

基于 SPE 法的新型 DNA 提取微芯片的制作和研究

陈 翔 崔大付* 王 利 赵 强

(中国科学院电子学研究所 传感器技术国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 在生物医学和临床诊断中, DNA 提取是关键步骤。随着生物分析仪器的小型化和芯片化, 有必要制作 DNA 提取芯片。固相提取法(Solid-Phase Extraction, SPE 法) 是近年来实验室常用的 DNA 提取方法, 其操作简单, 时间消耗少, 但是基于 SPE 法制作的微芯片报道较少。利用硅微加工工艺制作 DNA 提取芯片, 并使用 SPE 法进行 PCR 产物中 DNA 提取实验及大肠杆菌培养液中 DNA 的提取实验。此芯片可以在半个小时内完成 DNA 的提取, 易于和别的芯片(如 PCR 芯片等) 整合, 具有很好的发展前景。

关键词 SPE, 微芯片, DNA 提取, 硅微加工工艺(MEMS)

中图分类号: Q939.3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004) 02-0251-04

随着微机械加工技术和 IC 工艺的发展, 生物医学和临床诊断上的仪器以及分析方法的小型化引起人们极大的关注。由于体积的减小, 减少了试剂的消耗, 缩短了反应的时间, 同时使高通量, 大规模的检测成为可能。因此, 近几年来, 关于这方面的研究越来越多, 尤其是基于微机械加工的生物芯片得到了迅速发展。在 DNA 分析和疾病检测中, 常常需要进行 DNA 提取、DNA 扩增和 DNA 分离检测等步骤。目前, DNA 扩增芯片和 DNA 电泳分离芯片的研究比较多^[1]。而 DNA 提取芯片研究较少, 不利于生物芯片的集成化和自动化, 因此有必要进行 DNA 提取芯片的研究。

目前 DNA 提取芯片采取的方法有: 超声波法^[2-4], 热法^[5], 介电泳法等, 这些方法各有优缺点。近年来 SPE 法引起了人们的关注。SPE 法是利用一些固体物质的表面, 如硅表面、玻璃、离子交换树脂或者经过修饰的磁珠等特异的吸附 DNA^[6-13]。这种方法的好处是 DNA 的降解较少, 结合使用蛋白变性剂和 RNA 降解试剂, 可以使 DNA 的纯度和产量得到提高。且 SPE 法操作步骤较少, 可以适应不同的样本。目前利用 SPE 法制作芯片进行 DNA 提取的报道较少, 较早利用 SPE 法制作芯片的如 Tian 等^[14]制作的样品制备芯片, 将硅微珠放置在毛细管内, 提取 DNA 整个过程时间为 30min; Wolfe^[15]改进此方法, 将硅微珠固定在溶胶的微沟道内, 能在 25min 内完成提取纳克级的 DNA。Christel 等^[16]利用深刻蚀技术在硅片上刻出许多小柱, 利用此结构捕获 DNA。这些方法或是将硅微珠固定在芯片内, 或是采用深刻蚀技术, 方法都较繁琐。

本文采用硅微加工工艺制作微流体型的 DNA 固相提取芯片, 此方法微加工的工艺较简单, 且易于和别的芯片集成。本文利用 SPE 法使用此芯片进行 PCR 产物中 DNA 提取实验

及大肠杆菌培养液中 DNA 的提取实验, 并对不同浓度的试剂对实验的影响以及捕获效率等进行了初步的探索。

1 材料和方法

1.1 材料

盐酸胍(Guanidine hydrochloride, GuHCl), Tris 试剂购自华美生物工程公司; KOH、异丙醇、HCl 和负性胶 BN303 购自北京化学试剂有限公司; 硅片为国产双面抛光硅片; SYBR-Green-I 核酸荧光染料购自 BioWhittaker Molecular Applications (Rockland, Me U.S.A)。实验所用荧光显微镜为 Olympus BX-51; PMT(光电倍增管, Photo Multiplier Tube) 购自北京滨松公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 及 PCR 产物由动物所提供; PCR 产物为 β -actin 基因扩增产物, 产物为单一带, 扩增产物长度约为 1kb。

