

生物芯片表面氨基硅烷化修饰

余良春¹ 陈 奇^{*,1,2} 郎美东³ 叶邦策⁴

(¹ 华东理工大学材料科学与工程学院, 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237)

(² 华东理工大学无机材料系, 上海 200237)

(³ 华东理工大学先进聚合物材料重点实验室, 上海 200237)

(⁴ 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

摘要: 本文以无水乙醇为溶剂、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)为修饰试剂、醋酸为催化剂, 采用浸泡法, 对生物芯片玻璃基片表面进行了氨基硅烷化修饰, 得到了一种基片表面氨基修饰的制备方法。着重研究了制备过程中浸泡时间、APTES 的浓度、酸处理的时间和羟基化的时间对基片噪声的影响。通过对以上工艺参数的逐步优化, 基片噪声逐渐减小, 最小值为 193。通过对最佳修饰条件下得到的基片进行 DNA 点样和杂交测试可知, 此方法制备得到的基片能够有效结合基因探针, 且杂交清洗后信号强度可达 17 000 以上, 信噪比在 110 以上。由 X 射线光电子能谱分析可知, 采用浸泡法可以获得表面氨基修饰的生物芯片基片。最后通过对修饰前后基片透过率的比较可知, 修饰过程对透过率影响很小, 且透过率在 91% 以上, 从而保证了后续杂交信号与微阵列噪声检测的准确性。

关键词: 生物芯片; 3-氨基丙基三乙氧基硅烷; 氨基修饰; 基片噪声

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2012)05-0953-06

Amino Silanization Modification of Biochip Surface

YU Liang-Chun¹ CHEN Qi^{*,1,2} LANG Mei-Dong³ YE Bang-Ce⁴

(¹Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering,
East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

(²Department of Inorganic Materials, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

(³Key Laboratory of Advanced Polymeric Materials, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

(⁴School of Biotechnology, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Biochips with amino groups on the substrate surface were prepared through a special immersion method using absolute ethanol as the solvent, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) as the modifying agent and acetic acid as the catalyst. The impacts of different process parameters in the preparation process on the substrate noise were mainly studied, including soaking time, APTES concentration, acid treatment time and hydroxylation time. Through stage-by-stage optimization of the process parameters above, the substrate noise decreased effectively, with the minimum value of 193 obtained. The results of the spotting test and hybridization test of the substrates pre-treated under the optimum modification condition show that the substrate prepared by this method could effectively connect the gene probe, with the hybridization signal intensity after cleaning up to 17 000 and the signal-to-noise ratio above 110. The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis indicates a successful integration of amino group onto the surface of biochip substrate after modification. It was found that the modification process had little effect on the transmittance of substrates, all kept above 91%, and thus ensured the accuracy of the hybridization signal and microarray noise detection followed.

Key words: biochip; 3-aminopropyltriethoxysilane; amino-modified; substrate noise

收稿日期: 2011-09-03。收修改稿日期: 2011-12-19。

上海市重点学科建设项目(No.B502)和重点实验室项目(No.08DZ2230500)资助。

*通讯联系人。E-mail: qichen@ecust.edu.cn

0 引言

生物芯片是一种芯片技术,其实质就是在基片表面上有序地点阵排列一系列已知的识别分子,使之与被测物质结合或反应,再以一定的方法进行显示和分析,最后得出被测物质的化学分子结构等信息^[1-2]。生物芯片应用十分广泛,可以应用于分子生物学、生物医学、药物的研究和开发等领域^[3-4]。与传统的检测方法相比,具有高通量、高信息量、快速、微型化、自动化、用途广等特点^[5-7]。

现今,生物芯片逐渐在很多行业得到应用,为了提高生物芯片的性能,各方面的研究也逐步开展起来,如信号检测方法^[8],基片表面修饰的研究^[9-12],标记物的选择^[13],芯片制作过程参数优化^[14-16],芯片表面化学^[17-19],还有探针的固定^[20,21]等。在生物、医学和材料学科的交叉点上开发新材料是现今研究的一个热点,但由于受到各学科各自的局限性,目前生物芯片的研制仍存在许多问题,主要包括表面修饰基团嫁接困难、样品制备和待测定靶标探针标记方法复杂、重复性差、没有统一的标准、信号检测的灵敏度不够等^[22-24]。目前市场上的生物芯片价格一直居高不下,也对生物芯片的推广使用造成了极大的阻碍。

