点样仪将核酸预聚合物点样于固体基板的不同位置上（分别表示P<sub>0</sub>，P<sub>1</sub>，P<sub>2</sub>，P<sub>3</sub>序列和不含核酸的空白样品P的各10个寡核酸阵点构成寡核酸微阵列），点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺密闭潮湿盒中，在真空作用下四甲基乙二胺挥发并与固体基板上预聚合物阵点接触使其发生聚合反应，使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。固定完成后的DNA微阵列芯片在常温下与10 $\mu$ M的Cy3-TGC TGT GAG TGA ACC TGC TGT GTT GA-3'序列杂交2小时，用扫描仪扫描得到微阵列芯片的杂交荧光图象。在图1中具有完全匹配序列（P<sub>0</sub>）具有最强的荧光信号，错配序列的荧光信号均比完全匹配序列的低，其错配1，2，3个碱基的荧光强度分别为完全正配的51.9%，2.48%和0.899%。很明显信号强度随着碱基错配数目的增加而下降很快，能够区分正配和单碱基错配序列。

## 实施例 2

本实施例将低密度脂蛋白受体基因 14417 位点丙烯酰胺修饰的不同 PCR 产物，分别与一定的比例的丙烯酰胺单体，丙三醇，过硫酸铵和水混合成预聚合物，

然后将不同核酸的预聚合物置于点样板的不同位置上,通过手工或者点样仪器将核酸预聚合物点样于固体基板的的不同位置上,制备成 cDNA 微阵列芯片。其具体过程为:三个已知 14417 位点多态性冠心病病人的新鲜血样本由在 5' 端丙烯酰胺修饰的前引物 5' - TAC TAT CCT TCC CAG CTC CT 和未修饰的反相引物 5' -TTT TCA GCA ACT TGG CAT-3' 扩增。50ulPCR 体系中含有 50ng 基因组 DNA, 1xPCR 缓冲液, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 250uM dNTPs, 20pmol 引物 of 2U Taq DNA 聚合酶。DNA PCR 条件为: 94℃预变性 5 分钟, 35 个 94℃30 秒, 55℃30 秒, 72℃30 秒的循环, 最后 72℃延伸 7 分钟。扩增完成后 PCR 样品与 3%的丙烯酰胺单体, 30%丙三醇, 1%过硫酸铵和水混合成大约 0.1-0.2uM 探针的预聚合物, 然后将这三个样本的 PCR 产物和空白样四种预聚合物置于点样板的不同位置上, 通过点样仪将核酸预聚合物点样于固体基板的的不同位置上, 点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺密闭潮湿盒中, 在真空作用下四甲基乙二胺挥发并与固体基板上预聚合物阵点接触使其发生聚合反应, 使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定。固定完成后的 cDNA 微阵列芯片在常温下与 10uM 的标记序列 5' - Cy3 - GGA AAA CAG CCA A-3', 5' - Cy5 - GGA AAA GAG CCA A-3' 序列杂交 2 小时, 扫描得到杂交荧光图象(图 2)。图中纯合子 14417C/C 给出强的 CY3 荧光信号(图 2 中 4, 5 行, 绿色荧光)。纯合子 14417G/G 给出强的 Cy5 荧光信号(图 2 中 7, 8 行, 红色荧光)。杂合型 14417C/G 即给出 Cy3 的荧光信号又同时给出 Cy5 的荧光信号, 两种染料叠加后, 给出强的黄色荧光信号(图 2 中 1, 2 行)。

### 实施例 3

一种基于凝胶固定核酸的 DNA 微阵列芯片制备方法, 将丙烯酰胺修饰的核酸、丙烯酰胺单体、过硫酸铵、丙三醇和水混合成预聚合物, 其中, 核酸的浓度在 0.001-100 uM 之间, 丙烯酰胺单体重量浓度在 1 - 30%之间, 过硫酸铵重量浓度在 0.01 - 5%之间, 丙三醇的重量浓度为 10-50%, 而核酸的最佳浓度范围在 0.1-10 uM 之间, 丙烯酰胺单体的最佳浓度重量范围在 3-15%之间, 过硫酸铵的最佳重量浓度范围在 0.1 - 1%之间, 具体来说, 核酸的浓度可选择 0.001、0.1、8、10、50 或 100 uM 之间, 丙烯酰胺单体重量浓度可选择 1%、3%、15%、10%、24%或 30%之间, 过硫酸铵重量浓度可选择 0.01%、0.1%、1%、3%、5%

之间，丙三醇的重量浓度可选择 10%、15%、32%、42%或 50%，然后将预聚合物点样于固体基板上，点样完后将点样基片置于一放置有四甲基乙二胺的密闭盒中，使四甲基乙二胺挥发，挥发的四甲基乙二胺与固体基板上预聚合物阵点接触并使其发生聚合反应，使各阵点上的核酸通过共聚反应在固体基板上得到固定，所述四甲基乙二胺四甲基乙二胺的挥发方式可采用自然挥发、蒸发或真空挥发，放置四甲基乙二胺的密闭盒中的湿度为 80-100%，固体基板采用玻璃、硅片、凝胶、塑料、橡胶或陶瓷中的一种，上述丙烯酰胺修饰的核酸可采用市售的丙烯酰胺修饰的核酸。



图 1



图 2