

一种新的基因芯片检测荧光标记技术：通用引物 U_2 联合标记法

基因芯片由于其高度集成化和平行化等特点，在疾病的基因诊断和病原体诊断方面发挥着越来越重要的作用[1][2][3][4][5]。通常情况下，由于用作疾病诊断的组织和病原体的量非常少，需要将其大量扩增之后与芯片上的探针杂交发出来的荧光信号才能与背景区别开。因而样品的标记方法对于提高芯片检测的灵敏度非常重要。常用的方法[6][7][8]是针对病原体的基因序列设计特异性引物将其扩增后再掺入荧光标记物，这种方法可以使极微量的基因样品得到大量的扩增从而满足芯片检测的要求，但是若芯片上集成有多种病原体的探针则需要多对引物进行多重PCR反应，将使样品的扩增效率下降。因此对于高度集成的诊断芯片，这种特异引物扩增的方法几乎无法实现所有样品的扩增要求。另外，PCR扩增过程易于发生的假阳性，样品RNA的降解所造成的引物区的缺失也会增加检测的假阴性率。

本文报告一种新的通用标记方法：即随机引物和通用引物 U_2 联合标记(universal primer U_2 labeling, UPL)法。该方法在逆转录合成cDNA第一链后加入 U_2 NN扩增10个循环，然后再用cy3- U_2 来扩增标记样品。本研究还将这种标记方法与两种RD标记法[9][10]和随机引物逆转录掺入标记法进行了比较，通过检测均一化荧光强度值、背景值和信噪比值、探针的真阳性率和阴性符合率以及标记方法的可重复性来衡量随机引物和通用引物 U_2 联合标记在样品标记中的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和试剂盒 流感病毒株 H_1N_1 (A/GD/376/01)、 H_3N_2 (A/GD/448/01)、B(B/GD/704/04)取自广东省CDC, AMV逆转录酶、E. coli Polymerase I、E. coli Ligase、Random Primer(6mer)、Ribonuclease Inhibitor、E. coli RNase H、T4 DNA Ligase、Taq酶和限制性内切酶Sau3A I等均购自TakaRa公司，接头(SIP:5' pGATCmCACACCAGCCAAACCCA3' ; SIR:5' GGTTGGCTGGTGTG3')由BIOASIA公司合成，针对T载体设计的测序引物(SO 100: 5' GTAAAACGA CGACGCCAGT 3'; SO101:5' CAGGAAACAGCTAT GAC 3')以及Cy3标记的通用引物 U_1 (5' GTTTGGCT GGTGTGGATCU-Cy3 3')， U_2 NN(CTATACTGAGTC GTTGAT CNN，其中NN代表A、T、C、G四种碱基)和Cy3- U_2 由Tri-link公司合成，Poly-L-Lysine购自Sigma公司，硅烷化玻片基片购自DAKO公司，DMSO及Formamide购自Amresco公司。寡核苷酸探针采用ABI 3900 DNA合成仪，由本室合成。

1.1.2 仪器 3900 DNA合成仪和3730测序仪均购自ABI公司，PixSys 5500基因芯片打印仪购自Cartesians公司，杂交盒购自Corning公司，GenePix扫描仪购自Axon公司，紫外交联仪购自BIO-RAD公司，DU530紫外分光光度仪购自Beckman公司。

1.2 方法

1.2.1 流感病毒寡核苷酸探针的设计与合成 从GeneBank中获得流感病毒代表株的基因序列：NC_004521.1、NC_004523.1、AB101673.1、AF348177.1、L11142.1、AF348181.1、NC_002016.1、NC_002210.1、NC_002208.1、AF532545.1、AY139077.1，按照寡核苷酸探针设计的一般原则设计60mer寡核苷酸探针[5]共77条，探针由本室ABI 3900 DNA合成仪合成。

1.2.2 探针的固定 将寡核苷酸探针溶于50%DMSO，调整浓度为1 mg/ml，用OmniGrid 300芯片打印仪固定在UltraGAPSTM Slides上，包括2个空白对照和一个针对绿色荧光蛋白设计的60 mer的探针作为阴性对照。点的直径为120 μ m，点距300 μ m，每个样品3个重复点。打印后的芯片置于紫外交联仪中交联，能量强度为600 mJ。

