

## 两种限制性标记方法提高基因芯片杂交结果的信噪比

表达谱基因芯片是近年来兴起的一种新技术,其采用高通量的方式,检测不同细胞或不同状态下生物细胞基因的表达差异,以发现新基因或基因新功能[1]。基因芯片技术对杂交过程要求比较严格,以达到较高的信噪比及灵敏度。通常的做法包括加入一些封闭剂,如小牛血清白蛋白、Cot-I DNA、poly(A)等以降低背景。我们通过采用一种新的样品标记过程,即两种限制性标记方法来放大信号强度,提高信噪比及灵敏度,得到较好的效果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌种来自广州总医院医学实验科, RNA抽提试剂参照文献[2]制备; QuickPrep mRNA纯化试剂盒、Cy5-dUTP来自Amersham Pharmacia公司; 反转录酶为Gibco公司 Superscript II; Taq酶、 $T_4$ 连接酶、Rnase H等购自Takara公司; 3S PCR产物纯化试剂盒购自上海博彩公司; CMT-GAPS表面氨基化玻片购自Corning公司; DMSO及Formamide购自Amresco公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 酵母总RNA的提取 参照文献[3]。

1.2.2 靶基因片段的制备 应用RD-PCR技术[3]构建酵母细胞正常生长状态下的cDNA片段文库[4][5], 从中选择克隆扩增。PCR产物经纯化后, 经紫外分光光度计DU530测定浓度, 用DMSO调整浓度为0.5 mg/ml, 加样至384孔板中备用。

1.2.3 芯片的制备 用Cartesian Pixsys5500基因芯片打印仪和CMT-GAPS玻片进行点样, 然后用BIO-RAD紫外交联仪以150 mJ的总能量进行交联固定, 80 °C干烤2 h后备用。

#### 1.2.4 探针的制备

1.2.4.1 逆转录标记 提取总RNA后, 用mRNA纯化试剂盒进行纯化, 取8  $\mu$ g mRNA进行逆转录, 以Cy5-dUTP进行标记, 参照文献[6]的方法, 大约每6个碱基掺入一个荧光分子。

1.2.4.2 Cy5标记通用引物限制性扩增 将纯化的mRNA逆转录生成cDNA第一链后, 继以RNase H切割杂化双链中的mRNA, 并作为合成cDNA第二链的引物延伸成双链cDNA, 用Sau3A I酶切, 酶切片段加接头[由两条单链SIP(5' pGATCmCACACCAGC CAAACCCA3')和SIR(5' GGTTTGGCTGGTGTG3')逐渐降温退火合成通用接头]。加入25  $\mu$ l 2 $\times$ PCR缓冲液(100 mmol/L KCL, 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.3, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 5  $\mu$ l dNTP(各2 mmol/L), 1  $\mu$ l模板, 2  $\mu$ l Cy5荧光标记的通用引物(GTTTGGCTGGT GTGGATCU-Cy5, 加ddH<sub>2</sub>O至体积为49  $\mu$ l, 最后加入1  $\mu$ l Taq DNA聚合酶。95 °C变性5 min后, 进行RD-PCR扩增, 18个循环(95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 60 s), 最后72 °C延伸7 min。

1.2.4.3 通用引物扩增中掺入Cy5-dUTP 取加接头的酶切片段1  $\mu$ l作模板, 使用不标记荧光通用引物2  $\mu$ l, 25  $\mu$ l 10 $\times$ PCR缓冲液, 5  $\mu$ l dNTP(各2 mmol/L), 1.5  $\mu$ l Cy5-dUTP(1 mmol/L), 加ddH<sub>2</sub>O至体积为

49  $\mu\text{l}$ , 最后加入1  $\mu\text{l}$  Taq DNA 聚合酶, PCR反应条件同1.2.4.2。

1.2.5 杂交与检测 芯片先在预杂交液(25% Formamide、5 $\times$ SSC、0.1% SDS)中杂交, 42  $^{\circ}\text{C}$ 温育45 min。在经3S PCR产物纯化试剂盒纯化的探针中加入等体积的2 $\times$ 杂交液后, 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min, 14 000 r/min离心1 min, 冷却, 取4  $\mu\text{l}$ 滴加到阵列上, 盖上盖玻片封闭, 42  $^{\circ}\text{C}$ 杂交16 h。然后依次在2 $\times$ SSC/0.1% SDS、0.1 $\times$ SSC/0.1%SDS、0.1 $\times$ SSC溶液中清洗玻片, 灭菌水漂洗后, 无水乙醇脱水, 室温下干燥。用GSI Lumonics公司的Scanarray Lite进行扫描。

