

小鼠细胞因子相关基因表达检测寡核苷酸芯片的制备及分析

黄 坚^{1,2} 陈苏红¹ 佟 丽¹ 管 伟¹ 丁 雨² 梁 好² 李五举¹ 王升启^{1*}

¹(军事医学科学院放射医学研究所全军生物芯片重点实验室, 北京 100085)

²(深圳益生堂生物企业有限公司, 深圳 518026)

关键词 基因表达谱, 寡核苷酸芯片, 小鼠细胞因子

中图分类号 Q811.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0501-05

生物芯片技术用于基因表达谱研究是近年来发展起来的一项新技术, 该方法本质上是基于对一玻璃片或膜表面上固定的 cDNA 或寡核苷酸的分子杂交, 这一新技术可同时测定成千上万个基因的作用方式, 几周获得的信息用其它方法可能要几年才能得到, 是以定量方式同时监测大量基因相对表达的强有力的新方法^[1,2]。

国内外目前主要采用 cDNA 芯片进行基因表达的检测, 芯片制备所用的 DNA 探针一般为已知基因 cDNA 克隆的 PCR 扩增产物或 EST 的扩增产物^[3-8]。对基因的表达检测来说, cDNA 芯片技术是一条非常适用的检测方法, 但在有些方面还有不足, 有待于进一步提高和改进, 如必须建立芯片上所有基因的 cDNA 探针库, cDNA 探针的长度、性质彼此相差很大, 很难保证每一个杂交反应都是在其最佳条件下进行的, 容易出现假阳性和假阴性, 需要 PCR 扩增, 产量低, 特异性较差, 杂交时间长, 质控困难等。

寡核苷酸芯片技术用于基因表达谱的研究具有其独特的优点^[9-12], 它不仅大大简化了表达谱芯片制备的程序, 使芯片的制备更加简便易行, 加快芯片制备的进程, 而且由于探针性质统一, 可以统一杂交条件, 进一步提高检测的真实性和准确度, 减少假阳性和假阴性, 在基因表达谱检测方面具有很大的实用价值, 是一种很有发展前景的表达谱检测方法。但以 Affymetrix 公司为代表的光控原位合成制备寡核苷酸表达谱芯片技术存在芯片制备、表达谱检测过程相当复杂以及使用专利方面的问题^[10], 本研究以小鼠细胞因子相关基因等为研究对象, 对用 cDNA 特异的寡核苷酸代替 cDNA 制作寡核苷酸芯片进行基因表达谱的测定进行了方法学上的探索。

1 材料与方 法

1.1 寡核苷酸探针的设计

从 GenBank 中查询人高碱性蛋白、荧光素酶基因序列、

74 种小鼠细胞因子相关基因(包括 β -actin、GAPDH 等 5 种看家基因)的 mRNA 序列, 用本室设计的大规模寡核苷酸探针设计软件 MProbe 设计探针, 探针长度 15 ~ 80nt, GC 含量 45% ~ 55%, 自身无二级结构, 选取编码区近 3' 端探针进行 BLAST 分析, 筛选与小鼠组织总 RNA 序列同源性小于 70% 的探针 1 ~ 2 条作为备用基因特异寡核苷酸探针。

1.2 寡核苷酸合成

寡核苷酸合成在 ABI391 Z DNA 合成仪上完成, 采用标准亚磷酰氨化学方法, 5' 或 3' 氨基修饰用 N-MMTs-6-己基-2-羧乙基-N', N'-二异丙基亚磷酰氨(自制)在合成后的最后一步引入。合成完毕后浓氨水 55°C 脱保护/切割 15h, OPC 柱纯化。

1.3 芯片的制备与后处理

寡核苷酸探针以 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪及醛基化玻璃片(本室自制)进行点片, 点样后放置过夜, 分别用 0.2% SDS、蒸馏水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理 10min, 晾干备用。

