

cDNA 芯片技术杂交效率的优化

马淑华, 王升启*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 cDNA 芯片杂交影响因素很多, 如固定于玻片的 DNA 片段的浓度、溶解 DNA 片段的点样液、荧光探针浓度及纯度杂交液、杂交温度、杂交时间和 Cy3 与 Cy5 荧光素标记探针等, 本实验针对其中重要影响因素进行优化筛选, 以提高杂交效率。方法 通过逐一改变 cDNA 杂交技术重要影响因素的实验条件, 平行设置多组实验, 从中筛选出最佳实验数据。结果与结论 重复实验结果表明, 杂交效率较高的条件为: 浓度约为 $0.50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 片段, 溶于 $1 \times$ Micro Spotting Solution (ArrayIt™) 中, 与纯化后的荧光标记在 0.5% SDS/ $10 \times$ SSC 甲酰胺杂交液, 在 42°C 杂交。

关键词: cDNA 芯片; 杂交效率

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)02 - 0153 - 05

cDNA 芯片技术在近年引起了人们的普遍关注, cDNA 芯片利用核酸双链的互补碱基间的氢键作用, 形成稳定的双链结构, 通过检测目的单链上的荧光信号实现样品的检测。将生物分子有序地放在芯片上检测生化标本的策略具有广泛的应用领域, 目前研究较多是基因表达分析。杂交过程是在液相中的探针与固定的 DNA 片段按碱基配对规则形成双链的反应。杂交是 DNA 芯片技术中除 DNA 阵列构建外最重要的一步, 其复杂程度和具体条件的控制由芯片中 DNA 片段的长短和芯片本身的用途而定。如果是表达检测, 杂交时需要高盐浓度、低温和长时间(往往要求过夜), 但严谨性要求较低^[1]。

材料与 方法

试剂 $1.25 \times$ UniHyb™ hybridization solution (Telechem), 1.0% SDS, Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, 柠檬酸盐 (standard saline citrate, SSC), 50% 二甲基亚砷 (DMSO), ArrayIt™ 96-well PCR Purification kit (Telechem International, Inc.), 氨基片 (Sigma), Wizard PCR Preps DNA purification kit (Promega)。

仪器 ScanArray 3000 芯片扫描仪, ArrayIt

Hybridization Cassette (Telechem), PixSys7500 型点样仪 (Cartesian)。

DNA 片段的制备 利用 PCR 方法扩增 3 个看家基因片段 (β -actin, β -Actin 和 Actin gamma), 1 个 pGEM3Zf 质粒 DNA, 其中看家基因片段的大小在 600 bp 左右。使用 ArrayIt™ 96 孔板纯化试剂盒进行纯化 (TeleChem)。

cDNA 芯片的制备 使用芯片点样仪 (Cartesian) 将 96 孔板中的 PCR 产物点于氨基硅烷化的玻璃片表面 (即氨基片) (Sigma), 制备成 cDNA 芯片微阵列。看家基因作为阳性对照, pGEM3Zf 质粒 DNA 作为阴性对照。

cDNA 芯片的预处理 将玻片悬在一热的超纯水 (Milli-Q) 上再水化, 置于 100°C 热铁板上快干 3 s, 用 TL-2000 Translinker 以 $150 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 进行紫外交联 (UVP, INC)。将 $1 \times$ UniHyb 杂交液 (TeleChem) 加在阵列上预杂交 1 h, 0.2% SDS 洗 5 min, H_2O 洗 5 min, 空气干燥后备用。

组织总 RNA 的提取 Trizol 试剂 (Gibco) 一步法提取 26 周胎儿的正常胎脑组织总 RNA, 1% 琼脂糖电泳证明总 RNA 完整性及无 DNA 污染。

荧光标记探针的制备 反转录 cDNA 第 1 链时掺入荧光素 Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 制备荧光标记探针^[2,3]。并进行紫外分光光度分析以确定合成的 cDNA 的量及掺入的荧光核苷酸的百分比。

杂交 将荧光标记探针溶于 $1 \times$ UniHyb™ 杂交液 (TeleChem), 96°C 4 min 变性, 与预处理的 cDNA 芯片在杂交盒 (TeleChem) 中 65°C 杂交 16 h。杂交后

