

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袁邵文岭²袁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对提高表达谱基因芯片杂交结果信噪比的作用。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，探针纯化后与酵母表达谱基因芯片进行杂交，在同等条件下进行杂交后清洗和芯片扫描检测。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，信噪比及灵敏度高。其中以荧光标记的通用引物扩增效果最佳。结论 采用限制性标记方法后杂交结果信噪比提高，有利于基因芯片技术的应用。

关键词限制性标记 荧光素 基因芯片 限制性显示 PCR

中图分类号 Q754.239 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(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。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。发现新基因或基因新功能。基因芯片技术对杂交过程要求比较严格。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

收稿日期 2002-09-30

基金项目 国家自然科学基金 9880032 广州市重点科技攻关项目 9202201

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

作者简介 石 嶸 977-袁男 袁陕西杨陵人 袁第一军医大学在读硕士研究生 袁电话 20-61640114-89098 袁-mail: shirong@fimmu.edu.cn

州总医院医学实验科 RNA 抽提试剂参照文献咱制备。QuickPrep mRNA 纯化试剂盒、³²P-dUTP 来自 Amersham Pharmacia 公司；反转录酶为 Gibco 公司 Superscript Ⅱ RT 酶、连接酶 Klenow H 等购自 Takara 公司；SPCR 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 参照文献咱制备

1.2.2 靶基因片段的制备 应用 RD-PCR 技术咱构建酵母细胞正常生长状态下的 cDNA 片段文库。从人群中选择克隆扩增 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 Pixsys 5500 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，益干烤 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

试剂盒进行纯化袁取 8 滋 mRNA 进行逆转录袁以 Cy5-dUTP 进行标记袁参照文献¹的方法袁大约每 6 个碱基掺入一个荧光分子遥

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 第一链后袁继以 RNaseH 切割杂化双链中的 mRNA 袁并作为合成 cDNA 第二链的引物延伸成双链 cDNA 袁用 Sau3A 玉酶切酶切片段加接头[由两条单链 SIP 潤'pGATCmCACACCAGC CAAACCCA3';和 SIR 潤'GGTTGGCTGGTGTG3'袁逐渐降温退火合成通用接头]遥加入 25 滋 2 伊 CR 缓冲液²0mmol/LKCL 袁 0mmol/LTris 潤 HCl pH 8.3 袁 3mmol/LMgCl₂ 潤 2mmol/L 潤 模板袁 潤 Cy5 荧光标记的通用引物³TTGGCTGGT GTGGATCU-Cy5 袁 ddH₂O 至体积为 49 滋袁最后加入 1 滋 TaqDNA 聚合酶遥 95 益变性 5min 后袁进行 RD-PCR 扩增袁 8 个循环⁴5 益 30s 袁 0 益 30s 袁 2 益 60s 袁最后 72 益延伸 7min 遥

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 滋作模板袁使用不标记荧光通用引物 2 滋袁 25 滋 10 伊 CR 缓冲液袁 潤 dNTP 潤 2mmol/L 潤 5 滋

Cy5-dUTP 潤 mmol/L 袁 ddH₂O 至体积为 49 滋袁最后加入 1 滋 TaqDNA 聚合酶袁 CR 反应条件同 1.2.4.2 遥 1.2.5 杂交与检测 芯片先在预杂交液 潤 5% Formamide 袁 0.1% SDS 袁 中杂交袁 2 益温育 45min 遥 在经 3SPCR 产物纯化试剂盒纯化的探针中加入等体积的 2 袁杂交液后袁 5 益变性 5min 袁 4000r/min 离心 1min 袁冷却袁 4 滋滴加到阵列上袁盖上盖玻片封闭袁 2 益杂交 16 h 遥然后依次在 2 袁 SC/0.1% SDS 袁 0.1 袁 SC/0.1% SDS 袁 1 袁 SC 溶液中清洗玻片袁 菌水漂洗后袁无水乙醇脱水袁室温下干燥遥用 GSILumonics 公司的 ScanarryLite 进行扫描遥

2 结果

3 种标记方法标记的探针与芯片杂交后袁在激发光源能量为 95% 袁信号增益为 72% 的情况下扫描结果见图 1 袁由图中可以看出袁经过限制性扩增的探针与芯片杂交结果的背景小袁阳性信号强袁信噪比高而而经常规逆转录标记的探针杂交结果背景高袁阳性信号弱袁信噪比低遥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遥

