

# 硅烷化和多聚赖氨酸化衬底结合容量的比较

张志祥<sup>1</sup>, 张峰<sup>1</sup>, 赵辉<sup>2</sup>, 李宾<sup>1</sup>, 胡钧<sup>1,3</sup>, 李民乾<sup>1</sup>

(1. 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800; 2. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050; 3. 上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心, 上海 200030)

**摘要:** 应用了多聚赖氨酸以及硅烷化试剂——3-氨丙基三乙氧基硅烷和 3-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷修饰硼玻璃衬底, 并用微点阵点样仪和微通道在其上印刷微点阵。应用原子力显微镜观测以上所制备衬底的粗糙度以及荧光显微镜检测不同衬底的分子结合容量。结果显示: (1) 多聚赖氨酸修饰衬底的粗糙度大于两种硅烷化试剂修饰衬底的粗糙度; (2) 前者的结合容量高于硅烷化试剂修饰衬底的结合容量, 多聚赖氨酸修饰衬底的探针结合容量是 3-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷修饰衬底的 6 倍, 说明衬底的粗糙度和分子结合容量之间的正相关关系。

**关键词:** 原子力显微镜; 修饰; 多聚赖氨酸; 微通道

**中图分类号:** O656.9; Q61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)01-0080-03

## Comparison of Binding Capability between Substrates Modified by Silanized Reagent and Polylysine

ZHANG Zhi-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, ZHAO Hui<sup>2</sup>, LI Bin<sup>1</sup>, HU Jun<sup>1,3</sup>, LI Min-qian<sup>1</sup>

(1. Shanghai Institute of Applied Physics, CAS, Shanghai 201800, China; 2. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, CAS, Shanghai 200050, China; 3. Bio-X Life Science Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** The substrates modified by polylysine (polylysine-substrate), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS-substrate) and 3'-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS-substrate) were imaged by atomic force microscope; the microarrays, which were printed by microspotting device or microchannels on the modified substrates, were observed by fluorescence microscope. The data show that the roughness of surface modified by polylysine is higher than that modified by silanized reagents; also, the observations with fluorescence microscope show that the bounding capability of the polylysine-substrate is higher than that of the APTS-substrate and is six times as that of GOPS-substrate. The result indicates that the roughness and bounding capability are positively correlated.

**Key words:** Atomic force microscope; Modification; Polylysine; Microchannel

微流控芯片和生物芯片因其筛选高通量、体积微型化和便携化、功能集成化、分析快速等特点, 在生物学研究中得到广泛的应用, 促进了基因组学<sup>[1]</sup>和蛋白质组学<sup>[2]</sup>的研究。衬底的修饰是生物芯片制备工序中一道重要的环节, 对保持生物样品的活性、提高生物样品的有效结合率起着非常重要的作用。玻璃由于透光性好, 价格低廉, 广泛应用于生物芯片研究中。3-氨丙基三乙氧基硅烷(3'-aminopropyltrimethoxysilane (APTS))、3-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(3'-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS))和多聚赖氨酸(polylysine)是生物芯片衬底的常用修饰试剂。本文利用原子力显微镜观察修饰后的衬底表面形貌, 分析其表面上印刷的点阵以及通过微通道局部修饰所获得点阵的荧光强度, 为生物芯片衬底的修饰提供参考依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

原子力显微镜(DI, 美国), 荧光显微镜(NIKON, 日本), CCD(Princeton Instrument MicroMax, 美

收稿日期: 2005-02-03; 修回日期: 2005-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470441, 10335070)

作者简介: 张志祥(1974-), 男, 江苏东台人, 博士研究生; 李民乾, 联系人, Tel: 021-59554623, E-mail: liminqian@sinap.ac.cn

国), 点样仪( TeleChem International)。

APTS, GOPS, *L*-多聚赖氨酸, 乙醇, 4-*N,N*-二甲氨基吡啶(4-*N,N*-dimethylaminopyridine, DMAP), 6-生物素酰氨基己酸-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯购自 Sigma(美国)。Sylgard 184 聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)购自 Dow Corning(美国)。SU-8 胶购自 MicroChem(美国)。TeleChem's ArrayIt(tm) buffer 购自 TeleChem International(美国)。DNA 杂交液(50% formamide, 6 × standard SSC, 0.1% SDS, 5 × Denhardt and 100 μg/mL ferimine DNA)购自上海生工。DNA 探针(5'-Amino-ACG TGG CAT GCT GGC CAC CGG C)和其配对片断靶 DNA(5'-fluorescein isothiocyanate (FITC)-GCC GGT GGC CAG CAT GCC ACG T)由上海生工合成。硼玻璃载玻片购自 Scohtt(德国)。实验中所用水都经过 Millipore Q 处理过。其它试剂皆为分析纯。