收稿日期: 2001-06-07。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39889001); 军队杰出人才基金项目。

作者简介: 马淑华 (1974-), 女, 硕士;

王升启 (1962-), 男, 研究员。

* 通讯作者 Tel: (010) 66932211, Fax: (010) 66932211,

E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

依次用 $1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$ 洗 5 min, $0.1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$ 洗 5 min, $0.1 \times \text{SSC}$ 漂洗, 空气中干燥^[2,3]。

杂交结果的检测及图象分析 使用 ScanArray 3000 扫描仪 (GSI Lumonics) 检测杂交结果。用 ImaGene 3.0 软件 (GSI Lumonics) 分析图象, 获得阵列中基因与两种探针杂交的不同信号强度。

杂交效率的优化 ① 固定于玻片的 DNA 片段浓度 将 3 种看家基因片段 γ -Actin, β -Actin 和 G3PDH 稀释为 0.25, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 3 种浓度梯度, 制备双点微阵列以保证结果可信, 即每种基因片段的每个浓度重复印迹两个点, 微阵列中基因片段的定位见表 1。将阵列与 26 周正常胎儿 Cy3 荧光标记 cDNA 探针以上述条件进行杂交, 检测, 比较 3 种 DNA 片段浓度的杂交信号强度。② 溶解 DNA 片段的点样液 将浓度为 0.5, 1.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 G₃PDH, β -Actin 和 γ -Actin 分别溶于 50% DMSO, $1 \times \text{Micro Spotting Solution}$ (ArrayIt™) 点样液中, 将 3 种 DNA 片段及两种空白点样液点于玻片上制备双点微阵列 (微阵列各点在片分布见表 2), 与 26 周正常胎儿 Cy3 荧光标记 cDNA 探针, 65 °C 杂交 12 h, 检测信号比较两种点样液的杂交效率及荧光背景。③ 荧光探针浓度及纯度 杂交液中使用不同浓度荧光标记 cDNA 探针与点于玻片上的阴、阳性对照进行杂交, 筛选荧光探针浓度。此外使用两种纯化方法纯化探针: 乙醇沉淀、Wizard PCR Preps DNA Purification kit (Promega), 筛选回收率及纯度相对高的纯化方法, 并与不纯化探针时的杂交结果做比较, 检测探针纯度对杂交背景的影响。④ 杂交液、杂交温度 为降低成本及进一步提高杂交灵敏度, 以 $1 \times \text{UniHyb}^{\text{TM}}$ Hybridization Solution 获得的杂交结果作为对照, 自行配制 3 种水杂交液: $5 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$, $5 \times \text{SSC}/0.5\% \text{SDS}$, $10 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$, 在 65 °C 杂交 16 h。另外在 3 种杂交液中分别加入 50% 变性甲酰胺, 42 °C 杂交 16 h。比较杂交结果, 筛选杂交液有效成分的最佳浓度。根据信号强弱可继续加入惰性聚合物, 以筛选高效的杂交液配方, 并在具体实验中验证杂交液中的决定因素。⑤ 杂交时间 为了缩短实验周期, 将探针溶于 $1 \times \text{UniHyb}^{\text{TM}}$ Hybridization Solution 中, 与 1 中的微阵列分别杂交 4, 6, 10, 12, 16, 24 和 32 h。⑥ Cy3 与 Cy5 荧光素标记探针 在制备荧光探针时, 平行使用 Cy3 与 Cy5 荧光素分别标记, 将两种探针等比例混合溶于 $1 \times \text{UniHyb}^{\text{TM}}$ Hybridization Solution 中, 与 ① 中的微阵列杂交, 使用 ScanArray 3000 芯片扫描仪分别检测 Cy3 道与 Cy5 道信号。

Table 1 The dilution design of DNA fragments in the array

	a	b	c
A	γ 0.25	β 0.25	G 0.25
B	γ 0.25	β 0.25	G 0.25
C	γ 0.50	β 0.50	G 0.50
D	γ 0.50	β 0.50	G 0.50
E	γ 1.00	β 1.00	G 1.00
F	γ 1.00	β 1.00	G 1.00

