

两种限制性标记方法提高基因芯片杂交结果的信噪比

石嶸¹袁文丽¹袁艳斌¹袁凌¹袁刘翠华¹袁文岭²渊第一军医大学分子生物学研究所袁广东广州 510515曰
²广州军区广州总医院医学实验科袁广东广州 510010冤

摘要院目的 研究采用荧光标记的通用引物扩增或在扩增中掺入荧光标记 dNTP 两种限制性荧光标记方法标记探针提高表达谱基因芯片杂交结果信噪比的作用遥方法 酵母 mRNA 经常规逆转录标记方法及两种限制性标记方法进行标记袁探针纯化后与酵母表达谱基因芯片进行杂交袁在同等条件下进行杂交后清洗和芯片扫描检测遥结果 两种限制性标记方法与直接逆转录标记相比杂交结果背景低袁信噪比及灵敏度高袁其中以荧光标记的通用引物扩增效果最佳遥结论 采用限制性标记方法后杂交结果信噪比提高袁有利于基因芯片技术的应用遥

关键词院限制性标记曰荧光素曰基因芯片曰限制性显示 PCR

中图分类号院754;R394 文献标识码院 文章编号院000-2588(2003)02-0124-03

Two restriction fluorescence labeling methods for enhancing the signal-to-noise ratio of cDNA microarray hybridization

SHIRong¹, MAWen-li¹, SONGYan-bin¹, LILing¹, LIUCui-hua¹, ZHENGWen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Medical Experiment, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To study the signal-to-noise ratio (SNR) of two restricted fluorescence labeling methods for examining gene expression profile by microarray hybridization. Method Samples of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA was labeled by traditional reverse transcription method and 2 restriction fluorescent labeling methods using respectively Cy-universal primer and extension incorporated Cy-dNTP. The labeled samples were examined by the microarray, followed by washing and scanning under the same conditions. Results The two restriction labeling methods showed superior results with lowered background and enhanced SNR and sensitivity, and Cy-universal primer labeling presented the best results. Conclusion SNR can be enhanced by the restriction labeling methods, which improve the applicability of microarray technology.

Key words: restriction labeling; fluorescent labeling; microarray; restriction display polymerase chain reaction

表达谱基因芯片是近年来兴起的一种新技术袁采用高通量的方式袁检测不同细胞或不同状态下生物细胞基因的表达差异袁发现新基因或基因新功能遥基因芯片技术对杂交过程要求比较严格袁以达到较高的信噪比及灵敏度遥通常的做法包括加入一些封闭剂袁如小牛血清白蛋白尧ot-I DNA尧oly(A)等以降低背景遥我们通过采用一种新的样品标记过程袁两种限制性标记方法来放大信号强度袁提高信噪比及灵敏度袁得到较好的效果遥

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袁NA 抽提试剂参照文献咱馨制备曰QuickPrep mRNA 纯化试剂盒尧y5-dUTP 来自 Amersham Pharmacia 公司曰反转录酶为 Gibco 公司 Superscript 域曰aq 酶尧4 连接酶尧nase H 等购自 Takara 公司曰SPCR 产物纯化试剂盒购自上海博彩公司曰CMT-GAPS 表面氨基化玻片购自 Corning 公司曰DMSO 及 Formamide 购自 Amresco 公司遥

1.2 方法

1.2.1 酵母总 RNA 的提取 参照文献咱馨

1.2.2 靶基因片段的制备 应用 RD-PCR 技术咱馨构建酵母细胞正常生长状态下的 cDNA 片段文库咱馨袁从中选择克隆扩增遥PCR 产物经纯化后袁经紫外分光光度计 DU530 测定浓度袁用 DMSO 调整浓度为 0.5mg/ml袁加样至 384 孔板中备用遥

1.2.3 芯片的制备 用 Cartesian Pixsys5500 基因芯片打印仪和 CMT-GAPS 玻片进行点样袁然后用 BIO-RAD 紫外交联仪以 150mJ 的总能量进行交联固定袁0 益干烤 2 h 后备用遥

1.2.4 探针的制备

1.2.4.1 逆转录标记 提取总 RNA 后袁用 mRNA 纯化

收稿日期院002-09-30

基金项目院国家自然科学基金渊9880032冤广州市重点科技攻关项目渊9202201冤

Supported by National Natural Science Foundation of China 渊9880032冤 and this study is also a Guangzhou Municipal Key Sci-Tech Research Project 渊9202201冤

作者简介院石嶸渊977-冤男袁袁陕西杨陵人袁第一军医大学在读硕士研究生袁电话院20-61640114-89098袁mail:shirong@fimmu.edu.cn