## 1.2 衬底修饰<sup>[3]</sup>

APTS-衬底: 将硼玻璃载玻片浸入到含 1% ( $\varphi$ ) 的 APTS 水溶液中, 室温放置 10 min, 依次用乙醇、水、乙醇清洗, 氮气吹干, 110 °C 烘 40 min, 制得 APTS-衬底, 保存备用。

GOPS-衬底: 将硼玻璃载玻片浸入到含 10% 的 GOPS 乙醇水溶液(乙醇-水体积比 10:90)中, 室温放置 10 min, 依次用乙醇、水、乙醇清洗, 氮气吹干, 110 °C 烘 40 min, 制得 GOPS-衬底, 立即使用。

多聚赖氨酸-衬底: 将上面制得的 GOPS-衬底浸入到 *L*-多聚赖氨酸水溶液(*L*-多聚赖氨酸、DMAP、水的量分别为 1 mol、1 mol、2 000 mL)中, 室温放置 2 h, 水洗, 氮气吹干, 保存备用。

## 1.3 原子力显微镜观察

上面所制得的多聚赖氨酸-衬底、APTS-衬底和 GOPS-衬底在原子力显微镜的轻敲模式(Taping Mode)下成像。

## 1.4 点样与杂交

0.5 mg 6-生物素酰氨基己酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯溶解在 500 μL 1 × TeleChem's ArrayIt(tm) buffer 中。在多聚赖氨酸-衬底和 APTS-衬底上点样。点样点的直径 150 μm, 点间距 500 μm。37 °C 培养箱中保温 2 h, 乙醇洗, 氮气吹干。在点样区域加入 10 μL FITC-avidin BSA 溶液(FITC-avidin 与 BSA 体积比 1:250, BSA 溶液为 2% BSA, 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), 盖上盖玻片, 37 °C 避光放置 30 min。

## 1.5 微通道刻蚀和制备

微通道的设计与刻蚀过程同文献[4]。通过计算机辅助设计, 高分辨打印机打印出掩模, 将掩模与涂有 SU-8 胶的玻璃片直接接触, 紫外光曝光后, 溶剂洗脱除去未曝光部分, 获得用来浇注 PDMS 的模, 共含有 9 根微通道, 每根通道宽 180 μm, 通道间中心间距 300 μm。

将 PDMS 的单体和辅助剂以体积比 10:1 均匀混合, 抽真空除去液体里的气泡后, 倒入围有一圈透明胶带的模上, 70 °C 下加热 4 h。从模上剥离 PDMS, 得到含有通道的弹性硅橡胶。用 18 号注射针头对 PDMS 打孔, 可逆地覆盖到 GOPS-衬底, 从而制得含有通道的芯片。

## 1.6 微通道印刷微点阵

在微通道进口 1 加入多聚赖氨酸溶液, 进口 2、3 加入 DNA 探针溶液, 真空抽气, 使溶液充满通道, 室温放置 2 h, 抽干, 水洗, 再抽干。进口 1 加入 1,4-二(2,3-环氧丙氧)丁二醚溶液(1,4-二(2,3-环氧丙氧)丁二醚-DMF 体积比 1:100), 室温下反应 2 h, 水洗, 抽干后加入 DNA 探针溶液, 继续反应 2 h, 水洗, 抽干, 把 PDMS 从 GOPS-衬底剥离下来, 在与原来垂直的位置覆盖上 1 片新的 PDMS 弹性硅橡胶, 在进口 1、2 和 3 加入靶 DNA 溶液(33 μg 的靶 DNA 溶解于 10 mL DNA 杂交液中), 抽真空, 使溶液充满通道, 42 °C 保温 5 min, 然后用 DNA 杂交液 42 °C 下快速洗, 抽干, 将 PDMS 从衬底上剥离下来, 形成了 DNA 杂交微点阵(图 1), 再使用荧光显微镜观测。