Three DNA fragments (γ : γ -Actin, β : β -Actin, G: G₃PDH) are spotted in the array. The numbers in the table represent different DNA concentration ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Table 2 The spotted array of DNA in different solutions

	a	b	c	d
A	SI- γ 0.50	SI- β 0.50	SI-G 0.50	SI-P 0.50
B	SI- γ 0.50	SI- β 0.50	SI-G 0.50	SI-P 0.50
C	S2- γ 0.50	S2- β 0.50	S2-G 0.50	S2-P 0.50
D	S2- γ 0.50	S2- β 0.50	S2-G 0.50	S2-P 0.50
E	S2- γ 1.00	S2- β 1.00	S2-G 1.00	S2-P 0.50
F	S2- γ 1.00	S2- β 1.00	S2-G 1.00	S2-P 0.50

Three DNA fragments (γ : γ -Actin, β : β -Actin, G: G₃PDH) dissolved in SI and S2 are spotted in the array. SI: $1 \times \text{Micro Spotting Solution}$, S2: 50% DMSO, P: pGEM3Zf plasmid DNA. The numbers in the table represent different DNA concentration ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

结果与讨论

1 组织总 RNA 的琼脂糖电泳结果

总 RNA 较完整无 DNA 污染 (图 1)。

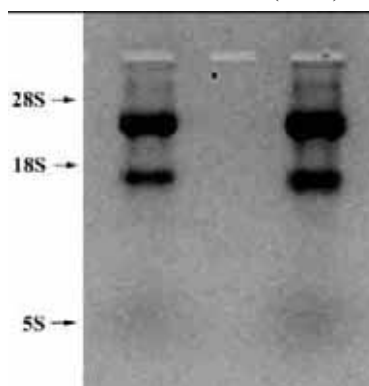


Figure 1 Total RNA electrophoresis of 26-week fetal brain

2 固定于玻片的 DNA 片段浓度的影响

在一定的 DNA 片段浓度范围内, 荧光信号强度与最终固定于玻片上的 DNA 量成正比, 实验结果 (图 2) 显示, DNA 片段浓度信号强度依次为 0.50

$\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1} > 0.25 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1} > 1.00 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图3), 其中 DNA 片段浓度为 $0.50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时信号较强 (重复实验 3 次)。在 $0.2 \sim 1.2 \text{ kb}$ 长度信号强度与 DNA 长度无关, 所以在此 DNA 片段长度, 上述结论同样适用。

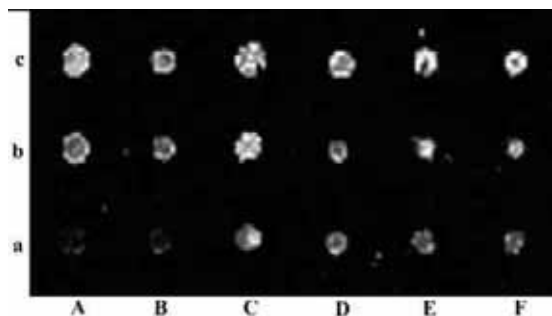


Figure 2 Hybridization of Cy3-labeled probe with diluted DNA

a. γ -Actin; b. β -Actin; c. G_3 PDH

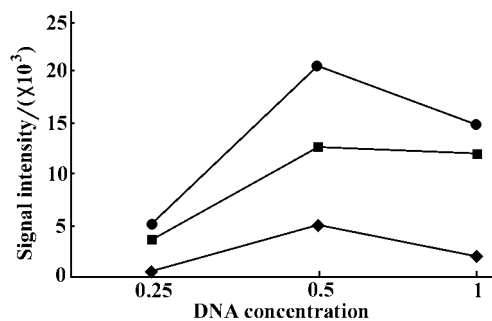


Figure 3 Signal intensity vs DNA concentration of genes

◆—◆ γ -Actin; ■—■ β -Actin; ●—● G_3 PDH

3 溶解 DNA 片段的点样液的影响

分析杂交结果(图4),发现溶于 50%DMSO 中的样品杂交信号非常弱,信噪比几乎为 1,而相同条件下溶于 $1 \times$ micro spotting solution(ArrayIt™)的同样样品的杂交信号强度是溶于 50%DMSO 的样品的 10 倍以上。结果表明在本实验使用的条件下, $1 \times$ micro spotting solution(ArrayIt™)为 DNA 所提供的微环境比 50%DMSO 更有利于提高杂交效率。且 50%DMSO 点样液时 DNA 固定效果不好,制备的点易于扩散。但是 $1 \times$ micro spotting solution(ArrayIt™)对点样时的湿度要求较高,容易干涸,不利于制备成千上万个点的阵列,并且盐浓度高,单个点内部 DNA 分布不均匀。

