

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>  
C12Q 1/68  
G01N 33/53



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98110965.9

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1109111C

[22] 申请日 1998.7.17 [21] 申请号 98110965.9

[71] 专利权人 中国科学院上海原子核研究所  
地址 201800 上海市嘉定嘉罗路 2019 号

共同专利权人 中国科学院上海冶金研究所  
中国科学院上海有机化学研究所

[72] 发明人 李民乾 胡 钧 欧阳振乾 张 益  
徐元森 郑养铄 赵建龙 陈海宝

[56] 参考文献

US5571639 1996.01.01 C12Q168

审查员 王朋飞

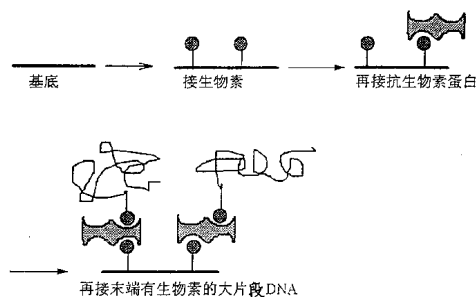
[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
代理人 谢晋光

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 4 页

[54] 发明名称 大片段脱氧核糖核酸芯片及其制造方法

[57] 摘要

一种大片段 DNA 芯片及其制造方法，其制作步骤主要是先对基底作硅烷化处理，再行生物素处理、和对基底上的生物素接抗生物素蛋白，并将某个生物体基因组的大片段 DNA 末端也接上生物素，采用喷墨法或定位点滴法将不同 DNA 片段有序地集成在基底上。本发明的 DNA 芯片，其每一片段 DNA 系为 10K ~ 200K 核苷酸对，每一行上的 DNA 片段呈虚线状且相邻行上的 DNA 片段成交错布设，同一列上相邻单元的间隔空间为 DNA 分子操纵拉直空间。



ISSN 1008-4274

1. 一种大片段 DNA 芯片的制作方法，其步骤包括：
  - a. 基底表面处理：将玻璃或云母或硅片表面用 1% 的 3-氨基丙基硅烷水溶液处理活化，
  - b. 将光生物素试剂均匀覆盖上述经处理的基底表面，
  - c. 基底表面生物素化：取经过表面活化的芯片在基底中间区利用虚线状结构的掩膜作光刻曝光处理，定位在大小为 2 微米 × 25 微米的单元内将芯片基底生物素化，随后清洗掉未曝光区间的光生物素，同一行单元之间的距离为 25 微米；每行共 200 个单元，行间距为 100 微米，共 100 行，整个芯片上共有 100 × 200 个单元；每个单元地址以 A : B 来标记，其中 A 为行数，B 为列数，
  - d. 加入抗生物素蛋白和末端带有生物素的大片段 DNA：用自动高速微量点滴仪器在芯片的已经结合生物素的单元上与浓度为 1 纳克/微升、末端共价结合生物素的大片段 DNA 以及抗生物素蛋白相互作用 20 分钟，采用“生物素 — 抗生物素蛋白 — 生物素 — DNA”的方法固定 DNA，
  - e. 重复步骤 b ~ d，在芯片的每个单元固定不同的大片段 DNA，
  - f. 用水清洗芯片，至此，完成了 I 型大片段 DNA 芯片的制作。
2. 根据权利要求 1 所述的大片段 DNA 芯片的制作方法，其特征在于还有分子操纵处理：I 型芯片经拉直操纵方法拉直其上的 DNA，完成了 II 型大片段 DNA 芯片的制作。

3. 按照权利要求 1 所述的大片段 DNA 芯片的制作方法制成的大片段 DNA 芯片, 包括基底和以阵列有序集成固接在其表面的片段 DNA, 其特征在于该每一片段 DNA 系为 10Kb-200Kb 的天然的大片段 DNA。

4. 根据权利要求 3 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于芯片中的大片段 DNA 的地址与细菌人工染色体库或酵母人工染色体库的地址存在确定的对应关系。

5. 根据权利要求 3 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于芯片中的大片段 DNA 阵列单元, 其每一行上置设的大片段 DNA 形成一虚线结构, 而相邻行上的大片段 DNA 位置成相交错布设。

6. 根据权利要求 5 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于芯片中同一列相邻单元之间的距离至少等于大片段 DNA 的分子拉直长度。