## 2 结果与讨论

硅烷化试剂 APTS 和 GOPS 在衬底上自组装, 形成致密的单层膜, 表面平整; 由于多聚赖氨酸是多肽类分枝分子, 和 GOPS-衬底反应后, 表面粗糙。经 AFM 观测, 得到 APTS-衬底的表面粗糙度为 0.17

nm, GOPS-衬底的表面粗糙度为 0.16 nm, 而多聚赖氨酸-衬底的粗糙度为 0.25 nm, 说明其比表面积高于前两者, 使多聚赖氨酸结合探针分子的容量大于前者。

为了验证多聚赖氨酸-衬底结合分子容量高于 APTS-衬底, 我们在衬底上利用点样仪印刷生物素微点阵, 由于生物素特异地与亲和素结合, 后者专一地固定到生物素斑点上, 通过观测激发亲和素上标记的荧光素强度, 多聚赖氨酸-衬底微点阵的荧光强度高(图 2), 进一步证明了多聚赖氨酸-衬底的结合容量大。但由于点阵点在不同的玻片上, 玻片的规格以及成像条件等影响, 不能准确判断两者的结合容量。通过微通道, 在不同的位置上分别修饰上 GOPS 和多聚赖氨酸, 印刷微点阵, 降低了玻片的规格以及成像条件等对数据统计的影响。荧光显微镜观测的结果显示多聚赖氨酸修饰后的微点阵荧光强度高于 GOPS 修饰后的微点阵(图 3 A), 前者是后者的 6 倍(图 3 B)。再次论证了多聚赖氨酸的表面形貌决定其高结合容量的性质。

### 3 结 论

多聚赖氨酸是多肽类分枝分子, 其表面的氨基自由度高于硅烷化试剂上的活性基团; 由于多聚赖氨酸相对分子质量大, 在组装后使衬底表面变得更粗糙, 自由度高等原因使得多聚赖氨酸衬底的分子结合容量是 GOPS 衬底的分子结合容量 6 倍。这些结果表明, 多聚赖氨酸修饰的硼玻璃更适合用来作生物芯片的衬底。

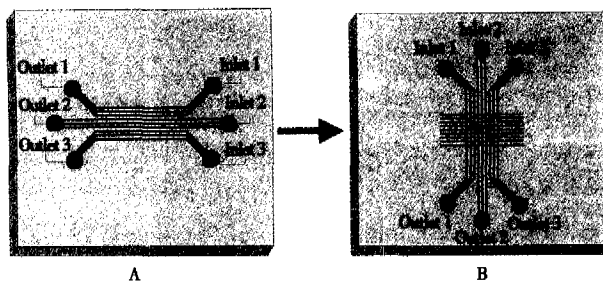


图 1 微通道在多聚赖氨酸和 GOPS 修饰的硼玻璃表面制备微点阵流程

Fig.1 Schematic diagram representing the fabrication methodology for DNA hybridization microarrays on the substrate modified by polylysine and GOPS  
A. The GOPS - substrate covered by PDMS replica containing a set of channels. Inlet 2 and inlet 3 filled with DNA probes; Inlet 1 filled with polylysine solution; the channels immobilized with DNA probes after activating polylysine, then following the formation of 1-D DNA line arrays; B. One PDMS replica uncovered from glass and a second PDMS replica attached to the surface perpendicular to the 1-D DNA line arrays to deliver DNA samples. After reeling off the second PDMS replica, the DNA microarrays were imaged by fluorescence microscope



图 2 在 APTS-衬底(A)和多聚赖氨酸-衬底(B)上印刷的微点阵的荧光像

Fig.2 Microarray imaged by fluorescence microscope on APTS-substrate(A) and polylysine - substrate(B)