1.2.3 流感病毒RNA的提取 MDCK培养的流感病毒株 H_1N_1 、 H_3N_2 和乙型流感病毒200 μ l，5 000 r/min离心2 min，取140 μ l上清用QIAGEN试剂盒抽提其中的RNA，方法参照试剂盒说明书，提取的RNA溶于50 μ l DEPC处理水。DU530紫外分光光度仪上测浓度为90~120 μ g/ml， $D_{260/280}$ 的比值在1.8~2.0之间。提取的RNA混匀后取2 μ g分别用下列四种荧光标记方法进行处理。

1.2.4 UPL 在合成cDNA一链后先用随机引物 U_2 NN扩增，由于随机引物 U_2 NN末端的6个碱基序列为GATCNN，相当于在Sau3AI识别位点(GATC)，它会在模板的Sau3AI酶切位点处与模板形成6个碱基的配对结合。在扩增约10个循环后，反应混合物中就会出现5'端含有 U_2 序列、平均长度约为300个碱基的双链DNA片段，然后用cy3- U_2 对这些DNA片段进行扩增标记(图1)。cDNA一链产物5 μ l， U_2 NN 40 pmol，2 \times premix 25 μ l，用双蒸水调整体积至50 μ l，95 $^{\circ}$ C 5 min，然后95 $^{\circ}$ C 30 s，40 $^{\circ}$ C 2 min，72 $^{\circ}$ C 1 min，共10个循环。取第一轮扩增产物5 μ l，cy3- U_2 40 pmol，2 \times premix 25 μ l，加双蒸水至总体积为50 μ l。扩增条件为95 $^{\circ}$ C 5 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，52 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1 min共35个循环；72 $^{\circ}$ C延伸7 min。扩增产物于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，并用3S PCR纯化试剂盒纯化标记产物(图1)。

— Cy3-U₁ — U₂NN — GATC/NN — DNA templates

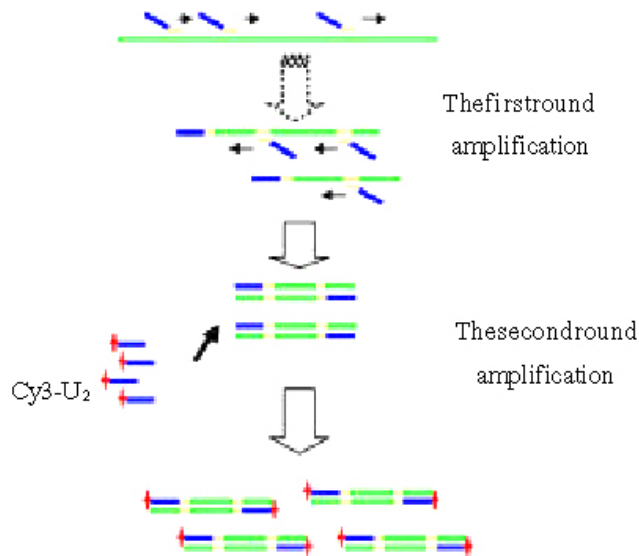


图1 UPL 流程图
Fig.1 Schematic model of the process of UPL

1.2.5 RD直接标记(RD-direct) 将样品RNA逆转录合成cDNA第一链、第二链,用Sau3AI酶切新合成的双链DNA,产生平均大小约300~500 bp的具有GATC粘性末端的双链DNA,将设计的具有GATC粘性末端的接头与酶切片段连接,最后用5'末端连有cy3的根据接头序列设计的通用引物U₁扩增标记连有接头的酶切片段,具体方法参照文献[4~5]。

1.2.6 RD掺入标记(RD-incorporate) 方法二中的连接产物1 μl、引物U₁ 50 pmol、2×premix 25 μl、cy3-dUTP 4 nmol,加双蒸水至总体积为50 μl,扩增条件为95 °C, 5min, 然后95 °C 30 s、55 °C 1 min、72 °C 1 min共35个循环,最后72 °C延伸7 min,扩增产物于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。用3S PCR纯化试剂盒除去引物、酶和未结合的脱氧核苷酸。

