

时间分辨荧光检测组合式DNA芯片

贺全国^{1,2}, 邓燕¹, 李福枝¹, 聂立波¹, 何农跃^{1,2}

(1. 湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412008;
2. 东南大学 生物电子学国家重点实验室, 江苏 南京 210096)

摘要: 研究了时间分辨荧光标记与检测组合式DNA芯片的方法。首先在薄玻璃片上原位合成寡核苷酸的序列片段, 然后将之裁成小片, 随后将带有不同DNA片段序列的小片拼接组合成组合式DNA芯片。利用4, 7-二氯磺酰苯基-1, 10-菲罗啉-2, 9-二羧酸(BCPDA)多重标记的亲素-生物素放大效应, 建立了时间分辨荧光检测组合式DNA芯片的方法: 芯片上的DNA序列经过杂交后, 其互补序列末端的生物素可将多重BCPDA标记的亲素联接, 然后由BCPDA对铕离子(Eu^{3+})捕获与解离来实现杂交信号差别, 并可实现对正配、单碱基错配、二及三碱基错配的时间分辨荧光信号差别的检测。对BCPDA标记的系列化合物进行了荧光性能表征, 并对时间分辨荧光检测与传统荧光检测模式作了比较。

关键词: 时间分辨荧光检测; 组合式DNA芯片; 标记; BCPDA; 铕

中图分类号: O656.31

文献标识码: A

文章编号: 1008-2611(2007)01-0056-06

Time-resolved Fluorescence Detection of Mosaic DNA Chip

He Quanguo^{1,2}, Deng Yan¹, Li Fuzhi¹, Nie Libo¹, He Nongyue^{1,2}

(1. Key Laboratory of Green Packaging and Application Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412008, China; 2. Key State Bioelectronics Lab, Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract: Utilizing 4, 7-bis (chlorosulfophenyl)-1, 10-phenanthroline-2, 9-dicarboxylic acid (BCPDA, abbreviated as BCPDA) labeling method based on avidin-biotin amplification, we established a TRF detection format on the mosaic DNA chip: the detection method allows discriminatory signals for perfect match, one-base mismatch, two-base mismatch and three-base mismatch by TRF labeled DNA hybridization, whereby Europium (III, Eu^{3+}) was captured and released on the principle of complexation and dissociation interaction between BCPDA and Eu^{3+} solution when the BCPDA-tagged avidin and biotin-capped oligonucleotide sequence linked. The fluorescence spectra and related lifetimes were determined. We also compared the TRF detection mode with the conventional fluorescence one.

Key words: time-resolved-fluorescence detection; mosaic DNA chip; label; BCPDA; Europium

0 引言

基于微型化的集成分析系统平台的芯片实验室(LOC)和微量全分析系统(μ -TAS)的出现, 促进了相关化学、生物等科技领域的巨大进展, 尤其是在生物传感器的迅猛发展与应用方面, 极为显著^[1,2]。DNA芯片(或DNA微阵列)是一种典型的生物传感器, 其表

面组装了成千上万个紧密排列着的寡核苷酸序列分子, 与其互补的DNA序列经分子识别后, 识别信号通常采用荧光检测来实现。因而DNA芯片的制备和检测是DNA芯片技术中的两个关键问题^[3,4]。目前, 已有几种生产商业性DNA芯片或DNA微阵列的方法, 如光刻法或光导向光刻法^[5,6]、喷墨印刷法、点样法、活板印刷法、珠井法(或微珠法)等^[7], 而降低生产成本是

收稿日期: 2006-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20505020), 湖南省教育厅基金资助项目(05C508), 湖南省普通高校青年骨干教师培养计划资助项目(2005-2008), 湖南省自然科学基金资助项目(04jj40023, 05jj40053), 广东省自然科学基金资助项目(04008782)