7. 根据权利要求 6 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于芯片中的大片段 DNA 分子拉直操纵系沿与该虚线垂直朝下方向。

8. 根据权利要求 3 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于芯片的面积为  $1 \times 1$  平方厘米, 其分成  $100 \times 200$  个单元, 每个单元为 2 微米  $\times$  25 微米, 同一行单元之间的距离为 25 微米, 每行共 200 个单元, 行距为 100 微米, 共 100 行。

9. 根据权利要求 8 所述的大片段 DNA 芯片, 其特征在于每一平方厘米基底上固化  $2 \times 10^4$  种大片段 DNA。

## 大片段脱氧核糖核酸芯片及其制造方法

本发明涉及一种用于生命信息储存和处理的 DNA(脱氧核糖核酸)芯片(DNA chip)的结构改进及其制造方法,具体地说,是一种将 10K~200K 核苷酸对、天然的、已知其在生物体基因组的物理图谱上的精确位置的 DNA 片段固化在一基底(硅片、玻璃或云母片)上的 DNA 芯片。

20 世纪 90 年代中期,美国 Affymatrix 公司等发明的高密度 DNA 芯片(DNA chip),即又称基因芯片(Gene chip),它是寡聚核苷酸(Oligonucleotide)探针的高密度阵列,是在一基底上人工合成小片段 DNA 芯片,参见美国第 5,445,934 号专利,这一类 DNA 芯片以玻璃或硅片为基底,将约 1 平方厘米的基底划分为成千上万个方格,然后覆盖一层光敏基团。在选定的方格内,进行光照后去掉光敏感基团对此点的保护,然后加上带有相同光敏基团的核苷酸进行在位合成;重复以上操作,即可任意定位合成所需的寡聚核苷酸系列直至制成整个芯片。参见美国第 5,571,639 号专利,核苷酸阵列的制作也可利用计算机的参与来完成。由此可见,上述专利所公开的技术方案,其优点是可合成高密度的寡聚核苷酸(小片段 DNA,或称 DNA 探针)阵列,例如,已达到 40 万种阵列芯片,可以最大程度地体现平行处理的原则,因此,它获得的信息也很丰富。但是,它也有其不足之处,概述如下:

1. 生物体基因组中存在着大量的重复序列,且每个基因均由成千上万个

核苷酸对组成，而作为小片段 DNA 芯片中每一组成单元 DNA 探针，其所含核苷酸对小于 20 个，因此，用它去探测一个基因则可能导致误差；

2. 由于芯片中相邻小片段 DNA 之间没有足够的间隔空间，因此，无法进行拉直分子操纵，难以对 DNA 探测作出精确定位；

3. 使用小片段 DNA 探针，无法寻找完整的新基因，科学实验已表明，通过信使核糖核酸（mRNA）及其互补 DNA（cDNA，即基因中表达为蛋白质的那部分 DNA 序列）确实可找到 DNA 的表达区，但将这一段基因插入质粒（一种载体 DNA）载体，再转移至大肠杆菌中，但并不一定能表达，非得把与该基因相关的非表达区域一起转移才能表达，因此寻找完整的新 DNA 不能简单地从 mRNA 出发，必须从天然的大片段 DNA 链中去找。

4. 某一基因的突变，往往会影响几个基因，这就是许多常见病或癌症与多基因相关的道理，因此，必须从基因组的观念上从整体上去研究，已有的小片段 DNA 芯片无法胜任。

本发明的目的是提供一种大片段 DNA 芯片及制造方法，系将含有 10K ~ 200K 核苷酸对天然片段 DNA 固化在一基底上，形成大片段 DNA 芯片。

本发明的另一目的是提供一种可使 DNA 分子拉直操纵的大片段 DNA 芯片。

根据本发明大片段 DNA 芯片的制作方法，其步骤包括：

a. 芯片基底的表面处理：将玻璃或云母或硅片表面用 1% 的 3-氨基丙基硅烷（APS）水溶液处理活化，

b. 将光生物素（PHOTOBIOITIN）试剂均匀覆盖上述经处理的基底表面，

c. 芯片基底的表面生物素化：取经过表面活化的基底（2×2 平方厘米），在基底中间区利用虚线状结构的掩膜（MASK）作光刻曝光处理，定位在大小为

2 微米 × 25 微米的单元内将芯片基底生物素化，随后清洗掉未曝光区间的光生物素，同一行单元之间的距离为 25 微米；每行共 200 个单元，行间距为 100 微米，共 100 行，整个芯片上共有 100 × 200 个单元；每个单元地址以 A : B 来标记，其中 A 为行数，B 为列数，