1.2.7 随机引物逆转录掺入标记(RT-PSL) 在逆转录合成cDNA第一链的过程中掺入cy3-dUTP,方法参照文献[6]。

1.2.8 杂交 将上述荧光标记物真空抽干后溶于3 μl双蒸水,95 °C变性5 min后,立即冰上冷却1 min,加入等体积杂交液混匀,10 000 r/min离心2 min,取3 μl杂交混合液滴加在阵列上,盖上盖玻片,于corning杂交盒内42 °C杂交12 h。

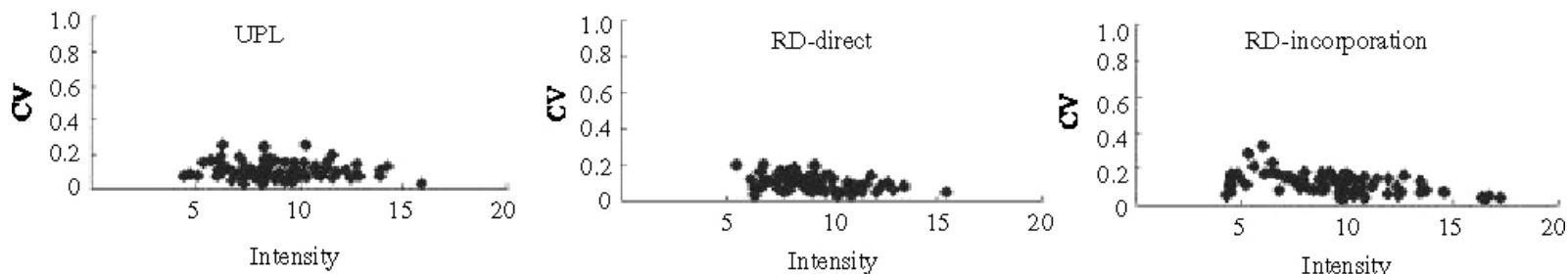
1.2.9 洗脱 从杂交盒内取出芯片,迅速放入42 °C预热的洗脱液1(2×SSC, 0.2%SDS)中冲去盖玻片,然后依次于洗脱液1、洗脱液2(0.1×SSC, 0.2%SDS)中各清洗10 min,洗脱液3(0.1×SSC)中清洗5次,每次1 min。去离子水漂洗1 min,无水乙醇脱水,自然晾干,遮光室温保存。

1.2.10 芯片扫描和结果分析 芯片在洗脱后立即在Agilent扫描仪上扫描,用Agilent Feature Extration软件对扫描图像进行读取和分析,获得每一种样品与芯片杂交后的荧光强度的原始值,荧光强度的均一化处理由软件自带的功能扣除局部背景和进行染色标准化。杂交结果的判读:点的荧光强度值高于局部背景值的2倍定为阳性,否则判为阴性信号。每一种标记方法重复5次,将每个点均一化荧光强度值取均值并进行对数变换后用SPSS 10.0进行统计分析,四种方法间荧光强度、信噪比、局部背景和变异系数的比较采用单因素方差分析的SNK检验;另外针对每种标记方法对重复标记的5块芯片上的阳性信号的个数分别取平均值,采用 χ^2 检验分析探针的真阳性率。

2 结果

2.1 荧光强度、背景和信噪比的比较

结果显示方法一、二、三标记的样品的荧光强度和信噪比显著高于方法四(P<0.01,见图2,表1),而方法一、二、三间不存在显著性差异;另外背景值比较中这四种标记方法之间存在显著性差异,其中方法四的背景强度最低,但是这四种方法背景强度的差值较小。