高质量的芯片要求其表面能够简易且成功的嫁接合适基团,这就需要对表面修饰工艺进行优化,在满足使用要求的前提下,需尽可能的简化制备工艺和降低制作成本。本文采用常见的3-氨基丙基三乙氧基硅烷作为表面氨基修饰试剂,用无水乙醇和醋酸作反应溶剂和催化剂,采用简单的浸泡法制备得到表面氨基修饰的基因芯片。通过对羟基化、酸处理和浸泡三步中的实验工艺参数进行优化,确定了最佳制备工艺条件,获得了性能优异的表面氨基修饰的生物芯片。基于缩短实验时间的考虑,按照所用时间的长短依次对实验过程参量进行优化。对于每个实验结果,都严格按照实验条件进行了至少5次以上的重复实验,从而保证了试验结果的准确性。

1 实验部分

1.1 氨基修饰芯片的制备

首先,把洗净后的玻璃基片浸没在70℃的盛有浓硫酸和双氧水的混合溶液(体积比为1:1)的烧杯中,恒温1~5 h进行羟基化处理。然后立即洗净、

烘干,浸没在体积比为1:1的浓盐酸和无水乙醇的混合溶液中进行酸处理,处理温度为37℃,处理时间为1~24 h不等;结束洗净烘干后,再浸没在50℃的3-氨基丙基三乙氧基硅烷的无水乙醇溶液中进行氨基修饰,加入2~3滴醋酸作催化剂,其中APTES的浓度范围为0.2~1.0 mol·L⁻¹,浸泡时间为0.5~7 d。之后依次用工业乙醇和去离子水各清洗至少5 min,放入120℃烘箱烘干,即可得到表面氨基修饰的生物芯片。制备好的芯片要放在冰箱中保存备用。

1.2 点样和杂交

室温下,将等量的寡聚核苷酸与50% DMSO(二甲基亚砜)/50% H₂O混合成浓度为20 μmol·L⁻¹的寡聚核苷酸探针。启动点阵仪,湿度控制在40%~50%,温度控制在20~25℃。每张基片上点阵4个5×5阵列。点阵完成后,放入扫描仪中进行初次扫描,读取基片噪声。之后对基片进行紫外交联,交联仪能量值为9000~0。然后用清洗液1(2×SSC(柠檬酸钠缓冲液)+0.2% SDS(十二烷基磺酸钠缓冲液))和清洗液2(1×SSC)依次清洗基片,每种清洗液清洗至少5 min。用离心法(200×g,5 min)干燥芯片(大约10 s),之后进行二次扫描。然后通过移液枪向玻片上加入50 μL事先准备好的杂交液。放好盖玻片,将芯片转移到100%湿度(含有去离子水)的增湿杂交仪中,并加入一定量的甲酰胺作为润湿剂。将增湿杂交仪放入热水恒温水槽中,42℃孵育16 h。结束后依次用清洗液1和2进行清洗,之后用扫描仪进行第三次扫描,读取背景噪声和信号强度。

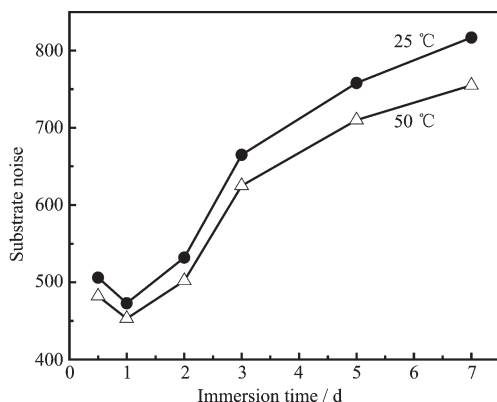
1.3 样品表征

采用Genpix扫描仪测量样品的基片噪声、背景噪声和结合信号强度;采用S53/54型紫外可见分光光度计测量修饰基片的可见光透过率;采用PHI 5000C ESCA System型X射线光电子能谱仪采集修饰基片表面的全扫描谱和窄扫描谱。