作者简介: 贺全国(1973-), 男, 湖南常德人, 湖南工业大学副教授, 博士, 主要研究方向为微纳米材料与器件, 生物传感器。

制备和应用DNA芯片时首要考虑的问题^[4,8]。

此外, 传统的荧光染料如荧光素、Cy-3和Cy-5常用作DNA微阵列的信号标记分子, 通常由荧光扫描仪检测获得高通量的并行信号, 然后进行相关的生物信息学解析。然而, 传统荧光染料的检测灵敏度和特异性易受背景信号(如散色光、样本本身的荧光、系统光学荧光和底物荧光等)的严重干扰。同时, 在传统荧光染料光谱特性方面, 一般其荧光寿命处于纳秒级规模, 斯托克位移仅有几十纳米, 发射光谱相对宽泛。严重的背景干扰和传统荧光的局限性, 促成了先前的一些研究^[9-13]也引发了我们的研究兴趣, 以期找到传统荧光染料标记的替代品。

在实际应用中, 我们必须有效地解决以上所述DNA芯片技术的两个关键问题, 尤其是检测方式问题。在光谱特性方面, 稀土金属离子及其复合物的寿命一般是毫秒级的规模, 斯托克位移有数百纳米, 发射光谱通常为强的窄带发射。与传统荧光染料相比, 这是其典型的优点, 并且使用稀土金属复合物标记的最大优点是高效的抗背景干扰的辨别能力和便利的时间分辨荧光检测模式。先前的工作者已经成功制备了组合式DNA芯片^[14,15]。本文的研究中, 我们提出了时间分辨荧光(TRF)检测方法, 通过BCPDA多重标记来消除传统荧光染料标记的缺点^[16]。首先在载玻片上原位合成寡核苷酸序列, 然后裁成小片, 再将载有不同序列信息的小片拼接成组合式DNA芯片。这种检测方式使得由TRF标记杂交产生的信号差别(如完全正确匹配、1个碱基错配、2个碱基错配和3个碱基错配)可以区分开来。此时, BCPDA标记的亲合素和以生物素为末端的寡核苷酸序列连接时, Eu^{3+} 以配(络)合和解离的原理在BCPDA和 Eu^{3+} 溶液之间被捕获和释放。从而检测相应的荧光光谱和荧光寿命, 通过建立在亲合素-生物素放大效应^[9,12]基础上的多重BCPDA标记, 我们建立了TRF检测模式来检测组合式DNA芯片。本文也比较了TRF检测模式和传统荧光检测模式, 结果表明, TRF检测模式明显优于传统荧光检测模式, 尤其是对于组合式DNA芯片。同样, TRF检测技术对某些特定的生物体系也十分有利, 尤其对建立在时间分辨荧光检测模式基础上的生物传感器和生物器件具有重大意义。

1 材料和方法

1.1 材料

玻璃片(25.4 mm × 76.2 mm, 南京玻璃厂); 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 南京许光化学厂); 磷酸缓冲溶液; Tris缓冲溶液pH=8.0(三羟甲基氨基甲烷);

其它缓冲溶液预先准备。 Eu^{3+} 缓冲溶液的螯合剂BCPDA根据文献^[9,17]中的方法合成; 亲和素购于南京生物工程有限公司, 其BCPDA标记用文献^[9]中的方法优化, 亲和素工作溶液预先稀释。超纯水电阻为18.2 MΩ, 普通水为双蒸后去离子水。其他相关化学试剂, 如未说明均为分析纯并适当处理。杂交和检测用的两条互补DNA靶序列, 均购于上海申友基因有限公司。靶序列1: 3'-TTG GTG GTT TGT GTG TTT TTT TTT T-FAM, 被荧光团FAM标记修饰; 靶序列2: 3'-TTG GTG GTT TGT GTG TTT TTT TTT T-Biotin(下划线是可能的错配位点)。

1.2 仪器

荧光激发和发射光谱由Spex Fluorolog-3荧光分光光谱仪(Jobin Von CO., Horiba Groups, USA)测量获得。激发波长338 nm, 激发狭缝和发射狭缝均为10 nm, 步长为1 nm, 时间间隔为0.1 s。在荧光测量时, 于激发单色器前置一Schott 500 nm(KV 500)滤色器, 消除激发散色。根据厂家预先设定好的校正因子来校正荧光光谱。在发射波长处的光衰减由Tau-3 Lifetime Modular Fluorescence Measurement System和Spex Fluorolog-3荧光分光光谱仪测量记录。激发波长为338 nm和286 nm, 初始延迟时间为0.01 ms, 收集时间间隔为0.001 ms, 激发频率为40 ms。全部实验均在室温下所做。