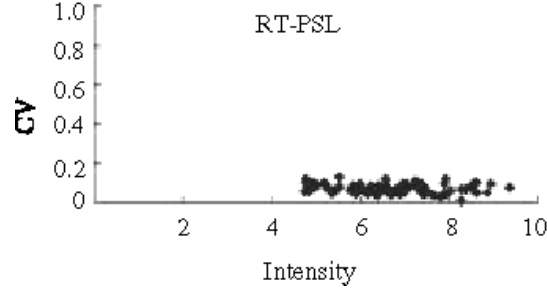


图2 四种标记法的重复性试验

Fig.2 Reproducibility of the 4 labeling methods

UPL: Universal primer U₂ Llabeling; RD-direct: Restriction display direct labeling; RD-incorporation: Restriction display incorporation labeling; RT-PSL: Reverse transcription-coupled random primer spiking labeling method

表 1 四种方法荧光强度、背景和信噪比的比较

Tab.1 Comparison of fluorescence intensities, signal to noise ratio (SNR) and local background of the 4 labeling methods

Method	Fluorescenceintensity	SNR	Localbackground
UPL	9.09	3.64	5.45
RD-direct	9.38	3.97	5.42
RD-incorporate	9.05	3.57	5.48
RT-PSL	7.68	2.45	5.23

2.2 探针的真阳性率

所有的芯片上的用于作阴性对照的探针均为阴性信号，而部分流感检测探针的杂交结果也为阴性。对流感检测探针的真阳性率进行卡方分析来评价标记效率，结果显示四种方法的探针真阳性率存在显著性差异($\chi^2=47.083$, $P=0.000$)，其中方法二的标记效率最高，达99.5%，方法四的标记效率最低，为61.0%，方法一的标记效率略低于方法二，为90.9%(表2)。

表 2 探针的真阳性率

Tab.2 True positive ratio of the probes

	UPL	RD-direct	RD-incorporate	RT-PSL
Positivesignal	70	76.6	63.8	47
Negativesignal	7	0.4	13.2	30
Truepositiveratio(%)	90.9	99.5	82.9	61.0

2.3 标记方法的可重复性分析

方法一的平均变异系数为0.0707，明显低于其它三种方法(P值小于0.01)。而其他三种方法重复标记的变异则无显著差异。以变异系数和荧光强度作图如下，芯片上绝大多数点的变异系数在0.2以下。

3 讨论

芯片杂交检测过程中，样品的荧光标记是极其关键的一个步骤，特别是对于RNA样品，由于其易于降解，探索更快速和有效的标记技术，将对基因芯片技术的应用和推广具有重要的实用价值。

与传统标记方式比较，本文报告的UPL标记方法具有更简化的操作步骤。实验检测发现，UPL标记较传统的cDNA逆转录-随机引物标记法具有荧光强度和信噪比等方面明显的优势。

在本实验比较过程中，以引入探针的真阳性率这个新参数来评价四种标记方法的标记效率。对于不同的标记方法，荧光标记的样品往往无法与芯片上的所有阳性探针杂交并被判定为阳性信号。这可能是因为样品扩增的过程中由于循环的条件和引物的特异性差异，而存在一定选择性扩增。某些基因片段由于不适合扩增的条件，而在标记的阶段只有少数目标基因上荧光分子。当少量的分子与芯片杂交后，由于荧光强度较低而被当作背景处理；或是在标记的过程中扩增的效率较低，只有部分丰度较高的DNA分子会有较高的荧光标记效率。探针的真阳性率无疑是衡量标记效率的一个重要的指标。在本研究中，UPL方法的探针真阳性率均高于其它两种掺入标记方法，这表明用5'端连有cy3的引物来扩增标记样品，可以使样品的标记更加均一而且高效。随机引物逆转录掺入标记法由于标记的样品量太少，许多丰度较低的基因杂交

的信号强度因与背景相当(低于背景值的2倍), 进而被判为阴性信号。

随机引物和通用引物 U_2 联合标记、RD直接标记、RD掺入标记和随机引物逆转录掺入标记法、均可以针对任意序列的基因RNA或DNA序列。然而随机引物逆转录掺入法由于不能对样品进行扩增, 因而无法检测到样品中微量的疾病或病原体DNA。在本研究中, 用于标记的流感病毒RNA均为2 μ g, UPL方法的样品的荧光强度均一化值和信噪比与两种RD标记法相当, 但是显著高于未对样品进行扩增的随机引物逆转录掺入标记法。四种标记方法所产生的芯片背景值的差别不大, 但是由于芯片的背景较为均一, 芯片间的微小差异在统计学分析中也具有显著性差异。在标记方法的可重复性评价中, UPL标记法明显优于其它三种方法, 全部点的变异系数均在0.2以下。本研究参与评价的四种方法中, UPL标记法与两种RD标记法在各种指标的评测中表现相当, 而前者的标记步骤明显较后者简单, 因而将它用于临床样品的标记中具有标记效率高、重复性好和操作简便等优点。该方法是否适用于其它更微量的临床样品, 有待于进一步的验证。