## 2 结果

3种标记方法标记的探针与芯片杂交后, 在激发光源能量为95%、信号增益为72%的情况下扫描结果见图1、2、3。由图中可以看出, 经过限制性扩增的探针与芯片杂交结果的背景小, 阳性信号强, 信噪比高; 而经常规逆转录标记的探针杂交结果背景高, 阳性信号弱, 信噪比低。其中以经荧光标记的通用引物行限制性扩增标记的探针杂交结果最佳。

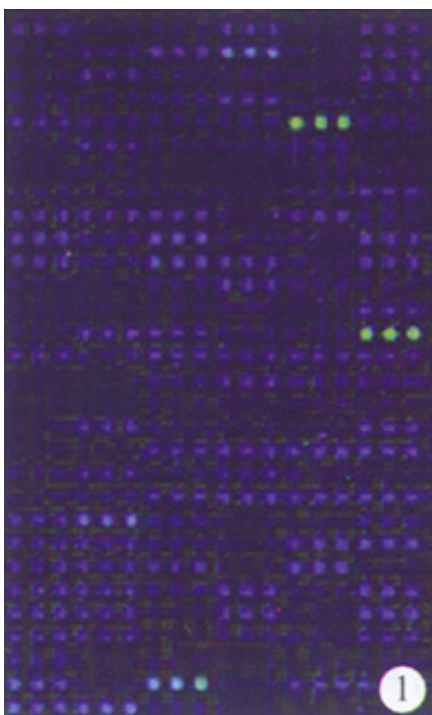


图1 常规逆转录标记

Fig.1 Routine reverse transcription labeling

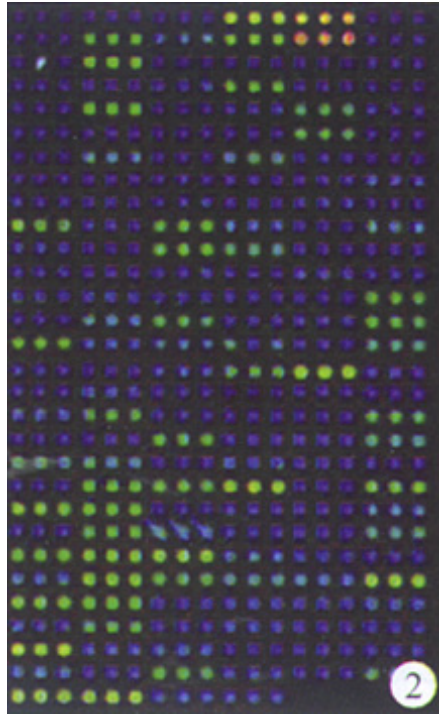


图2 荧光标记通用引物限制性标记

Fig.2 Restriction fluorescence labeling using Cy5-universal primer

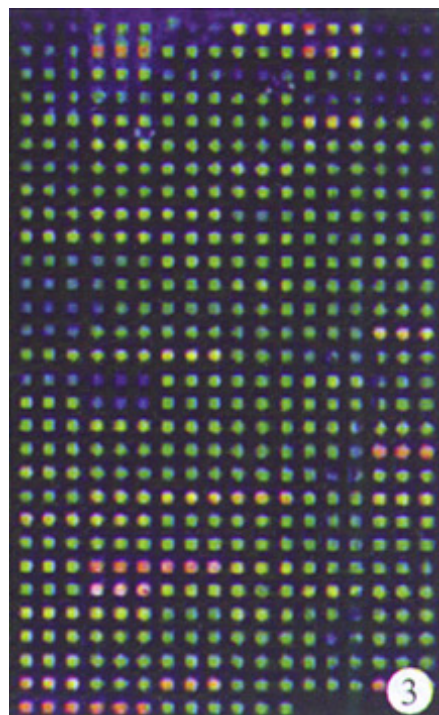


图3 掺入荧光标记dNTP限制性标记

Fig.3 Restriction fluorescence labeling using incorporated Cy5-dNTP

### 3 讨论

表达谱基因芯片激光扫描结果必须背景低，信噪比高，才能有效地进行下一步杂交后分析。对于信噪比的控制可以采用降低背景或提高信号强度的方法。降低背景的方法除需有性能卓越的激光共聚焦扫描仪外，还包括以下几个方面：(1) 选择优质基质材料(如硅片、优质玻片等)；(2) 选择较好的基质包被试剂(如Corning