本实验的时间分辨荧光由改进的时间分辨荧光计LKB-WALLAC 1420测量, 激发波长为340 nm, 发射波长为616 nm, N_2 做激发光源。检测由电脑程序自动控制。激发时间少于10 μs, 延迟时间为100 μs, 计数时间为400 μs, 恢复时间为1500 μs。两种计数均取5次测量的平均值。

探针杂交后的荧光和FAM标记靶物的荧光由生物芯片扫描仪以10 μm的分辨率扫描获得(ScanArray Lite Microarray Analysis System, Packard Biochip Technologies, USA)。

1.3 实验准备和实验过程

载玻片表面的处理方法如文献^[18]所述方法处理。寡核苷酸序列在载玻片上原位合成和组合式DNA芯片的装配方法参照文献^[14,15]所介绍的方法进行。4个设计好的p16探针在被修饰过的玻片表面上原位合成, 如表1所示, 分别为 P_0 (完全正配)、 P_1 (错配1个碱基)、 P_2 (错配2个碱基)、 P_3 (错配3个碱基)。组合式DNA芯片装配如图1、图2(为实际荧光扫描图)所示。每个探针均裁成4 mm × 4 mm的小片, 分别承载不同的序列, 并按预先编码的顺序拼接在2.54 cm × 7.5 cm的玻片平板上。如表1所示的组合坐标次序, 全部小片组合成DNA芯片。

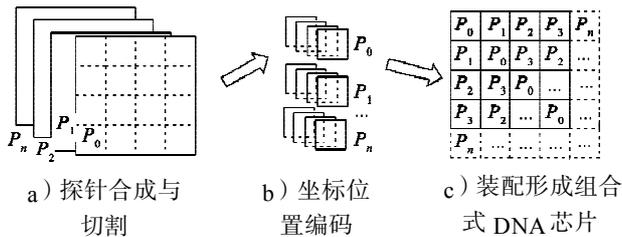


图1 组合式DNA芯片制备一般流程图

Fig. 1 General procedure for mosaic DNA chip fabrication

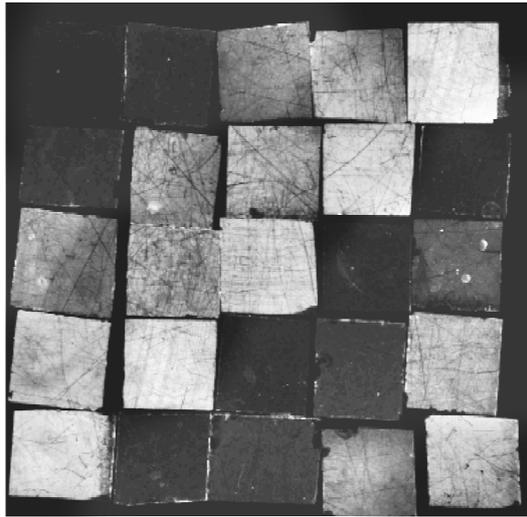


图2 用p16基因与靶序列1杂交获得的组合式DNA芯片的荧光扫描图

Fig. 2 Fluorescence image of mosaic DNA chip (Using 4 probes of p16 gene Hybridization through Target 1)

表1 4条DNA探针序列及其装配阵列位置排布
Table 1 Four probe sequences and location layout for arrays fabrication

Probe	Sequence	Locations with (x, y) coding
P_0	5'-AAC CAC CAA ACA CAC	(1, 1), (2, 2), (3, 3), (4, 4), (5, 5)
P_1	5'-AAC CAC CCA ACA CAC	(1, 5), (2, 1), (3, 2), (4, 3), (5, 4)
P_2	5'-AAC CCA CAA AC CAC	(1, 4), (2, 5), (3, 1), (4, 2), (5, 3)
P_3	5'-AAC CCA CCA AC CAC	(1, 3), (2, 4), (3, 5), (4, 1), (5, 2)
P	Without sequence	(1, 2), (2, 3), (3, 4), (4, 5), (5, 1)