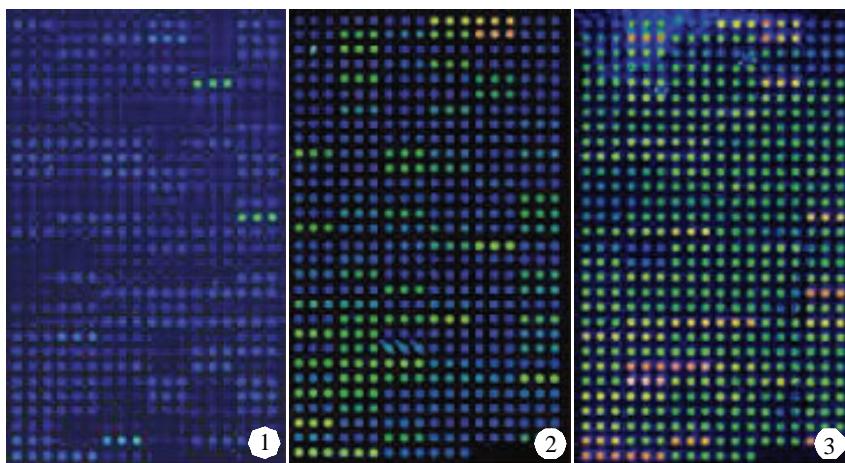


图 1 常规逆转录标记

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袁信噪比高袁才能有效地进行下一步杂交后分析遥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遥降低背景的方法除需有性能卓越的激光共聚焦扫描仪外袁还包括以下几个方面⁵1.选择优质基质材料⁶2.硅片⁷3.优质玻片等⁸4.选择较好的基质包被试剂⁹5. Corning 公司的 GAPS 及 Ultra GAPS 包被玻片¹⁰6.印后的清洗封闭¹¹7.杂交¹²8.交液中加入一些阻断剂¹³9.封闭芯片上的位点¹⁴10.纯化探针分子等遥对于氨基包被的玻片而言袁 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袁另外 DNA 的胸腺嘧啶残基与烷胺基之间以自由基

作用相互结合袁这种天然 DNA 与基片表面的静电或非特异性共价结合是稳定的袁并且对于标记探针来说是绝对过量的袁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遥

在一定循环之内袁 CR 的扩增与目的片段的量具有线性关系袁而限制性扩增技术利用 Sau3A 玉的识别特性袁大约每隔 200bp 就可能有一个酶切位点袁而将 cDNA 切成大小比较均匀的限制性酶切片段袁加上接头后进行 PCR 扩增得到的探针长短比较均一袁扩增也比较均衡袁有利于杂交时退火温度的控制袁保证了杂交的一致性和可信度遥从所获的杂交结果可以看出袁经限制性扩增标记的探针袁杂交后的信噪比明显高于逆转录标记遥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的标记。因此更为确实，标记效率更高。但掺入 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。

参考文献院

- 咱暂 Satio-Hisamino A, Katagiri T, Kakiuchi S, et al. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNARes*, 2002, 9(2):35-45.
- 咱暂 Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *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. *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.

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. *西安交通大学学报*, 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.

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. *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]. *First Mil Med Univ*, 2002, 22(8):724-6.

咱暂 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.

异位甲状腺 1 例报告

Ectopic thyroid: report of one case

姚红兵¹, 爱国², 朱卉娟², 第一军医大学珠江医院普通外科¹, 广东 广州 510282²

关键词 甲状腺 / 畸形

中图分类号 R653 文献标识码 B 文章编号 1000-2588(2003)02-0126-01

1 病例资料

患者女，1岁。因发现胸锁关节包块3个月入院。体检：颈软，气管居中，双侧甲状腺不肿大。胸锁关节稍偏右侧可触及一约3cm×3cm肿块，质中，边界清晰，无触痛。肿块与基底无粘连，活动度尚可。辅助检查：超声双侧甲状腺大小、部位及功能状况均正常。碘同位素扫描示双侧甲状腺大小、部位及功能状况均正常。手术将肿物完整切除后送病理确诊为甲状腺组织。术后检查患者血清中三碘甲状腺原氨酸和甲状腺素水平正常。短期内无并发症。出院后随访半年无复发和并发症出现。

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。系由于胚胎时期部分或全部甲状腺胚基离开系统发育而成。多见于舌根部，其次为舌内、舌下、舌骨下、气管、食管及纵隔。偶见于软腭、鼻窦、卵巢等处。
甲状腺异位存在性别差异。

多见于女性，男女比例约1.5:1。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。
甲状腺异位分真性异位、假性异位和完全异位三种类型。
治疗上也因异位类型不同而有所不同。
一般来讲，真性异位可手术切除异位组织，无需其他特殊治疗。
本例为前纵隔内真性异位，属假性异位和正常部位同时存在甲状腺组织。
因此外科手术切除异位甲状腺组织后，不影响甲状腺功能。
假性异位可行部分切除。
对于完全异位者，手术治疗时应慎重。
术前应尽量明确诊断。
若保留有部分甲状腺组织，其功能可能残存，甲亢组织增生，后代偿。
若完全切除，术后应予甲状腺素替代治疗。
无论什么类型，术后均应复查甲状腺功能，并进行随访，以便及时发现复发，及时治疗。

参考文献院

咱暂 Rosai J, 回允中. 阿克曼外科病理学上册[译]. 第 8 版. 沈阳: 辽宁教育出版社, 1999.495.

咱暂 Farrell IML, Forer M. Lingual thyroid [J]. *Aust NZ J Surg*, 1994, 64(2):135-8.

咱暂 Baughman RA. Lingual thyroid and lingual thyroglossal tract remnants [J]. *Oral Surg*, 1972, 34(5): 781-99.

收稿日期 2002-09-09

作者简介 姚红兵，男，湖南常德人，第一军医大学在读硕士研究生，医师，电话 20-61643211。