技术而言袁采用通用引物扩增袁每条加上接头的链都能得到比较均一标记袁因此更为确实袁标记效率更高曰掺入 Cy5-dUTP 标记方法袁由于受到模板碱基排列顺序的影响袁掺入具有一定的随机性和不可控性袁因此相对标记效率及真实性较低遥

参考文献院

咱暂 Satio-HisaminatoA, Katagiri T, KakiuchiS, et al. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNAmicroarray咱暂 DNARes,2002,9(2):35-45
 咱暂 SchmittME, BrownTA, TrumppowerBL. A rapid and simple method for preparation of RNA from Saccharomyces cerevisiae咱暂 Nucleic Acids Res, 1990,18(10):3091-2.
 咱暂 祝 骥, 马文丽, 李 凌, 等. 一种限制性 cDNA 文库的构建咱暂 遗传,2002,24(2):174-6.

ZhuJ, MaWL, LiL, et al. A method for construction of restriction cDNA library[J]. Hereditas(Beijing), 2002,24(2):174-6.
 咱暂 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咱暂 西安交通大学学报(医学版)冤 2002,23(3):246-9.
 LiuLY, MaWL, SongYB, et al. Application of RD-PCR technology in the study of yeast gene expression [J]. JXi'an Med Univ, 2002,23(3):246-9.
 咱暂 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咱暂 第一军医大学学报, 2002,22(8):724-6.
 MaoXM, MaWL, JiangL, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis咱暂 FirstMilMedUniv, 2002,22(8):724-6.
 咱暂 SpellmanPT, SherlockG, ZhangMQ, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization咱暂 Mol Biol Cell, 1998, 9(12): 3273-97.

异位甲状腺 1 例报告

Ectopic thyroid: report of one case

姚红兵袁袁爱国袁袁卉娟袁第一军医大学珠江医院普通外科袁广东 广州 510282 冤

关键词院甲状腺 / 畸形

中图分类号院 653 文献标识码院 B 文章编号院 000-2588(2003)02-0126-01

1 病例资料

患者女袁 1 岁袁因发现胸锁关节包块 3 个月入院遥 查颈部软袁气管居中袁双侧甲状腺不肿大遥 胸锁关节稍偏右侧可触及一约 3 cm 伊 3 cm 肿块袁边界清晰袁无触痛袁肿块与基底无粘连袁活动度尚可遥 辅助检查院 超声双侧甲状腺大小尧位置正常曰 碘同位素扫描示双侧甲状腺大小尧部位及功能状况均正常遥 手术将肿物完整切除后袁送病理确诊为甲状腺组织遥 术后检查患者血清中三碘甲状腺原氨酸尧甲状腺素水平正常遥 短期内无并发症袁出院后随访半年袁无复发和并发症出现遥

2 讨论

异位甲状腺是指甲状腺正常位置以外出现的甲状腺组织袁是由于胚胎时期部分或全部甲状腺胚基离开系统发育而成袁发生于舌根部袁其次为舌内尧舌下尧舌骨下尧气管尧食管及纵隔袁偶见于软腭尧鼻窦尧卵巢等处遥 异位甲状腺存在性别差异袁

多见于女性袁男女比例约 1 冤 其原因通常被认为是女性对甲状腺激素的需要量比男性要大得多遥 异位甲状腺异位分真性异位尧假性异位和完全异位三种类型袁治疗上也因异位类型不同而有所不同遥 一般来讲袁真性异位可手术切除异位组织袁无需其他特殊治疗遥 本例为前纵隔内真性异位袁异位和正常部位同时存在甲状腺组织袁因此外科手术切除异位甲状腺组织后不致影响甲状腺功能遥 假性异位可行部分切除遥 对完全异位者手术治疗时应慎重袁术前应尽量明确诊断袁若保留有部分甲状腺组织袁其功能可经残存甲状腺组织增生后代偿曰若完全切除袁术后应予甲状腺素替代治疗遥 无论什么类型袁术后均应复查甲状腺功能并进行随访袁以便及时发现复发袁及时治疗遥

参考文献院

咱暂 RosaiJ, 回允中. 阿克曼外科病理学渊上册冤咱暂第 8 版. 沈阳: 辽宁教育出版社, 1999.495.
 咱暂 FarrelIML, ForerM. Lingualthyroid咱暂 AustNZLSurg, 1994,64(2):135-8.
 咱暂 BaughmanRA. Lingualthyroid and lingualthyroglossaltract remnants咱暂 OralSurg, 1972,34(5):781-99.

收稿日期院 002-09-09

作者简介院 姚红兵袁 1974-袁男袁湖南常德人袁第一军医大学在读硕士研究生袁 电话院 20-61643211