1.4 组合式DNA芯片的杂交和检测

模式A: 寡核苷酸阵列在46 °C下与200 nmol/L的靶序列1: 3'-TTG GTG GTT TGT GTG TTT TTT TTT T-FAM溶液杂交1.5 h, 然后在46 °C下分别用含0.1 % SDS的2 × SSC溶液和含0.1 % SDS的0.1 × SSC溶液冲洗。其荧光性由基因扫描仪 (ScanArray Lite Microarray Analysis System) 检测。

模式B: 寡核苷酸阵列在46 °C下与200 nmol/L的靶序列2: 3'-TTG GTG GTT TGT GTG TTT TTT TTT T-Biotin溶液杂交2.0 h, 然后在46 °C下分别用0.1 % SDS的2 × SSC溶液和0.1 % SDS的0.1 × SSC溶液冲洗。上述阵列与BCPDA标记的 6.5×10^{-4} mol/L的亲合素工作溶液反应3 h; 置于含 1×10^{-5} mol/L Eu^{3+} 的、pH=8.0

的Tris缓冲溶液中, 在37 °C条件下浸泡100 min; 然后用0.05 % Tween 20盐溶液和蒸馏水洗涤; 最后于 N_2 下干燥。其荧光性能由LKB-WALLAC 1420时间分辨荧光计来检测。

2 结果和讨论

2.1 多重BCPDA标记的亲合素和 Eu^{3+} 复合体的固相和液相荧光特性

BCPDA是一种两性试剂, 可以作为链接剂将氨基与同一亲合素分子 (分子内交连) 或不同亲合素分子 (分子间交连) 连接起来。然而过多BCPDA标记亲合素将会阻碍其生物活性。这点应该在标记时充分考虑到, 以避免在后续的荧光检测中发生错误, 因为多余的交连或重复交连可能导致亲合素分子和生物素分子之间的反应。因此, 最佳标记应是保留最大生物学活性而非最大标记量, 尽管亲合素能够允许多重BCPDA连接到它的活泼氨基上而不降低生物学活性。E. P. Diamandis's等优化了标记步骤^[9], 得到的最佳BCPDA标记亲合素的摩尔比率为9:1; 而我们得到的最佳标记比率为11:1, 相差甚微。具体标记如下: 将0.020 g亲合素加入到含有0.040 g BCPDA的2 mL干乙醇中, 振摇直至黑色变为透明, 静置过夜, 以确保反应完全。通过Sephadex G-50柱分离检测游离BCPDA和水解的BCPDA (280 nm波长下监控), 此柱预先经过pH=8.0的0.05 Mol/L NH_4HCO_3 溶液洗涤和平衡, 收集标记好的亲合素 (Avidin-BCPDA_n, 缩写为AB)作为备用溶液。取部分AB液用含有 10^{-4} Mol/L Eu^{3+} 的0.01 Mol/L Tris缓冲液稀释 (pH=8.2, 其它不同的pH缓冲溶液也用到), 过滤得到液体Eu复合物 (缩写为AB-Eu-L), 冷冻得到固体Eu复合物 (缩写为AB-Eu-S)。AB-Eu-L在各种缓冲液中的荧光性和AB-Eu-S在Tris缓冲液中的荧光性均由Spex Fluorolog-3光子计数荧光计来检测。

本实验中AB-Eu复合物的荧光激发和发射光谱在pH为3~9.5范围内的各种缓冲溶液(HCl: pH=3.0; acetate: pH=5.0; phosphate: pH=8.0; Tris: pH=8.2; carbonate: pH=9.5)中检测。相应地我们也测量和比较了各种缓冲溶液中的荧光衰减情况。典型荧光光谱如HCl: pH=3.0, 磷酸: pH=8.0, Tris: pH=8.2见图3, 相应的荧光衰减曲线见图4。