d. 加入抗生物素蛋白 (AVIDIN) 和末端带有生物素的大片段 DNA；用自动高速微量点滴仪器在芯片的已经结合生物素的单元上与浓度为 1 纳克/微升、末端共价结合生物素的大片段 DNA 以及抗生物素蛋白相互作用 20 分钟，采用“生物素 — 抗生物素蛋白 — 生物素 — DNA”的方法固定 DNA，

e. 重复步骤 b ~ d，在芯片基底的每个单元固定不同的大片段 DNA，

f. 用水清洗芯片，至此，完成了 I 型大片段 DNA 芯片的制作，

g. 分子操纵处理：I 型芯片经拉直操纵方法拉直其上的 DNA，完成了 II 型大片段 DNA 芯片的制作。

按照本发明方法制成的大片段 DNA 芯片，包括基底和以阵列有序集成固接在其表面的片段 DNA，其特征在于该每一片段 DNA 系为 10K b - 200K b 的天然的大片段 DNA，该大片段 DNA 的地址与细菌人工染色体库或酵母人工染色体库的地址存在确定的对应关系，在芯片中的大片段 DNA 阵列单元，其每一行上置设的大片段 DNA 形成一虚线结构，且相邻行上的大片段 DNA 位置成相交错布设，而同一列相邻单元之间的距离至少等于大片段 DNA 的分子拉直长度，并且 DNA 分子拉直操纵系沿与该虚线垂直朝下方向。具体地说，本发明之大片段 DNA 芯片的面积为 1 × 1 平方厘米，其分成 100 × 200 个单元，每个单元为 2 微米 × 25 微米，同一行单元之间的距离为 25 微米，每行共 200 个单元，行距为 100 微米，共 100 行，也即在每一平方厘米基底上固化  $2 \times 10^4$  种大片段 DNA，最后，

还要指出，根据本发明对大片段 DNA 芯片的检测方法，系采用纳米显微术，包括采用原子力显微镜和扫描近场光学显微镜来探测大片段 DNA 芯片上的分子标记或荧光信号的分布及定量分析。

本发明与已有技术相比具有实质性的进步：

1. 本发明大片段 DNA 芯片，其每一大片段 DNA 探针含 10K-200K 碱基对，而已有技术中的芯片 DNA 探针含 <20 碱基，因此，大大扩展其应用范围及达到更高的层次，例如，可用于完整新 DNA 定位、寻找；用于单个核苷酸多态性位点 (SNP<sub>s</sub>) 系统搜索寻找和监视；用于 DNA 组遗传作图、DNA 组物理图谱补缺，DNA 测序有序化探索；

2. 在芯片的制造工艺上，除了喷墨法，点滴法外，特别是与 DNA 分子操纵相结合，经拉直操纵方法将芯片上的大片段 DNA 拉直，从而可作精确测量定位；

3. 制成的芯片可用荧光显微镜和能对大样品精确定位的纳米显微镜 (原子力显微镜 AFM、扫描近场光学显微镜 SNOM 系统) 予以检测。

本发明的附图说明如下：

图 1 是本发明的制造方法流程示意图。

图 2 是本发明的大片段 DNA 芯片结构示意图。

图 3 是本发明的大片段 DNA 芯片特定 DNA 阵列大小示意图。

图 4 是本发明的 I 型 DNA 芯片结构示意图，显示其未作 DNA 拉直操纵，其可由荧光信息定性显示单个核苷酸多态性 (SNP) 的分布情况。

图 5 是本发明的 II 型大片段 DNA 芯片中特定单元结构示意图。

图 6 是对本发明 II 型大片段 DNA 芯片自动大规模拉直的 DNA 的原子力显

显微镜照片，线条即为拉直的 DNA。

图 7 是对本发明 II 型大片段 DNA 芯片带分子标记的拉直的 DNA 的原子力显微镜照片，DNA 为线性的，其上的亮点为分子标记。

根据图 1~图 5 给出本发明较好的实施例。

#### 实施例一

参阅图 1，如图所示，本发明的大片段 DNA 芯片的制作方法，先提供表面极其平整的基底如硅片、玻璃或云母片进行硅烷化处理，并且用生物素进行处理，再根据生物素 (Biotin)-抗生物素蛋白 (Avidin) 的强烈的专一性相互作用，在基底-生物素上接上抗生物素蛋白，将某个生物体 DNA 组 (例如水稻的 DNA 组) 的大片段 DNA (10,000~200,000 核苷酸对) 末端也接上生物素，采用喷墨法或定位点滴的方法，将不同 DNA 片段有序地集成在基底上。