公司的GAPS及Ultra GAPS包被玻片); (3)打印后的清洗封闭、预杂交; (4)杂交液中加入一些阻断剂, 封闭芯片上的位点; (5)纯化探针分子等。对于氨基包被的玻片而言, DNA是通过主链骨架磷酸基的负电性与玻片表面的氨基通过离子键结合, 另外DNA的胸腺嘧啶残基与烷胺基之间以自由基作用相互结合, 这种天然DNA与基片表面的静电或非特异性共价结合是稳定的, 并且对于标记探针来说是绝对过量的, 因此通过提高标记探针的信号强度来放大杂交的信噪比是可行的。

在一定循环之内, PCR的扩增与目的片段的量具有线性关系, 而限制性扩增技术利用Sau3A I 的识别特性, 大约每隔200 bp就可能有一个酶切位点, 从而将cDNA切成大小比较均匀的限制性酶切片段, 加上接头后进行PCR扩增标记, 得到的探针长短比较均一, 扩增也比较均衡, 有利于杂交时退火温度的控制, 保证了杂交的一致性和可信度。从所获的杂交结果可以看出, 经限制性扩增标记的探针, 杂交后的信噪比明显高于逆转录标记。而对于两种限制性标记技术而言, 采用通用引物扩增, 每条加上接头的链都能得到比较均一标记, 因此更为确实, 标记效率更高; 掺入Cy5-dUTP标记方法, 由于受到模板碱基排列顺序的影响, 掺入具有一定的随机性和不可控性, 因此相对标记效率及真实性较低。

#### 参考文献:

- [1] Satio-Hisaminato A, Katagiri T, Kakiuchi S, et al. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray[J]. DNA Res, 2002, 9(2): 35-45
- [2] Schmitt ME, Brown TA, Trumppower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(10): 3091-2.
- [3] 祝骥, 马文丽, 李凌, 等. 一种限制性cDNA文库的构建[J]. 遗传, 2002, 24(2): 174-6.  
Zhu J, Ma WL, Li L, et al. A method for construction of restriction cDNA library[J]. Hereditas (Beijing), 2002, 24(2): 174-6.
- [4] 刘莉扬, 马文丽, 宋艳斌, 等. RD-PCR技术在酵母基因表达谱研究中的应用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2002, 23(3): 246-9.  
Liu LY, Ma WL, Song YB, et al. Application of RD-PCR technology in the study of yeast gene expression[J]. J Xi'an Med Univ, 2002, 23(3): 246-9.
- [5] 毛向明, 马文丽, 姜立, 等. 应用RD-PCR方法制备K562细胞表达谱芯片基因探针[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(8): 724-6.  
Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis[J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(8): 724-6.
- [6] Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(12): 3273-97.

#### 参考文献:

- [1] Satio-Hisaminato A, Katagiri T, Kakiuchi S, et al. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray[J]. DNA Res, 2002, 9(2): 35-45
- [2] Schmitt ME, Brown TA, Trumppower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(10): 3091-2.
- [3] 祝骥, 马文丽, 李凌, 等. 一种限制性cDNA文库的构建[J]. 遗传, 2002, 24(2): 174-6.  
Zhu J, Ma WL, Li L, et al. A method for construction of restriction cDNA library[J]. Hereditas (Beijing), 2002, 24(2): 174-6.
- [4] 刘莉扬, 马文丽, 宋艳斌, 等. RD-PCR技术在酵母基因表达谱研究中的应用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2002, 23(3): 246-9.

Liu LY, Ma WL, Song YB, et al. Application of RD-PCR technology in the study of yeast gene expression[J]. J Xi'an Med Univ, 2002, 23(3): 246-9.

[5] 毛向明, 马文丽, 姜立, 等. 应用RD-PCR方法制备K562细胞表达谱芯片基因探针[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(8): 724-6.

Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis[J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(8): 724-6.

[6] Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(12): 3273-97.

---

[回结果列表](#)