图3中曲线b、d、f和e、c、a分别代表AB-Eu在上述3种缓冲溶液中的荧光激发和荧光发射光谱。可以看出, 在 10^{-4} Mol/L Eu^{3+} 的相同浓度下, 不同缓冲溶液中AB-Eu的荧光激发和荧光发射光谱相差很大。因为BCPDA的主要分子结构为1, 10-邻氮二杂菲-2, 9-二羧酸, 当BCPDA衍生物溶于缓冲溶液时, 在2, 9-氮和1, 10-羧基氢处存在质子化和脱质子化平衡。

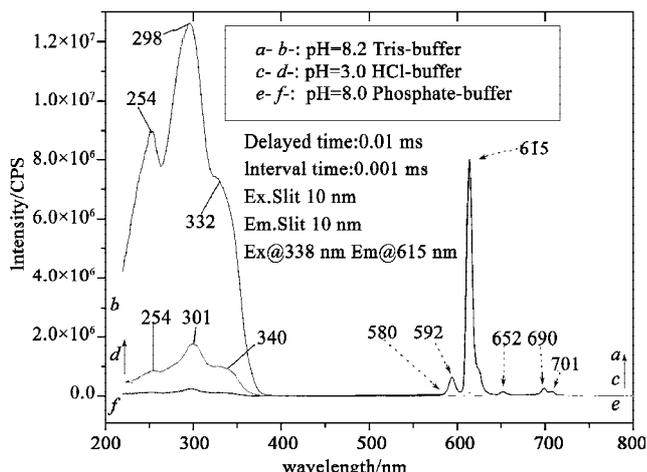


图3 缓冲液中AB-Eu荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence excitation and emission spectra of AB-Eu complexes in buffers

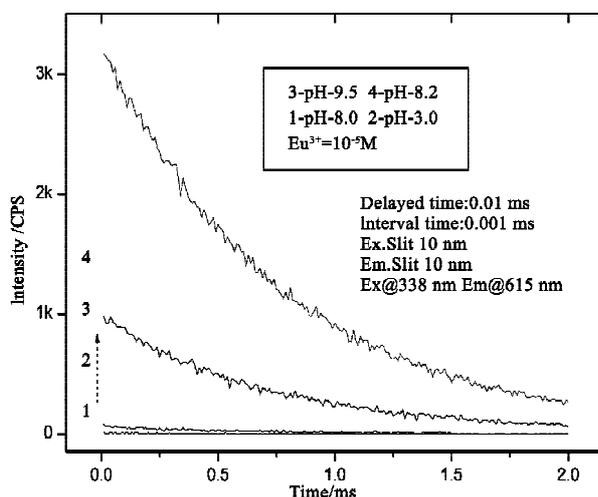


图4 缓冲液中AB-Eu荧光衰减曲线

Fig. 4 Fluorescence decays of AB-Eu complexes in buffers

当BCPDA溶于缓冲溶液时,强酸性导致 Eu^{3+} 溶解并从BCPDA上离解下来;强碱性导致 Eu^{3+} 沉淀和BCPDA羧酸盐脱质子化而使得AB-Eu复合物不稳定。荧光强度在很大程度上依赖于溶液的pH值。在磷酸盐溶液中荧光强度降低到最小值,并没有出现 Eu^{3+} 的特征发射。这可归因于磷酸盐的强荧光淬灭效应^[9,17]。不过,其激发和发射光谱在HCl、醋酸盐、Tris和碳酸盐缓冲溶液中保持一致。尤其是不改变 Eu^{3+} 的 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ 特征发射(图3没有列出在醋酸盐和碳酸盐中光谱)。除了磷酸盐外,我们发现,在Tris缓冲溶液中荧光强度最大,在HCl缓冲溶液中荧光强度最小,在其它pH环境中存在不同程度的荧光损失和激发波长的小幅度漂移。对于 Eu^{3+} 的 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ 特征发射,观察到的峰有580 nm、592 nm、615 nm、652 nm、690 nm和701 nm。