1.2 芯片设计和制作

芯片设计版图如图 1 所示。沟道宽度为 200 μ m, 芯片为 2cm \times 1cm。芯片制作: 硅片清洗, 生长氮化硅作为掩膜, 用负性光刻胶 BN303, Karluss MA4 型光刻机上曝光后显影。在等离子刻蚀机上用 SF₆ 打掉氮化硅, 各相异性腐蚀液腐蚀沟道深度至 120 μ m。生长氧化硅, 然后等离子刻蚀机上用 SF₆ 打掉氮化硅, 键合玻璃上与芯片进样池和出样池相对应的地方打孔, 硅片和玻璃进行键合。芯片进样池接蠕动泵以导入样品。

1.3 实验过程

1.3.1 PCR 产物回收 (1) 芯片清洗: 芯片在使用前注入硝酸, 室温放置 5min 后用 TE 溶液清洗沟道 3 次。(2) DNA 样品吸附: DNA 样品取 1 μ L, 加入 20 μ L 6mol/L GuHCl, 混合均匀后从进样池导入到芯片中, 控制流速在 2 μ L/min, 在废液池收集 5 μ L 回收液, 设为样品 1。(3) 芯片清洗: 从进样池注入

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(69936010, 20299030)

* 通讯作者。Tel 86-10-62554503; Fax 86-10-62636165; E-mail: dlcui@mail.ie.ac.cn

作者简介: 陈翔(1974 -) 男, 湖北人, 博士, 研究方向为微流体生物芯片和医学诊断芯片。E-mail: chenxiang@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2003-05-08, 修回日期: 2003-12-04

80% 异丙醇清洗沟道 , 流速约为 5 μ L/min , 时间为 3min。在废液池收集 5 μ L 回收液 , 设为样品 2。(4)DNA 洗脱 : 加入 5 μ L TE , 室温放置 10min , 收集回收液 , 设为样品 3。继续加入 TE , 连续流动 , 在废液池连续收集 5 μ L 回收液 , 分别设为样品 4 , 样品 5。(5)结果检测 : 收集的样品加入 1 μ L SYBR Green I (1:1000) 在荧光显微镜下观察结果 , 结果分别用 CCD 和光电倍增管 (PMT) 读出。为消除非特异性信号的影响 , 在 PMT 实验中 , 每个样品的 PMT 原始数据减去阴性对照的读数所得的值为该样品的最终 PMT 值。阴性对照为 5 μ L ddH₂O 溶液加入 1 μ L SYBR Green I。

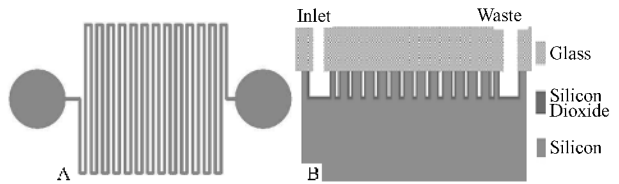


图 1 芯片版图设计示意图

Fig.1 Layout of the chip
A. Top view; B. Cross section.

1.3.2 大肠杆菌培养液 DNA 提取 芯片清洗步骤与 PCR 样品回收实验相同。 *E. coli* DH5 α 接种 , 摇床培养过夜。菌液取 20 μ L 加入到 50 μ L 吸附缓冲液中 (6mol/L GuHCl 4% Triton X-100) , 缓慢导入到芯片中 , 使流速在 2 μ L/min , 收集回收液 , 为样品 1。杂质洗脱 : 从进样池注入 80% 异丙醇清洗沟道 , 流速约为 5 μ L/min , 时间为 5min。在废液池收集 5 μ L 回收液 , 设为样品 2。DNA 洗脱 : 加入 5 μ L TE , 室温放置 10min , 收集回收液 , 设为样品 3。继续加入 TE , 连续流动 , 在废液池连续收集 5 μ L 回收液 , 分别设为样品 4、样品 5。结果检测 : PMT 下观察结果 , 观察方法与 PCR 样品回收实验相同。

2 结果和讨论

DNA 在高盐浓度下可以通过吸附作用吸附在二氧化硅或玻璃等的表面上 , 其机理推测是由于在高离子强度下 , 会减少硅固体表面的负性电荷 , 因此减少了二氧化硅表面和带负电荷的 DNA 的相互排斥作用 , 同时在高盐浓度下 , 盐会和水结合而减少 DNA 和水结合的可能性 , 促使 DNA 吸附在二氧化硅表面上。

在 DNA 的检测中 , 我们采用 SYBR - green I 进行荧光标记检测 , SYBR - green I 是一种荧光染料 , 当有 DNA 双链存在时 , 它会掺入到 DNA 双链中 , 发出荧光 , 强度远远大于没有 DNA 双链存在时的状态。所以可以用来进行 DNA 双链的标记检测。