2 结果与讨论

图1为不同温度下浸泡时间对基片噪声的影响。从图中可以看出,在25℃和50℃下,基片噪声都是随着浸泡时间的延长先减小后增大;且经过相同浸泡时间后,50℃下处理的基片噪声都比25℃下处理的基片噪声要低。在两种温度下,浸泡时间为1 d时,基片噪声都分别出现最小值。这是由于此时APTES与羟基化基片表面反应后所产生的非有

用信号最小;随着浸泡时间的增加,基片噪声急剧上升,说明浸泡时间越久,反应产生的非有用信号越多。在相同浸泡时间下,50℃比25℃浸泡下产生的浸泡噪声更低,这是由于在一定温度范围内,温度升高,可以减少非有用信号的产生,从而降低了基片噪声。而当浸泡温度超过50℃时,扫描噪声时发现玻片表面不均匀。因此本工作中选取50℃作为浸泡处理温度。

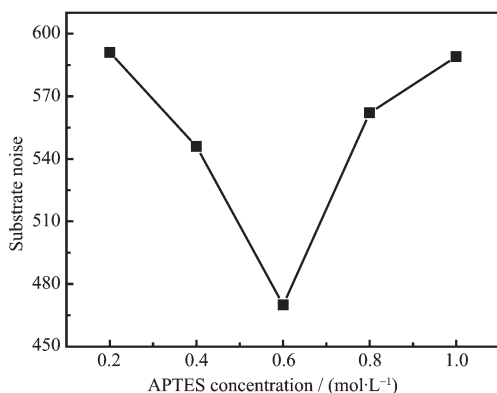


Hydroxylation time: 3 h; Acid treatment time: 24 h; APTES concentration: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图1 不同温度下浸泡时间对基片噪声的影响

Fig.1 Influence of immersion time on substrate noise at different temperatures

基片噪声是微阵列噪声的一个主要噪声来源,主要是因为基片材料本身或者对基片的表面包被和处理不当产生的非有用信号引起的。除了修饰过程中的浸泡时间外,修饰试剂的浓度也会对基片噪声产生较大影响。图2则为不同浓度APTES修饰对基片噪声的影响。从图中可以看出,随着APTES



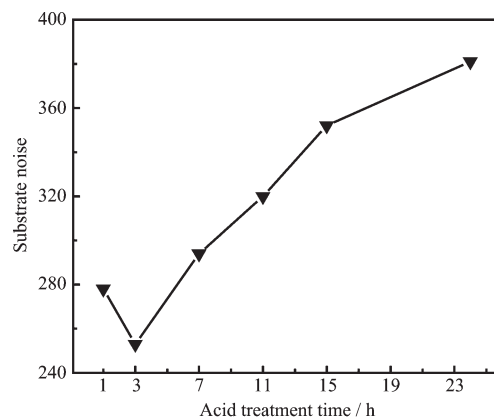
Hydroxylation time: 3 h; Acid treatment time: 24 h; Immersion time: 1 d

图2 不同浓度APTES修饰对基片噪声的影响

Fig.2 Influence of APTES concentration on substrate noise

的浓度在 $0.2 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间变化,基片噪声先减小后增大,当APTES浓度为 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,由于成膜质量较好,因此基片噪声最小。

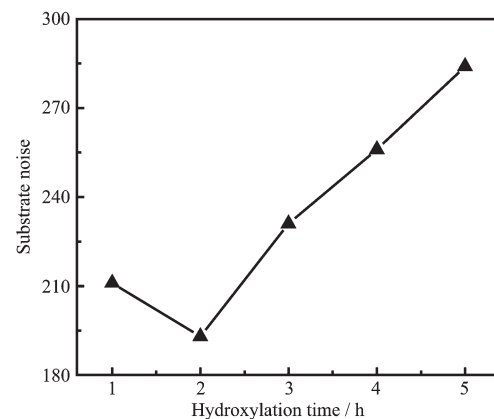
图3是不同酸处理时间对基片噪声的影响。从图中可以看出,随着处理时间的增加,基片噪声先减小后增大,在处理时间为3 h时达到最小值。这是由于酸处理时间过小或过长产生的非信息信号过多,导致基片噪声的增加。图4是不同羟基化处理时间对基片噪声的影响。从图中可以看出,随着处理时间的延长,基片噪声先减小后增大,在2 h时达到最小值。若增加硫酸的比例,溶液的氧化性就会增强,虽然有利于表面羟基的产生,但是却容易产生更多的非有用信号,增加了基片噪声,不利于芯片检测能力的发挥。试验中发现羟基化溶液使用了