4 荧光探针浓度及纯度的影响

在 cDNA 芯片的杂交实验中,杂交温度足以除 DNA 中的二级结构,完整的单链分子(300 ~ 3 000 nt)的混合物可以提供很强的杂交信号,而且荧光信

号的强度与样品中靶分子含量呈一定的线性关系。探针的任何内在物理特性均不影响其使用浓度,单位体积杂交液中的探针浓度是影响杂交结果的关键因素,探针浓度影响杂交反应速度,探针浓度低,杂交反应缓慢。然而,探针浓度过高,背景也会增高^[4]。随着探针浓度在一定范围中增加,杂交信号成直线增加,但探针浓度增至一定值时,杂交信号不再增加。所以,最适宜的探针浓度应能获得最强的信号,同时背景又低。结果表明, Cy3 标记荧光 cDNA 探针浓度达到 $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时检测到的信号强度才能区分基因表达。

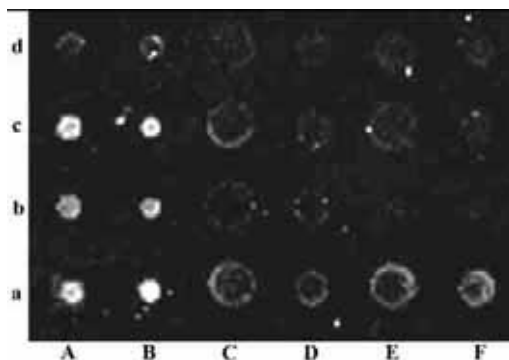


Figure 4 Hybridization of Cy3-labeled probe with DNA in different solutions

a. γ -Actin; b. β -Actin; c. G_3 PDH; d. Blank spotting solution. A ~ B. $1 \times$ Micro Spotting Solution; C ~ F. 50%DMSO

探针是否纯化可针对杂交的荧光背景及非特异性的高低而定。实验结果表明,纯化可以降低杂交荧光背景,并且乙醇沉淀方法回收率高于 Wizard PCR Preps DNA Purification kit。但由于不纯化时通过条件优化能保证较低的荧光背景,所以纯化的意义不大。

5 杂交液、杂交温度的影响

比较几种杂交液的杂交结果发现, 0.5% SDS 效果好于 0.2% SDS, $10 \times$ SSC 效果好于 $5 \times$ SSC, 并且 42°C 变性甲酰胺配置的杂交液杂交效率明显高于 65°C 水溶液配置的杂交液。原因可能是:核酸在盐溶液中复性反应的最适温度是 $60^\circ\text{C} \sim 75^\circ\text{C}$ 。复杂的真核生物核酸复性时要求在此温度下长时间作用,这将导致大量链断裂。最好在降低温度的同时能保证核酸相互作用的严格性,引入甲酰胺即可解决此问题。甲酰胺浓度和 DNA 分子的溶解温度成线性关系。甲酰胺浓度每升高 1%,天然双链 DNA 的熔点就降低 0.72°C ^[5,6]。

复性时,要有足够高的盐浓度,以中和 DNA 双链间磷酸基团的静电斥力,杂交液中 SDS 和 SSC 两种成分是必不可少有效成分。在杂交液中加入 10% 惰性多聚体如硫酸葡聚糖、聚乙二醇等可用来促进 250 bp 以上的杂交率,对单链探针可增加 3 倍,而双链探针随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。其可能是由于大分子硫酸葡聚糖占据了溶液的体积,通过“排挤”,使探针的有效浓度增加,从而使探针在靶基因上形成了网状结构^[7]。