另又如图 2、图 3 所示，本发明的大片段 DNA 芯片，每一 DNA 阵列大小为 25 微米×2 微米，在 1 厘米×1 厘米的芯片上，将有 200×100 个不同阵列，其上可固化 20,000 种不同的大片段 DNA。

如图 4 所示，本发明之 I 型大片段 DNA 芯片，未作 DNA 拉直操纵，由荧光信息，可知单个核苷酸多态性 (SNP) 的分布情况，而本发明之 II 型大片段 DNA 芯片中的特定单元，例如：地址 (Add1) 之特定单元，由原子力显微镜 (AFM) 成像和检测，如图 5 所示，精确测定了单个核苷酸多态性 (SNP) 的位置，依如下公式计算：

离端点的碱基对  $D = d$  (微米) ×  $K$  (碱基对/微米)，其中  $d$  - 物理距离， $D$  - 碱基对 (bps) 数目， $K$  - 拉直系数，约等于 2000。

本实施例的制作过程是：

云母表面用 1%的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 水溶液处理 3 分钟, 真空干燥。将每毫升 10 毫克的生物素-N-羟基丁二酰亚胺酯 (BNHS) 的二甲亚砜 (DMF) 与等体积每升 0.2 摩尔的碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 水溶液的混合, 取经 APS 处理的云母 2 平方厘米, 在云母上利用点滴方法滴加上述混合溶液; 20 分钟后, 用蒸馏水冲洗云母表面, 再与每毫升 1 毫克的抗生物素蛋白水溶液相互作用 20 分钟, 用蒸馏水冲洗; 接着与浓度为每微升 1 纳克、末端共价结合生物素的 DNA 相互作用 20 分钟。将比较 DNA 样品和荧光标记的单个核苷酸多态性 (SNP) 酶与云母表面 DNA 相互作用, 在荧光显微镜下, 根据其荧光分布及强弱, 可发现其单个核苷酸多态性 (SNP) 酶的分布, 也即  $\text{SNP}_s$  的分布情况。

### 实施例二

云母表面用 1%的 3-氨基丙基硅烷 (APS) 水溶液处理 3 分钟, 真空干燥。将每毫升 10 毫克的生物素-N-羟基丁二酰亚胺酯 (BNHS) 的二甲亚砜 (DMF) 与等体积每毫升 0.2 摩尔每升的碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 水溶液的混合, 取经 APS 处理的云母表面, 在云母上利用点滴方法滴加上述混合溶液。20 分钟后, 用蒸馏水冲洗云母表面, 再与每毫升 1 毫克的抗生物素蛋白水溶液相互作用 20 分钟, 用蒸馏水冲洗; 接着与浓度为每微升 1 纳克、末端共价结合生物素的 DNA 相互作用 20 分钟。用水冲洗, 然后经“动态分子梳”方法拉直在云母片上的 DNA。将比较 DNA 样品和荧光标记的单个核苷酸多态性 (SNP) 酶与云母表面上拉直的 DNA 相互作用, 然后经原子力显微镜成像, 并精确测定单个核苷酸多态性 (SNP) 酶在拉直的 DNA 链上离 DNA 末端固定点的距离。

### 实施例三

1. 云母表面用 1%的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 水溶液处理活化。光

生物素 (PHOTOBIOITIN) 试剂均匀暂盖上述经处理的云母表面。

2. 然后进行有序化分区, 整个  $1 \times 1$  平方厘米的云母上共分  $100 \times 200$  个单元; 同一行单元之间的距离为 25 微米, 每行共 200 个单元; 行间距为 100 微米, 共 100 行。每个单元的地址以 A : B 来标记, 其中 A 为行数, B 为列数。