相应的跃迁为 $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ 、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ 、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ 、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ 、 $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ 。这些结果表明,紫外激发能量已经被有效地从BCPDA转移到 Eu^{3+} ,导致 Eu^{3+} 从激发态的 5D_0 到 7F_n 基态产生的线状发射以荧光形式表现出来。

在研究荧光光谱的基础上,我们还研究了AB-Eu复合物在缓冲溶液中的荧光衰减特征,研究结果见图4。在相同的 10^{-5} Mol/L Eu^{3+} 下,AB-Eu荧光衰减符合一级动力学规律,结果见图3。然而在磷酸盐溶液中的荧光强度保持接近零,这恰好证实了前面提到的磷酸盐的淬灭效应。

在HCl溶液中,荧光强度仅波动30~50 cps,接近背景噪音。与HCl和磷酸盐溶液不同,AB-Eu在碳酸盐和Tris缓冲液中的荧光强度从最初的较高强度随时间变化不断地减弱,在醋酸盐溶液的荧光强度也有类似趋势。荧光寿命测定如下:做图 $\ln I(t) - t$, $I(t)$ 为不同时间 t 处的荧光强度,产生一条斜率为 $-1/\tau$ 的直线,荧光寿命为 τ 。从而可以计算出AB-Eu在 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ 跃迁处,在HCl、磷酸盐、Tris、碳酸盐的荧光寿命分别为0.010~0.040 ms、0 ms、0.48~1.74 ms、0.64~1.20 ms。在我们的实验中,单独的 Eu^{3+} 水溶液的荧光寿命为0.010~0.050 ms。这不仅证实了 Eu^{3+} 在强酸溶液中从BCPDA-Eu分解下来,而且还证明了AB-Eu在磷酸盐和强酸、强碱中不是有效的复合形式。在Tris^[9]中AB-Eu荧光寿命稍长,约为0.44~0.76 ms。这可能是当BCPDA-Eu与亲和素大分子的链接提高了量子效率从而增加了荧光寿命。

比较在Tris缓冲溶液中AB-Eu复合物液、固两相的荧光光谱和荧光寿命,测量结果分别见图5和表2。

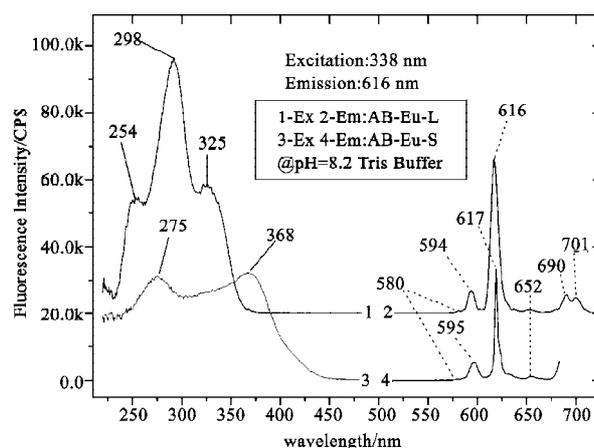


图5 典型的液(L)固(S)相AB-Eu的荧光光谱

Fig. 5 Typical fluorescence excitation and emission spectra of AB-Eu-L and AB-Eu-S

表2 固液相 AB-Eu 的荧光寿命汇总
Table 2 Solid & liquid Fluorescence lifetimes of AB-Eu³⁺ Complexes

Sample	Buffer pH	Excitation/nm	Lifetime τ /ms		
			$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$
AB-Eu-L	Tris 8.2	338	0.484 ~ 0.711	0.524 ~ 0.828	0.589 ~ 1.739
		286	0.484 ~ 0.682	0.481 ~ 0.682	0.556 ~ 0.904
	Carbonate 9.5	338	0.656 ~ 0.871	0.945 ~ 1.080	1.145 ~ 1.942
		286	0.626 ~ 0.789	0.640 ~ 0.833	0.766 ~ 1.083
AB-Eu-S	Tris 8.2	338	0.729 ~ 0.773	0.920 ~ 0.939	1.279 ~ 1.883