2.1 芯片制作

芯片制作采用 MMES 工艺 , 尺寸为 2cm \times 1cm , 如图 2-A 所示 , 沟道使用湿法腐蚀制得 , 芯片沟道宽度为 200 μ m , 腐蚀深度为 150 μ m , 如图 2-B 所示。增加腐蚀深度会增加吸附表面积 , 有利于 DNA 的提取 , 但是由于沟道的宽度限制 , 湿法腐蚀工艺无法腐蚀更深。

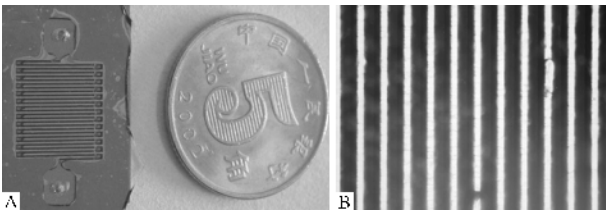


图 2 硅微 DNA 提取芯片

Fig.2 DNA Purification Chip
A. Schematic of the chip; B. Structure of the channel under the microscope.

2.2 PCR 产物中的 DNA 提取实验

从 CCD 和 PMT 结果都可以看出 , DNA 回收液 1 信号很弱 , 说明在第一步的吸附反应中 , DNA 基本上吸附在芯片内 , 回收液 2 是异丙醇洗液的回收液 , 信号也很弱 , 说明洗脱的过程并未洗下 DNA , 回收液 3 到回收液 5 是连续收集的 DNA 再溶解过程中的回收液 , 从结果可看出 , 回收液 3 的 DNA 含量最高 , 而回收液 4 和回收液 5 则逐步减小 , 说明在 PCR 产物回收实验中 , DNA 在第一次溶解时达到最大 , 其后则逐步减少。在实验过程中 , 我们也实验了表面未经氧化的硅芯片对 DNA 的吸附 (此处结果未列) 结果发现 , 吸附量基本没有 , 而且由于硅表面的疏水性质 , 样品很难进入到芯片内。这说明在芯片吸附过程中 , 二氧化硅的表面更容易吸附 DNA。

2.3 DNA 的提取

在酵母菌提取 DNA 实验中 , 所使用的提取缓冲液和 PCR 产物回收实验不太一样 , 主要是增加了 Triton X-100 , 主要的功能是破碎细胞 , 使 DNA 释放出来 , 虽然加入 SDS 等试剂可以增强破细胞的能力 , 但是有报道 SDS 的存在会影响后续的 PCR 反应 , 所以在本实验中并未采取 SDS。

使用 PMT 分别对菌液提取实验中的样品 1 ~ 样品 5 进行分析 (图 3) 。从图中我们可以看出 : 菌液提取的结果和 PCR 产物回收实验的结果有些不同。在菌液提取结果中 , 样品 1 也有微弱荧光 , 这说明样品 1 中可能含有少量核酸。这可能是因为菌液的成分比较复杂 , 当使用 Triton X-100 破碎细胞时 , 溶液中的成分比较复杂 , 一些成分如蛋白等会影响 DNA 的吸附 , 因此有少量的 DNA 并未吸附而是随液体流出 ; 另一个可能的原因是核酸如 RNA 等都释放出来 , 但并不吸附在硅表面 , 而 RNA 在 SYBR Green I 下也可以发出微弱的荧光。DNA 的解吸附在样品 3 时并未达到最大 , 说明在复杂菌液的 DNA 提取中 , 成分比较复杂 , 清洗可能不太干净 , 这影

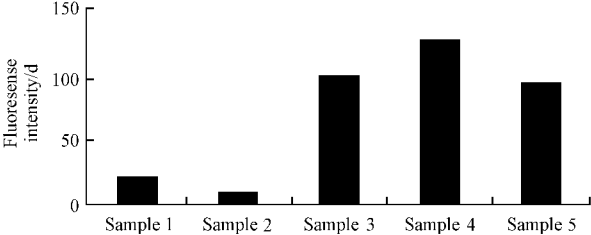


图 3 菌液提取结果

Fig.3 Results of DNA purification from *E. coli*
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