Hydroxylation time: 3 h; APTES concentration: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Immersion time: 1 d

图3 酸处理的时间对基片噪声的影响

Fig.3 Influence of acid treatment time in H_2SO_4 on substrate noise



Acid treatment time: 3 h; APTES concentration: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Immersion time: 1 d

图4 羟基化时间对基片噪声的影响

Fig.4 Influence of hydroxylation time on substrate noise

一定次数后,对基片的修饰效果会明显下降,点阵效果不佳。这是由于多次使用的羟基化溶液中的硫酸会被慢慢消耗,氧化能力会减弱,导致基片表面羟基化不足。所以每隔一段时间要重新配置羟基化溶液,替换氧化能力下降的旧溶液,这样才能够保证羟基化的充分进行。通过对工艺参数的优化,得到了较佳的修饰条件:羟基化时间 2 h;酸处理时间 3 h;浸泡液中 APTES 浓度 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,时间为 1 d,温度为 50°C 。

图 5 为修饰后表面的 XPS 全扫描测量谱。从图中可以看出,修饰后基片表面含有 Si、C、N 和 O 4 种元素,且其含量分别为 24.1%、19.1%、1.1%和 55.7%。由于基片本身不含 N 元素,在整个实验处理过程中,含有 N 元素的只会来自于浸泡溶液中的 APTES,说明此浸泡法可以把 APTES 修饰到基片表面。APTES 修饰基片表面的主要过程是:存在于玻璃表面的羟基中的孤对电子作为亲核试剂进攻 APTES 中正电性的硅原子,放出甲醇,在羟基与硅原子之间形成 Si-O-Si 共价键,形成具有反应活性的氨基基团表面。

为了更加详细地分析基片修饰后表面成分的变化情况,在对修饰基片表面进行了 XPS 宽谱扫描后,对其中的 C1s 和 Si2p 峰进行了精细扫描(图 6),以得到其各个状态的变化情况。对精细扫描后的 C1s 和 Si2p 峰进行了分峰拟合^[25-27],其中 C 有 4 种键合结构,即 C-Si、C-C、C-N 和 C-O,出峰位置分别是 282.7、284.6、287.1 和 285.8 eV。其中 C-N 键含量占 C 元素总量的 20.89%,说明修饰基片表面含有

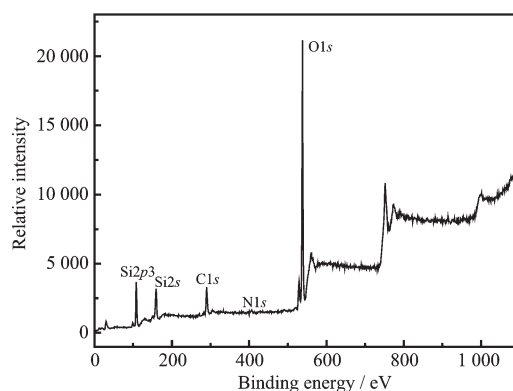


图 5 最佳修饰条件下基片表面的 XPS 全扫描测量谱
Fig.5 XPS survey scan spectra of the modified substrate surface treated in optimum modification condition

大量的 APTES,也进一步证明了修饰方法的有效性;Si 元素有 3 种键合结构,即 Si-O-Si、Si-OH 和 Si-O-C,出峰位置分别是 100.8、102.8 和 103.7 eV。其中含有大量的 Si-OH 键,说明基片与 APTES 反应后,表面依然存在过量的羟基,即表面有足够的羟基与 APTES 反应,从而保证了修饰的效率。