从图5可以看出,从275 nm到368 nm的波长范围内,固相荧光吸收比液相荧光吸收都要宽。固、液两态的荧光吸收特点均证实了Eu³⁺有 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ ($n=0,1,\dots,4$)跃迁。相应地固态和液态AB-Eu复合物在 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ ($n=0,1,2$)处的荧光寿命见表2。其 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ 跃迁产生的荧光寿命为毫秒级、有大的斯托克位移和强的窄带发射,这都较传统的荧光染料要好。

这些特点可以有效辨别任何重要复合体本身产生的背景荧光,并使得便利的AB-Eu标记时间分辨荧光

检测方法变为可能。

2.2 TRF检测AB-Eu标记的组合式DNA芯片

组合式DNA芯片杂交和检测方法见1.2中的“组合式DNA的杂交和检测”,包括模式A和模式B。用两种荧光标记来检测组合式DNA芯片。其一为使用传统荧光团和靶序列1杂交,荧光扫描结果见图2,阵列位置排布设计见表1。其二为“模式B”,用AB-Eu标记和时间分辨来检测。测量结果见表3。

表3 p16基因组合式DNA芯片的阵列荧光强度
Table 3 Arrayed fluorescence intensities on Mosaic DNA chip of p16 gene

Fluorescence Detection Measurements	Target 1			Target 2		
	FI	Deviation	Ratio	FI	Deviation	Ratio
P_0	19 543	± 1581	1.00 ± 0.081	4 783	± 287	1.00 ± 0.060
P_1	9 853	± 654	0.504 ± 0.033	3 731	± 267	0.78 ± 0.056
P_2	4 660	± 477	0.238 ± 0.024	2 535	± 223	0.53 ± 0.011
P_3	973	± 87	0.050 ± 0.005	1 291	± 157	0.27 ± 0.033
P	480	± 64	0.025 ± 0.003	131	± 53	0.027 ± 0.011

#-FI represents fluorescence intensity.

表3展示出了3个错配(P_1, P_2, P_3)和一个完全正配(P_0)探针的杂交结果,就荧光强度(在表3中缩写为FI)而言,靶序列1的绝对值比靶序列2的大得多,而且波动比较大;靶序列2的荧光强度几乎没有波动。两种标记方法的差别可能涉及到外在干涉效应(引起Target1荧光强度有较大的波动)和内在的干涉如仪器本身的特点(导致Target2荧光强度几乎没有波动),这还有待进一步研究。Target1杂交后,完全正确匹配:1个碱基错配:2个碱基错配:3个碱基错配的荧光强度比率为1:0.50:0.24:0.05。而Target2的比率为1:0.78:0.53:0.27。尽管时间分辨检测方法的偏差比传统荧光团要小,而且传统方法的稳定性、重复性和可靠性还有待进一步研究,但是时间分辨荧光检测对DNA微阵列合成中的碱基正确匹配和错误匹配的分辨能力还是十分强大的^[16,19]。

3 结论

通过亲和素-生物素的BCPDA多重标记,我们提出了时间分辨荧光检测组合式DNA芯片来消除传统

荧光标记的缺点。在载玻片上原位合成寡核苷酸序列后将其裁成小片,再装配成组合式DNA微阵列。TRF检测模式建立在组合式DNA芯片上,当BCPDA-亲和素分子与生物素蛋白分子-寡核苷酸序列连接后,能够检测出杂交后的正确匹配和1个碱基错配、2个碱基错配、3个碱基错配产生的差别信号。此时,由于络合作用和分解作用交替出现,Eu³⁺在BCPDA和Eu³⁺溶液中交替被捕获和被释放。我们检测了由BCPDA标签的AB-Eu复合物的荧光光谱和荧光寿命,其固液两相显示出Eu³⁺的特征发射 $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ ($n=0,1,\dots,4$)和毫秒级的荧光寿命。TRF与传统模式相比,前者有取代后者的趋势,尤其是在组合式DNA芯片检测方面。同样,TRF在各种生物检测体系或基于时间分辨荧光检测的生物标记技术中有重大的应用价值。