响了样品 3 中 DNA 的解吸附,而在样品 4 时才达到最大。

2.4 不同浓度的 GuHCl 对 DNA 吸附的影响

在 PCR 产物回收实验过程中,我们也检测了不同浓度的盐酸胍(GuHCl)对吸附结果的影响(图 4)。实验结果表明,当 GuHCl 在溶液中浓度低于 5mol/L 时,DNA 的吸附量很小,而当 GuHCl 浓度为 5mol/L 以上时,DNA 吸附量增加,当 GuHCl 浓度高于 6mol/L 时没有明显的上升,推测是因为盐和水结合而减少 DNA 和水结合的可能性,促使 DNA 吸附在二氧化硅的表面。当 GuHCl 浓度较小时,结合 DNA 水溶液中的自由水分子数目较少,所以吸附效果较差;而当 GuHCl 增加时,随着结合水数目的增加,造成吸附量的增加。而当增加到一定程度,可以结合的水分子已达到饱和,所以吸附量没有增加。而当 GuHCl 浓度高于 6mol/L 时,会带来芯片清洗等实验操作上的困难,所以在实验中,我们采用 6mol/L 的 GuHCl 进行 DNA 吸附。

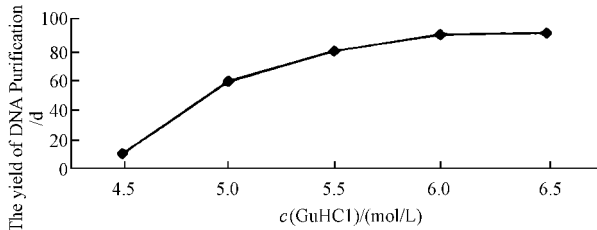


图 4 不同 GuHCl 浓度下 DNA 吸附量

Fig.4 Influence of GuHCl concentrations on the effectivity of DNA purification

2.5 DNA 吸附量的初步估计

在 PCR 产物回收实验过程中,对 PCR 产物回收率进行了初步的估计(图 5)。样品在进样前,用 PMT 检测其荧光强度约为 230,而实验中回收液 3 的荧光强度为 89,约为 38%。加上后续溶解的回收液,则可估略芯片吸附 DNA 的效率约在 61%。

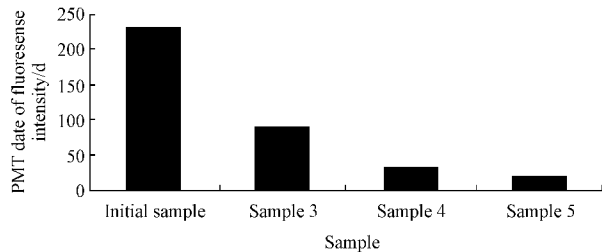


图 5 DNA 吸附量的比较

Fig.5 The DNA amount of initial DNA sample versus sample 3 ~ 5

3 结论

芯片上进行 DNA 的捕获有着重要的意义,根据 SPE 法的原理,我们采取硅微机械加工的方法制作微芯片,并进行了初步的生物学实验,整个实验所需的样品量都是微升级,同常规的实验过程相比,整个实验消耗时间短(0.5h 内),操作简单。通过对芯片设计和方法的改进,本实验中的芯片捕

获 DNA 的效率还可以提高,本芯片的制作和研究提供了一种新型的 DNA 提取芯片,不仅可以进行 DNA 的捕获,更重要的是此芯片易于和其他的功能芯片集成,使芯片实验室(Lab-on-a-chip)或微全分析系统(μ -Total analytical system; μ TAS)成为可能。

参 考 文 献

[1] Northrup M A, Ching M T, White R M, *et al.* DNA amplification with a microfabricated reaction chamber. *Proceedings of Transducers '93. The Seventh International Conference on Solid-State Sensors and Actuators.* Yokohama, Japan, June 1993 :924-926.

[2] Coakley W T, Hawkes J J, Sobanski M A, *et al.* Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles. *Ultrasonics*, 2000, **38** :638 - 641.

[3] Meng A H, Wang A W, White R M, *et al.* Ultrasonic Sample Concentration For Microfluidic Systems. *Transducers '99 Conference.* Sendai, Japan, June 7 - 10, 1999 :876 - 879.

[4] Belgrader P, Okuzumi M, Pourahmadi F, *et al.* A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis. *Biosens and Bioelectron*, 2000, **14** :849 - 852.

[5] Belgrader P, Benette W, Hadley D, *et al.* PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, 1999, **284** :449 - 450.

[6] Marko M A, Chipperfield R, Bimboim H C. A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem*, 1982, **121** :382 - 387.