参考文献:

- [1] 李 凌, 马文丽. DNA 芯片技术: 新一代基因诊断技术[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(4): 309-11.
- [2] Kawaguchi K, Kaneko S, Honda M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1701-4.
- [3] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99(24): 15687-92.
- [4] Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 781-8.
- [5] 黄 海, 马文丽, 董兴齐, 等. 基因芯片用于鼠疫快速诊断的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(1): 47-9. Huang H, Ma WL, Dong XQ, et al. DNA microarray for the detection of Yersinia pestis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(1): 47-9.
- [6] 张冬雷, 王惠民, 施 健, 等. DNA芯片检测乙型肝炎病毒基因多态性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(1): 57-60. Zhang DL, Wang HM, Shi J, et al. Detection of polymorphism of hepatitis B virus gene by DNA microarray[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2004, 24(1): 57-60.
- [7] 单万水, 单金岚, 詹能勇, 等. DNA芯片快速检测耐利福平结核分枝杆菌rpoB基因突变[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(11): 680-2. Shan WS, Shan JL, Zhan NY, et al. Rapid detection of mutation in the rpoB gene of rifampin resistant mycobacterium tuberculosis by DNA chip[J]. Chin J Lab Med, 2003, 26(11): 680-2.
- [8] Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 696-704.
- [9] Li L, Ma WL, Zhu J, et al. A modified restriction display PCR method in sample-labelling of DNA microarray [J]. J Virol Methods, 2003, 4(1): 71-5.
- [10] 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(6): 548-53. Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- [11] 石 嵘, 马文丽, 吴清华, 等. 用于SARS冠状病毒检测的60 mer寡核苷酸基因芯片的设计及应用[J]. 科学通报(Chin Sci Bull), 2003, 48(12): 1237-41.
- [12] 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] 李 凌, 马文丽. DNA 芯片技术: 新一代基因诊断技术[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(4): 309-11.
- [2] Kawaguchi K, Kaneko S, Honda M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1701-4.
- [3] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99(24): 15687-92.
- [4] Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 781-8.
- [5] 黄 海, 马文丽, 董兴齐, 等. 基因芯片用于鼠疫快速诊断的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(1): 47-9. Huang H, Ma WL, Dong XQ, et al. DNA microarray for the detection of Yersinia pestis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(1): 47-9.
- [6] 张冬雷, 王惠民, 施 健, 等. DNA芯片检测乙型肝炎病毒基因多态性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(1): 57-60. Zhang DL, Wang HM, Shi J, et al. Detection of polymorphism of hepatitis B virus gene by DNA microarray[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2004, 24(1): 57-60.
- [7] 单万水, 单金岚, 詹能勇, 等. DNA芯片快速检测耐利福平结核分枝杆菌rpoB基因突变[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(11):

Shan WS, Shan JL, Zhan NY, et al. Rapid detection of mutation in the rpoB gene of rifampin resistant mycobacterium tuberculosis by DNA chip[J]. Chin J Lab Med, 2003, 26(11): 680-2.

[8] Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 696-704.

[9] Li L, Ma WL, Zhu J, et al. A modified restriction display PCR method in sample-labelling of DNA microarray [J]. J Virol Methods, 2003, 4(1): 71-5.

[10] 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(6): 548-53.

Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.

[11] 石嵘, 马文丽, 吴清华, 等. 用于SARS冠状病毒检测的60 mer寡核苷酸基因芯片的设计及应用[J]. 科学通报 (Chin Sci Bull), 2003, 48(12): 1237-41.

[12] 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](#)