6 杂交时间的影响

合适条件的杂交时间是指:在此期间有 50% 的 DNA 分子复性,如延长时间,通常出现分子间聚合。杂交反应的时间可能随着探针浓度的增加而缩短,一般可杂交过夜。实验结果表明 cDNA 芯片杂交反应达到 8 h 就能保证 DNA 复性,可检测到较强信号并保证杂交的严格度。杂交反应时间不要超过 24 h,反应时间过长,形成的杂交体会解链,杂交信号反而会减弱,背景会增强^[8]。

7 Cy3 与 Cy5 荧光素标记探针的差别

在 Cy3 与 Cy5 探针的等比例混合杂交实验中,发现 Cy5 信号整体低于 Cy3,当扫描一遍时 Cy3 道信号与背景比值为 100,而 Cy5 道未见信号。通过多次扫描去提高 Cy5 道的荧光信号,扫描 6 遍才勉强见到信号。Cy3 道较强信号提示 DNA 制备和固定方法没有危及杂交效率,并且发现若无非特异探针干扰,能较容易地通过多次扫描提高 Cy3 信号强度。用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD₅₇₀ 和 OD₆₇₀,分别计算 Cy3 与 Cy5 的荧光掺入率,发现二者的荧光掺入率无差别。以上现象可能由于 Cy5 探针的杂交效率低于 Cy3,也有人认为 Cy5 道信号难以提高是由于 Cy5 道中玻璃片内在的荧光强度决定的。

8 优化的杂交条件

本文针对 cDNA 芯片杂交重要影响因素进行优化筛选实验,其中涉及固定于玻片的 DNA 片段的浓度、溶解 DNA 片段的点样液、杂交液、杂交温度、杂

交时间、Cy3 与 Cy5 荧光素标记探针等,实验结果确切,形成稳定、高效的杂交体系。现将最优化的杂交条件与其他条件列表比较如下:

Table 3 The optimized hybridization program listed and compared with inferior conditions

Effecting factors	Optimal	Less efficient
DNA concentration	0.50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.25 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
Spotting solution	1 × Micro Spotting Solution	50% DMSO
Hybridization buffer	0.5% SDS, 10 × SSC	0.2% SDS, 5 × SSC
Temperature/ °C	42	65
Time/h	8 ~ 16	> 24
Florescence	Cy3	Cy5

REFERENCES:

- [1] Bowtell DD. Option available from start to finish for obtaining expression data by microarray [J]. *Nat Genet*, 1999, **21** (Suppl):25 - 32.
- [2] Geiss GK, Bumgarner RE, An MC. Large scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays [J]. *Virology*, 2000, **266**(1):8 - 16.
- [3] Xiang CS, Chen YD, Yuan J. cDNA microarray and expression in virus infected cells [J]. *Chin Sci Bull*, 1999, **44**(5):449 - 452.
- [4] Holger M, Peter S, Lukas B, et al. High throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1999, **154**(4):981 - 986.
- [5] Sgroi DC, Teng S, Robinson G. *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 1999, **59**(22):5656 - 5661.
- [6] Loftus SK, Chen Y, Gooden G. Informatic selection of a neural crest melanocyte cDNA set for microarray analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(16):9277 - 9280.
- [7] Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, **21** (Suppl):33 - 37.
- [8] Cheung VG, Michael M, Aguilar F, et al. Making and reading microarray [J]. *Nat Genet*, 1999, **21**(Suppl):15 - 19.

OPTIMIZATION OF HYBRIDIZATION EFFICIENCY IN cDNA CHIP TECHNOLOGY

MA Shu-hua , WANG Sheng-qi

(*Academy of Military Medical Sciences , Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850 , China*)

ABSTRACT: **AIM** There are many factors affecting hybridization in cDNA chip: DNA concentration immobilized on glass surface, spotting solution dissolving DNA, the concentration and purity of fluorescence-labeled probe, hybridization solution, hybridization temperature, hybridization time, Cy3- and Cy5-labeled probes, etc. In order to improve hybridization efficiency, tests were designed to optimize these factors. **METHODS** Factors are changed one by one. Optimal values are selected by comparing those of different groups. **RESULTS AND CONCLUSION** The efficient hybridization condition is as follows: $0.50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA fragments resolved in $1 \times$ Micro Spotting Solution (ArrayIt™) hybridize with purified fluorescent probe in 0.5% SDS / $10 \times$ SSC at 42°C .

KEY WORDS: cDNA chip; hybridization efficiency