[7] Matitashvili E, Zavizion B. One-tube extraction of DNA or RNA from agarose gel. *Anal Biochem*, 1997, **246** :260 - 262.

[8] Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic materia. *Biotechniques*, 1991, **10** :506 - 513.

[9] Wang K, Gan L, Boysen C, *et al.* A microtiter plate-based high-throughput DNA purification method. *Anal Biochem*, 1995, **226** :85 - 90.

[10] Seeger C, Batz H G, Ørum H. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Biotechniques*, 1997, **23** :512 - 517.

[11] Gelsthorpe A R, Gelsthorpe K, Sokol R J. Extraction of DNA using monoclonal anti-DNA and magnetic beads. *Biotechniques*, 1997, **22** :1080 - 1082.

[12] Rudi K, Kroken M, Dahlberg O J, *et al.* Universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Biotechniques*, 1997, **22** :506 - 511.

[13] Deggerdal A, Larsen F. Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads. *Biotechniques*, 1997, **22** :554 - 557.

[14] Huijun T, Andreas F R, Hühmer, *et al.* Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Analytical Biochemistry*, 2000, **283** :175 - 191.

[15] Kelly A, Wolfe M, Breadmore C, *et al.* Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis*, 2002, **23** :727 - 733.

[16] Christel L A, Petersen K, McWilliam W, *et al.* Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration. *Journal of Biomedical Engineering*, 1998, **121** :22 - 25.

A Novel DNA Purification Chip Based on SPE Methods

CHEN Xiang CUI Da-Fu* WANG Li ZHAO Qiang

(State Key Lab of Transducer Technology , Institute of Electronics Chinese Academy of Science , Beijing 100080 , China)

Abstract : It is important to develop a miniaturized DNA purification system for the purpose of integrated DNA analysis microchip. Silica-based solid-phase extraction (SPE) methods are widely been used in extraction and concentration of DNA from biological samples for there simple manipulation and less time consume. But little have paid attention to the miniaturization of these methods. In this study , a DNA purification chip was fabricated based on MEMS (micro-electro mechanical system) technology. DNA was purified using SPE methods on the surface of the chip : DNA products , which were eluted in chaotropic buffer , were flowed into the channel of the chip and captured on the surface of oxidized silicon. After washing , the adsorbed DNA was eluted in buffer and collected. The collected samples were examined by fluorescence microscope and results were given by CCD and PMT. We demonstrated that DNA can be captured on this type of chip with the efficiency of roughly 61% within half an hour. This chip is suitable for incorporation into a microchip platform (μ -Total analytical system or lab-on-a-chip).

Key words Solid- phase extraction , DNA , Chip , Oxidized silicon , MEMS

Foundation item : Chinese National Natural foundation (69936010 20299030)

* Corresponding author. Tel 86-10-62554503 ; Fax 86-10-62636165 ; E-mail : dfcui@mail. ie. ac. cn

Received date : 05-08-2003

微 生 物 学 报
WEISHENGWU XUEBAO
(双月刊 ,1953 年创刊)

第 44 卷 第 2 期 2004 年 4 月

ACTA MICROBIOLOGICA SINICA
(Bimonthly Started in 1953)

Vol.44 No.2 April 2004

编 辑	《微生物学报》编辑委员会 地址 北京海淀中关村中国科学院微生物研究所内 邮政编码 :100080 电话 :010-62630422 Http :/www. im. ac. cn/journals E-mail : actamicro@sun. im. ac. cn	Edited by	Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica Add : Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Zhongguancun , Beijing 100080 , China Tel 010-62630422 Http :/www. im. ac. cn/journals E-mail : actamicro@sun. im. ac. cn
主 编	李季伦	Editor-in-Chief	LI Ji-Lun
主 办	中国科学院微生物研究所 中国微生物学会	Sponsored by	Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences Chinese Society for Microbiology
出 版	科学出版社 地址 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码 :100717	Published by	Science Press Add : 16 Donghuangchenggen North Street , Beijing 100717 , China
印刷装订	北京科信印刷厂	Printed by	Kexin Printing House
总 发 行	科学出版社 地址 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码 :100717 电话 010-64034563 E-mail :journal@cspg. net	Distributed by	Science Press Add : 16 Donghuangchenggen North Street , Beijing 100717 , China Tel : 010-64034563 E-mail : journal@cspg. net
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址 北京 399 信箱 邮政编码 :100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add : P. O. Box 399 , Beijing 100044 ,China
广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号			