3. 取上述经过表面活化并分区的云母, 利用虚线状结构的掩膜 (MASK) 作光刻曝光处理, 定位地在大小为 2 微米  $\times$  25 微米的单元内将芯片基底生物素化。随后清洗掉未曝光区的光生物素。

4. 加入抗生物素蛋白 (AVIDIN) 和末端带有生物素的大片段 DNA: 用自动高速微量点滴仪器在芯片的已经结合生物素的单元 (即已经与光生物素相互作用的单元) 上与浓度为 1 纳克/微升、末端共价结合生物素的大片段 DNA 以及抗生物素蛋白相互作用 20 分钟, 采用 “生物素 - 抗生物素蛋白 - 生物素 - DNA” 的方法固定 DNA;

5. 重复 2 - 4 步骤, 从而使芯片的每个单元均固定上不同的大片段 DNA。这些 DNA 可以来自细菌人工染色体 (BAC) 或酵母人工染色体 (YAC) 库, 其在芯片上的位置按照 A : B 的方式确定的, 而每一个地址上的 DNA 均与其细菌人工染色体 (BAC) 或酵母人工染色体 (YAC) 库中的 DNA 有序地联系起来;

用水清洗芯片, 并经拉直操纵方法拉直其上的 DNA; 将上述芯片与样品 DNA、SNP<sub>s</sub> 酶相互作用, 利用原子力显微镜及扫描近场光学显微镜精确测定 SNP 位点。本实施例的结果如图 6 和图 7 所示。