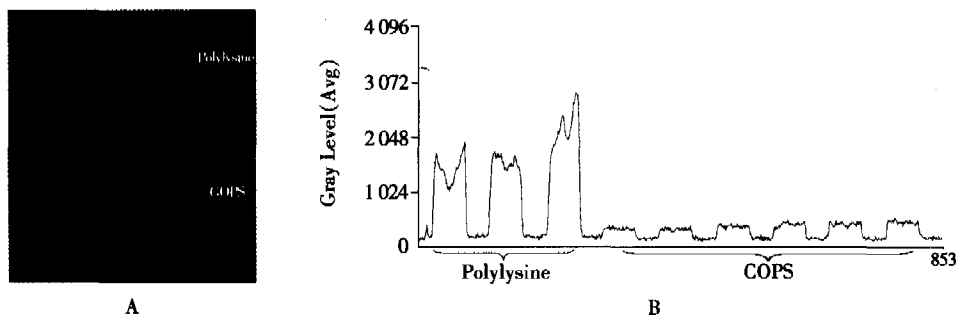


图 3 玻片上微点阵处分别修饰 GOPS 和多聚赖氨酸, 杂交后荧光成像以及强度比较

Fig.3 The fluorescence intensity of microarray spots modified by 3'-glycidoxypopyltri-methoxysilane (GOPS) and polylysine separately

A. the spots modified by polylysine on the top three rows; the spots modified by GOPS on the other rows; B. the fluorescence intensity of spots modified by polylysine(five times more than that modified by GOPS)

### 3 结 论

弱碱性背景电解质溶液有利于提取牡丹皮中的丹皮酚。在弱碱性的  $H_3BO_3$  - 三乙胺背景电解质体系中可实现牡丹皮中的丹皮酚的毛细管电泳分离和高频电导检测。本研究中所用的高频电导检测器, 操作极为简便, 只需将毛细管穿过检测器, 检测电极不与溶液接触, 不存在电极中毒的问题; 用毛细管电泳 - 高频电导检测法测定牡丹皮中的有效成分丹皮酚, 样品前处理简单易行, 方法简便、快速、灵敏、可靠、廉价, 结果满意, 是一种较好的检测方法。

#### 参考文献:

- [1] Editorial Committee of the Pharmacopoeia of PRC. The Annotation of Pharmacopoeia of PRC, Part I [M]. Beijing: Chemical Industry Press(中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社), 1995. 147.
- [2] Editorial Committee of the Pharmacopoeia of PRC. The Annotation of Pharmacopoeia of PRC, Part II [M]. Beijing: Chemical Industry Press(中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药典注释(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社), 1990. 256.
- [3] CHEN Zhen, HE Qun, ZHAO Biqing, *et al.* [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology(陈镇, 何群, 赵碧清, 等. [J]. 湖南中医药导报), 2002, 8(6): 303 - 304.
- [4] WANG Baoqi, PANG Zhigong, ZHANG Qing. [J]. Chinese Pharmaceutical Journal(汪宝琪, 庞志功, 张清. [J]. 中国药学杂志), 1994, 29(1): 35.
- [5] XIANG Yang, ZHANG Huiming, CHEN Peng. [J]. Chinese Traditional and Herbal Prugs(向阳, 张惠明, 陈鹏. [J]. 中草药), 2005, 27(6): 738 - 740.
- [6] XU Chunliang, WEI Huizhen, WANG Zhimin, *et al.* [J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine(徐春良, 魏惠珍, 王志敏, 等. [J]. 实用中西医结合临床), 2004, 4(6): 80.
- [7] ZHAO Xinfeng, SUN Yuqing. [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University(赵新峰, 孙毓庆. [J]. 沈阳药科大学学报), 2002, 19(1): 35 - 37, 55.
- [8] YANG Gengliang, SONG Xiurong, ZHANG Hongyi, *et al.* [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry(杨更亮, 宋秀荣, 张红医, 等. [J]. 分析化学), 1999, 27(1): 1 - 4.
- [9] WU H K, SHEU S J. [J]. J Chromatogr, A, 1996, 753(1): 139 - 146.
- [10] CHEN Zuanguang, MO Jinyuan. [J]. Chemical Journal of Chinese Universities(陈缙光, 莫金垣. [J]. 高等学校化学学报), 2002, 23(5): 801.
- [11] CHEN Zuanguang, MO Jinyuan, YANG Xiaoyun, *et al.* [J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231.

~~~~~  
(上接第 82 页)

#### 参考文献:

- [1] DAI J, ITO T, SUN L, *et al.* [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(43): 13026 - 13027.
- [2] ASTORGA - WELLS J, BERGMAN T, JORNVALL H. [J]. Anal Chem, 2004, 76(9): 2425 - 2429.
- [3] MÖLLER R, CSÁKI A, KÖHLER J M, *et al.* [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28: e91.
- [4] DERTINGER S K W, CHIU D T, JEON N L, *et al.* [J]. Anal Chem, 2001, 73(6): 1240 - 1246.