参考文献:

- [1] Manz A, Harrison D J, Verpoorte E M J, et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of

- separation techniques into monitoring systems[J]. *J Chromatogr.*, 1992, 593:253-258.
- [2] Lee S J, Lee S Y. Micro total analysis system (μ -TAS) in biotechnology[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64: 289-299.
- [3] Chee M, Yang R, Hubbell E, et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays[J]. *Science*, 1996, 274:610-614.
- [4] Pirrung M C. How to make a DNA chip[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41:1276-1289.
- [5] Fodor S P A, Read L, Pirrung M C. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis[J]. *Science*, 1991, 251:767-77.
- [6] McGall C, Labadie J, Brock P. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93:13555-13560.
- [7] Schena M. DNA arrays[M]. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- [8] Niemeyer C M, Blohm D. DNA Microarrays[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38:2865-2869.
- [9] Diamandis E P, Morton R C. Time-resolved Fluorescence Using a Europium Chelate of 4,7-bis-(chlorosulfofenyl)-1, 10-Phenanthroline-2,9-Dicarboxylic Acid (BCPDA): Labeling Procedures and Applications in Immunoassays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1988, 112:43-52.
- [10] Reichstein E, Shami Y, Ramjeesingh M, et al. Laser-Excited Time-Resolved Solid-Phase Fluoroimmunoassays with the New Europium Chelate 4,7-Bis (chlorosulfofenyl)-1, 10-phenanthroline-2, 9-dicarboxylic Acid as Label[J]. *Anal. Chem.*, 1988, 60:1069-1074.
- [11] Yuan J, Wang G, Majima K, et al. Synthesis of a Terbium Fluorescent Chelate and Its Application to Time-resolved Fluoroimmunoassay[J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73:1869-1876.
- [12] Scorilas A, Bjartell A, Lilja H, et al. Streptavidin-Polyvinylamine Conjugates: Applications in Immunoassay, Immunohistochemistry, and Microarrays[J]. *Clin. Chem.*, 2000, 46(9):1450-1455.
- [13] Scorilas A, Diamandis E P. Polyvinylamine-Streptavidin Complexes with a Europium Chelator: A Universal Detection Reagent for Solid-Phase Time Resolved Fluorometric Applications [J]. *Clin. Biochem.*, 2000, 33(5):345-350.
- [14] Xiao P, Wang Z, Guo H, et al. Combinational synthesis of oligonucleotides and assembly fabrication of oligonucleotide array[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 40:165-168.
- [15] He Q, Chen H, Tang J, et al. Mosaic DNA chip fabrication and its time-resolved fluorescence detection[J]. *Proc. SPIE in Nanosensing: Materials and Devices*, 2004, 5593:561-570.
- [16] Odette Prat, Evelyne Lopez, Gerard Mathis. Europium (III) Cryptate: A Fluorescent Label for the Detection of DNA hybrids on Solid Support[J]. *Anal. Biochem.*, 1991, 195:283-289.
- [17] Evangelista R A, Pollak A, Allore B, et al. A New Europium Chelate for Protein Labelling and Time-Resolved Fluorometric Applications [J]. *Clin. Biochem.*, 1988, 21:173-178.
- [18] Xiao P, He N, He Q, et al. DNA Microarray Synthesis by Using PDMS Molecular Stamp (II)-Oligonucleotide On Chip Synthesis Using Pdms Stamp[J]. *Sci. China (B)*, 2001, 44 (4) :442-448.
- [19] Nie L, Tang J, Chen H, et al. Colorimetric detection of polynucleotides on polypropylene slices[J]. *Analytical Sciences*, 2004, 20 (3) :461-463.
- [20] Templeton E F, Pollak A. Spectroscopic Characterization of 1,10-Phenanthroline -2,9-Dicarboxylic Acid and its Complexes with Europium (III) : Luminescent Europium Chelates Useful for Analytical Application in Aqueous Solution[J]. *Journal of Luminescence*, 1989, 43:195-205.