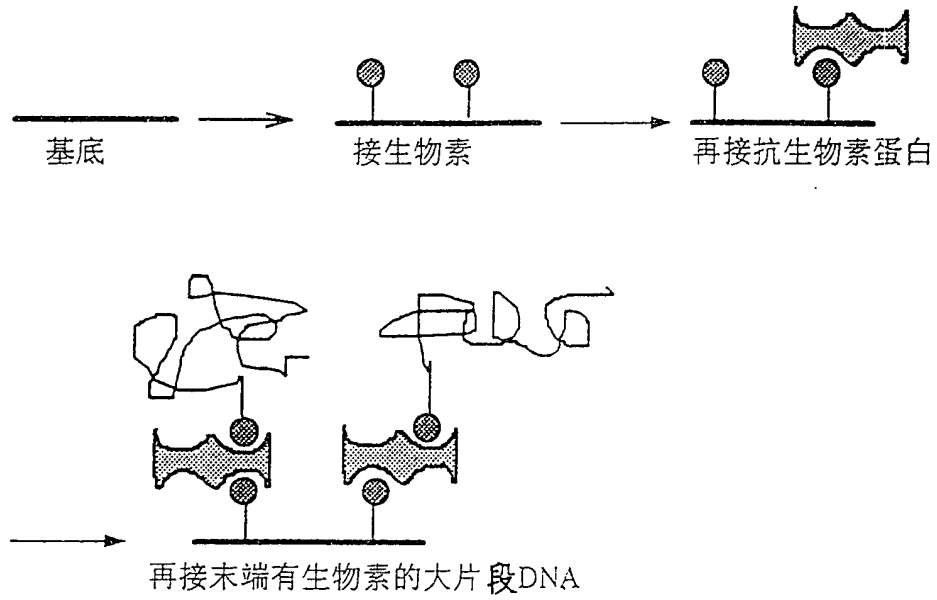


图1

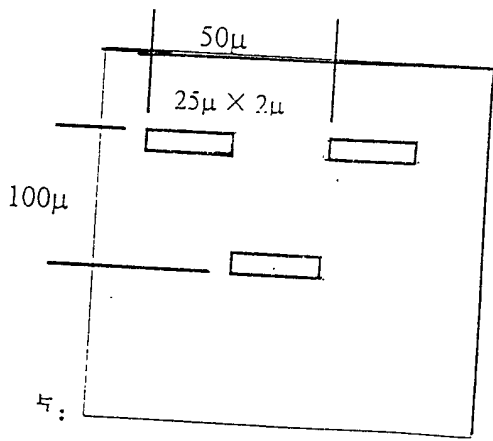


图3

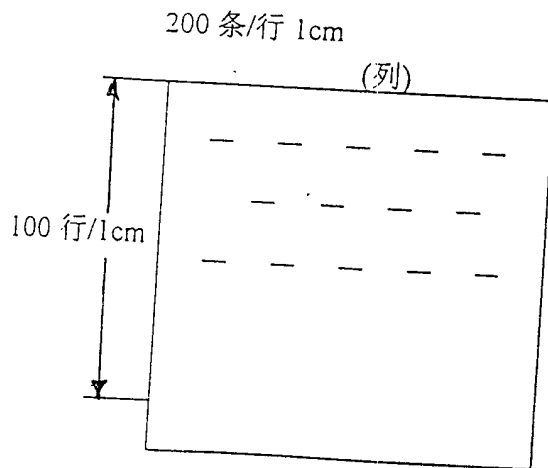


图2

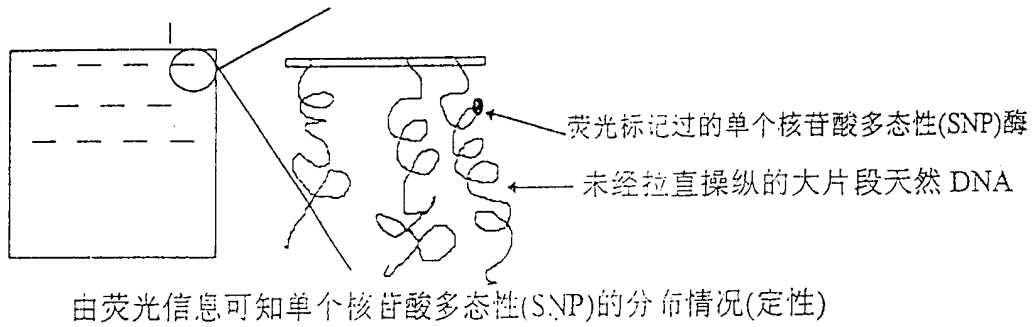