为了检测芯片表面经 APTES 修饰后的效果,对最佳条件下修饰的芯片进行了 DNA 点样杂交测试。图 7 是修饰芯片依次经点样、紫外交联和杂交后的样图。从图中可以看出,修饰芯片经过每一步测试清洗后,表面干净,样点清晰,大小比较均一。表 1 列出修饰芯片先后经点样、紫外交联和杂交后的平均点信号强度、平均微阵列噪声和信噪比的大小。修饰芯片经处理后,特别是杂交后,信号强度高,微阵列噪声只有 154,信噪比在 110 以

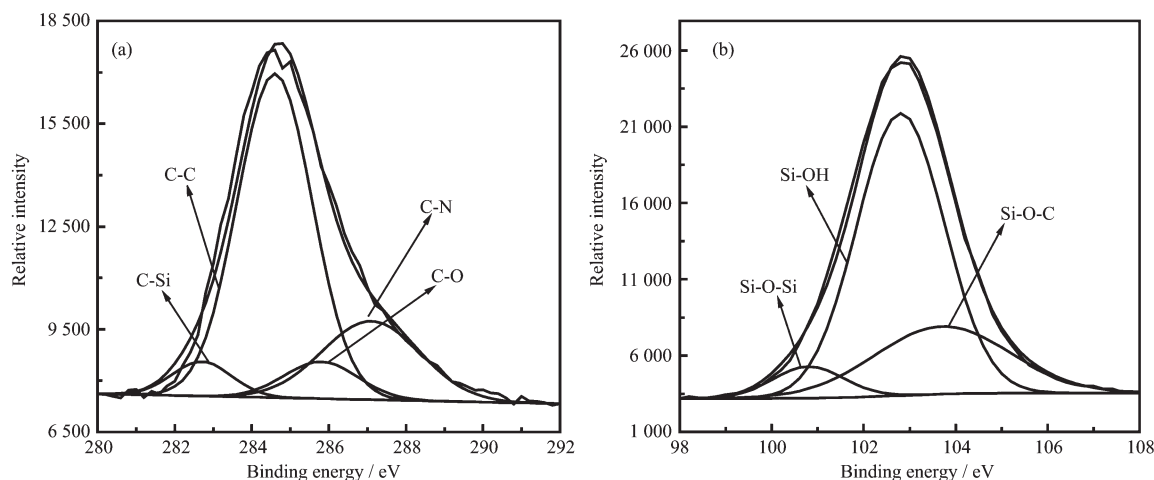


图 6 修饰基片表面 C1s (a) 和 Si2p (b) 的 XPS 谱分峰拟合曲线

Fig.6 Spectra of the modified substrate surface into multiple sub-peaks of C1s (a) and Si2p (b) contained in different functional groups using Gaussian-Lorentzian fit

上,这反应了修饰芯片有着有效的检测能力。信噪比是微阵列检测过程中信号和噪声的比值,它的大小反应了微阵列的检测能力,信噪比越大,微阵列的检测能力越强。本工作通过浸泡法修饰基片表面,经羟基化、酸处理和修饰浸泡逐步降低基片噪声,提高了信噪比,增加了微阵列芯片的检测能力。

为了进一步说明修饰的效果,对最佳修饰条件

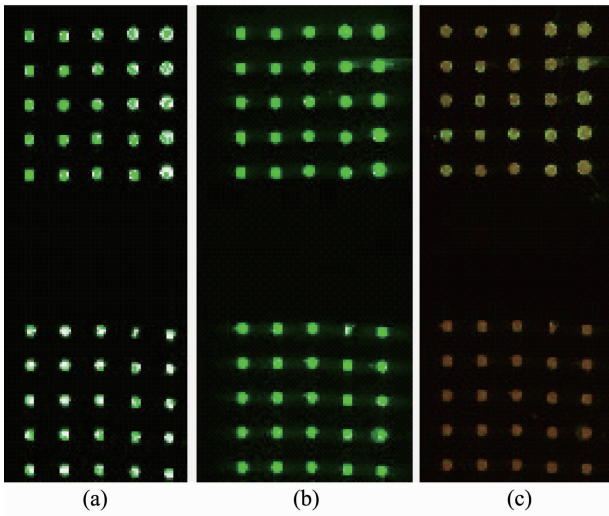


图 7 修饰基片先后经点样(a)、紫外交联(b)和杂交(c)后的样图

Fig.7 Pictures of the modified substrates after spotting (a), UV cross-linking (b), and hybridizing (c) successively