图 4

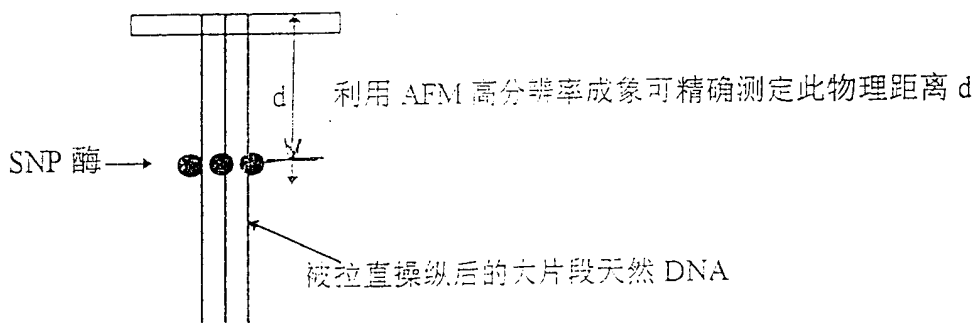


图 5

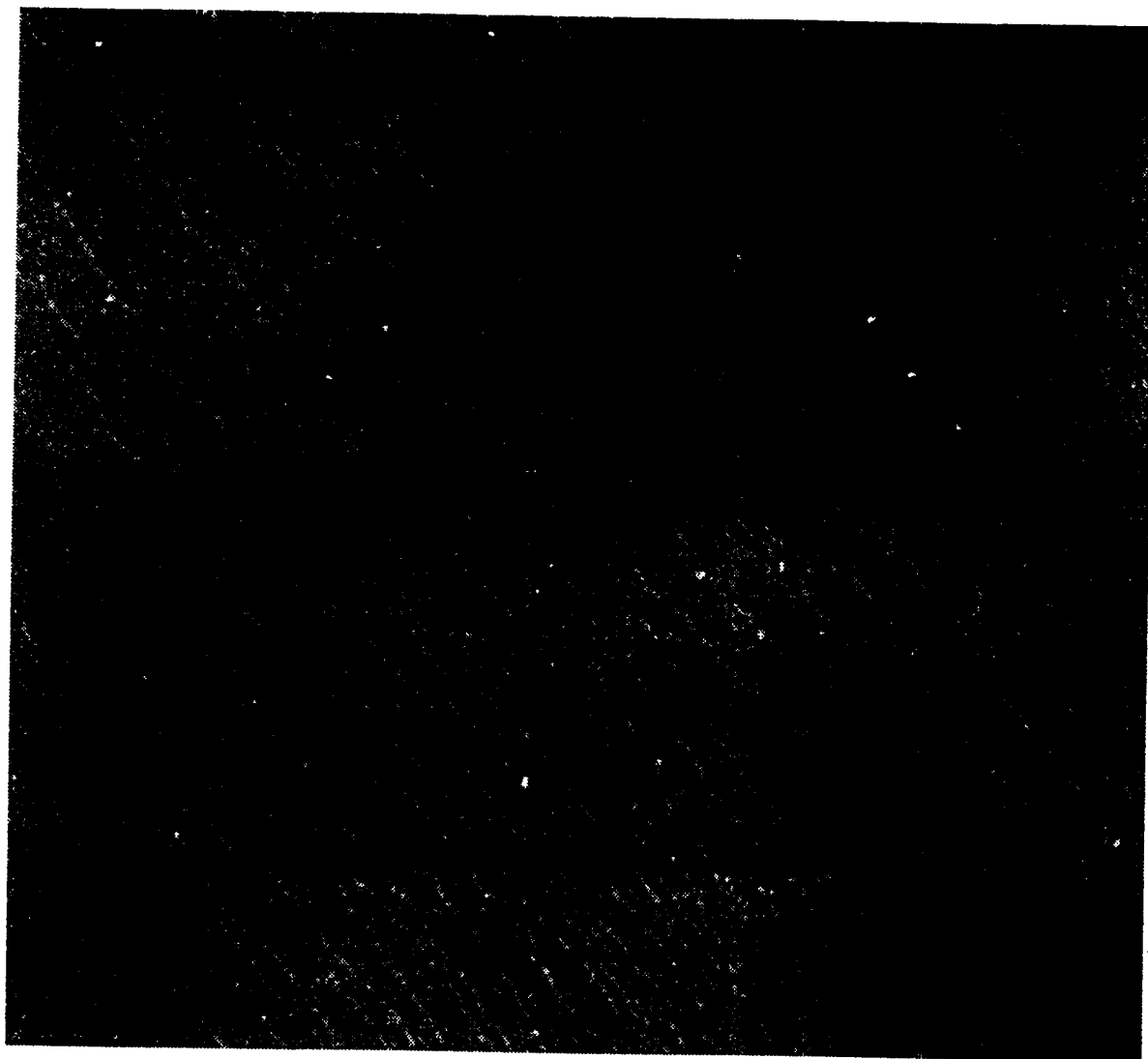


图 6

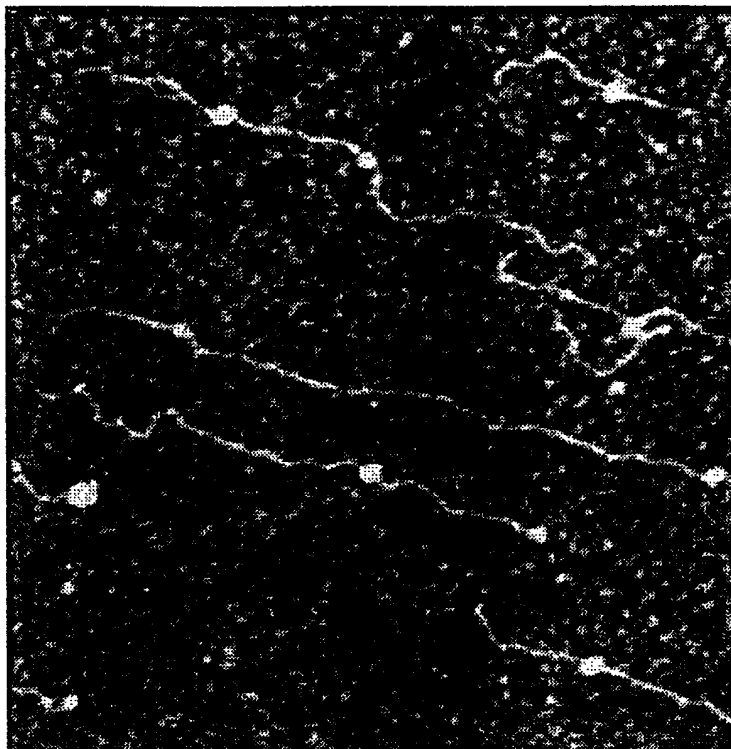


图 7