表 1 修饰芯片先后经点样、紫外交联和杂交后的信号强度、噪声和信噪比

Table 1 Signal intensity, background noise and signal-to-noise ratio of the modified chip after spotting, UV cross-linking and hybridizing successively			
Figure	Average signal intensity	Average back ground noise	Signal-to-noise ratio
(a)	61 808	483	128
(b)	39 448	303	130
(c)	17 656	154	115

下得到的芯片与肖特芯片、国内市场上普通芯片进行了点样杂交对比试验。肖特芯片和国内芯片的样品表面都是氨基修饰的。表 2 是点样杂交后 3 种氨基修饰芯片的平均点信号强度、平均微阵列噪声和信噪比之间的比较。从表中可以看出,对于平均点信号强度,修饰芯片稍低于肖特芯片,二者均高于国内芯片;对于平均微阵列噪声,修饰芯片和肖特芯片相接近,也均比国内芯片要低;对于信噪比,修

饰芯片和肖特芯片差不多,都在 110 以上,而国内芯片信噪比就比较低。通过对比试验可知,修饰芯片的性能已达到国外肖特芯片的水平,远远优于国内芯片。

由于在基片噪声和结合信号强度的检测过程

表 2 修饰芯片与肖特芯片、国内芯片点阵杂交后信号强度、噪声和信噪比之间的比较

Table 2 Comparison of the signal intensity, background noise and signal-to-noise ratio among the modified chip, schott chip and domestic chip			
Sample	Average signal intensity	Average back ground noise	Signal-to-noise ratio
Modified chip	17 656	154	115
Schott chip	18 294	158	116
Domestic chip	15 379	185	83

中,经常会使用一定波长的激光和发射光,所以要求基片材料在激发光区要有足够的透明度来保证其在检测过程中受到光激发时相对的“光学惰性”。多数优质的基片在可见光区的透过率都在 90% 以上^[28]。图 8 是修饰后的基片与空白基片的透过率比较示意图。从图中可以看出,修饰过的基片与空白基片相比,透过率只下降了 1% 左右,且都在 91% 以上,说明修饰过程对基片的透过率基本没有影响,从而保证了后续基片噪声和点样杂交信号检测的准确性。

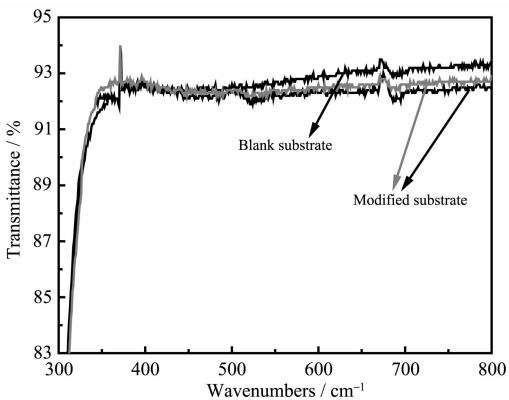


图 8 最佳修饰条件下基片与空白基片透过率的比较
Fig.8 Comparison of the transmittance between blank substrate and modified substrate treated in optimum modification condition

3 结 论

(1) 用 APTES 作修饰试剂,采用浸泡法,经羟基

化、酸处理和修饰浸泡三步,制备了氨基修饰表面的生物芯片。经试验优化,最佳修饰条件为:羟基化时间为 2 h;酸处理时间为 3 h;浸泡液中 APTES 浓度为 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,时间为 1 d,温度为 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$;且该条件下基片噪声最低为 193。

(2) 经 X 射线光电子能谱测试可知,APTES 经浸泡法可以修饰到了基片表面;经点样杂交测试可知,基片表面结合探针的信号可高达 17 000 以上,微阵列噪声在 160 以下,信噪比在 110 以上;经杂交点样对比可知,修饰方法效果显著;经透过率测试可知,修饰芯片信号和噪声的检测结果准确可信。

参考文献:

- [1] Pasquarelli A. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S*, **2008**,**28**:495-508
- [2] Campas M, katakis I. *Trends Anal. Chem.*, **2004**,**23**:49-62
- [3] Bryant P A, Venter D, Robins-Browne R, et al. *Lancet*, **2004**,**4**:100-111
- [4] Mc Guire A L, Cho M K, McGuire S E. *Science*, **2007**,**317**:1687
- [5] FAN Jun-Ping(范金坪). *Chin. J. Med. Phys.(Zhongguo Yixue Wulixue Zazhi)*, **2009**,**26**(2):1115-1117
- [6] WU Ming-Yu(吴明煜), GUO Xiao-Hong(郭晓红), WANG Wan-Xian(王万贤), et al. *Sci. Technol. Eng.(Kexue Jishu Yu Gongchong)*, **2005**,**5**(7):421-426
- [7] XIAO Shou-Jun(肖守军), CHEN Ling(陈凌), XU Ning(徐宁). *Prog. Chem.(Huaxue Jinzhan)*, **2009**,**21**(11):2397-2410
- [8] WANG Gang(王刚), YAN Feng(颜峰), TENG Zhao-Gang(滕兆刚), et al. *Prog. Chem.(Huaxue Jinzhan)*, **2006**,**18**(2):239-245
- [9] LI De-Liang(李德亮), WANG Jun(王军), CHANG Zhi-Xian(常志显), et al. *Prog. Chem.(Huaxue Jinzhan)*, **2008**,**20**(7):1115-1121
- [10] WU Qing-Hua(吴清华), MA Wen-Li(马文丽), WANG Hong-Min(王洪敏), et al. *J. First Mil. Med. Univ.(Diyi Junyi Daxue Xuebao)*, **2005**,**25**(7):794-798
- [11] GAO Ya-Nan(高雅男), TAO Zhong-Wei(陶忠伟), XU Zhen(徐政). *Shanghai J. Biomed. Eng.(Shanghai Shengwu Yixue Gongcheng)*, **2005**,**26**(1):42-47
- [12] Lina C S, Chen Y C, Tang M C, et al. *Optik*, **2008**,**119**:485-491
- [13] Choithani J, Goel M, Sharma A K, et al. *Anal. Biochem.*, **2006**,**355**:313-315
- [14] Thierry B, Jasieniak M, Smet L C, et al. *Langmuir*, **2008**,**24**:10187-10195
- [15] Bhalla V, Carrara S, Stagni C, et al. *Thin Solid Films*, **2010**,**518**:3360-3366
- [16] McQuain M K, Seale K, Peek J, et al. *Anal. Biochem.*, **2003**,**320**:281-291
- [17] Sauer U, Bodrossy L, Preininger C. *Anal. Chim. Acta*, **2009**,**632**:240-246
- [18] Oillac C, Mur P, Blanquet E, et al. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S*, **2007**,**27**:1500-1503
- [19] Wong A K, Krull U J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**,**383**:187-200
- [20] Chiu S K, Hsu M, Ku W C, et al. *Biochem. J.*, **2003**,**374**:625-632
- [21] Zhang F X, Srinivasan M P. *Langmuir*, **2004**,**20**:2309-2314
- [22] Niu C, Wang Y L, Yue J J, et al. *Lett. Biotechnol.*, **2009**,**20**(4):594-597
- [23] McQuain M K, Seale K, Peek J, et al. *Anal. Biochem.*, **2003**,**320**:281-291
- [24] ZHANG Tian-Hao(张天浩), ZHANG Chun-Ping(张春平), ZHANG Guang-Yin(张光寅), et al. *Prog. Biotechnol.(Shengwu Gongcheng Jinzhan)*, **2000**,**20**(2):64-68
- [25] Singh P, Shivaprasad S M, Lal M, et al. *Sol. Energ. Mat. Sol. C*, **2009**,**93**:19-24
- [26] Mishra A K, Chattopadhyay D K, Sreedhar B, et al. *Prog. Org. Coat.*, **2006**,**55**:231-243
- [27] Baer D R, Engelhard M H. *J. Electron. Spectrosc.*, **2010**,**178**:415-432
- [28] Schena M, Translated by ZHANG Liang(张亮), et al. *Microarray Analysis(生物芯片分析)*. Beijing: Science Press, **2004**:97