1.4 人高碱性蛋白 cDNA 的 PCR 扩增

以含人高碱性蛋白 cDNA (购自 Clontech 公司)的质粒 pGEM-T 为模板, 设计两条引物: 5' TAATACGACTCATATAGGG 3', 5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3' 分别进行 PCR 和荧光标记 PCR (使用 Cy5-dCTP), Taq 酶购自华美生物工程公司, Cy5-dCTP 及 Cy3-dCTP 购自 Amersham Pharmacia 公司。扩增程序为: 94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 120s, 反应 30 个循环, 72°C 延伸 7min。不带荧光的 PCR 扩增产物用 Promega 公司生产的 Wizard DNA 纯化试剂盒纯化, 然后以 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 同上点样。

1.5 阳性对照荧光素酶 mRNA 的逆转录荧光标记

在 12.5 μL 逆转录反应体系中加入荧光素酶 mRNA (本室自制, -70°C 保存, 2.14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 2 μL , 部分参照 Schena 方法^[21] 对 mRNA 进行荧光 (Cy5) 标记, 并采用 Gibco BRL 公司的 Su-

perScript II 逆转录酶,逆转录产物用 1mol/L NaOH 2.5 μ L (65 $^{\circ}$ C 1h)降解 RNA,然后用乙醇沉淀,75%乙醇洗涤后用 1 μ L 水溶解。

1.6 小鼠胸腺组织总 RNA 的提取及逆转录荧光标记

将液氮保存的小鼠(昆明小鼠,军事医学科学院实验动物中心)胸腺组织约 50mg 放在 100mm 陶瓷碾钵中碾成粉末状,用 1mL Trizol 试剂(Gibco 公司)悬浮,匀浆至溶液均一,氯仿抽提后,加入异丙醇沉淀,然后用 DEPC 水(0.1%)溶解沉淀,取样品进行紫外分析和甲醛变性电泳分析,显示纯度和完整性,然后进行逆转录荧光标记,将提取的总 RNA 9 μ L (约 5 μ g/ μ L) 与 1 μ L 定量阳性对照 mRNA 混合加入 25 μ L 反应体系中,其余步骤同上。

1.7 杂交及洗涤

按 1:3 的比例将逆转录产物与杂交液(50%甲酰胺,5 \times Denhardt 液,6 \times SSC,0.5% SDS)混合,94 $^{\circ}$ C 水浴变性 2 min,将探针加在芯片的微矩阵中,用盖玻片封片,利用盖玻片与载玻片之间的毛细现象将溶液均匀平铺到探针矩阵上,42 $^{\circ}$ C 杂交 3 h,杂交完毕后,室温下分别用洗液 A(1 \times SSC,0.2% SDS),洗液 B(0.2 \times SSC),洗液 C(0.1 \times SSC)清洗,室温晾干。

1.8 检测与分析

用 General Scanning 公司的 Scanarray 3000 扫描仪扫描芯片,扫描分辨率为 10 μ mol/L, Laser 及 PMT 设置为 80%, T_{laser} 的激发及检测波长分别为 550nm, 580nm, 图像用 Imagine(Bio-discovery, Inc.) 分析软件定量。

2 结 果

2.1 人高碱性蛋白 cDNA 的 PCR 扩增产物、荧光素酶基因 mRNA、正常小鼠胸腺组织总 RNA 的制备

人高碱性蛋白 cDNA 的 PCR 扩增产物电泳显示,在分子量约 600bp 处有一明显扩增带,基本无非特异性条带。甲醛

变性凝胶电泳显示,荧光素酶 mRNA,小鼠胸腺组织总 RNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.923)基本无降解,见图版 I-A。

2.2 探针长度对杂交信号(敏感度)的影响

以人高碱性蛋白和荧光素酶基因为研究对象,从 PCR 扩增产物和 cDNA 水平考察了 15 ~ 80nt 不同长度对杂交效果(敏感度)的影响,并对寡核苷酸探针与 PCR 扩增产物的敏感度进行了比较。结果表明,就敏感度而言,40 ~ 80 nt 无明显差异,30 nt 以下敏感度明显下降。此外,寡核苷酸探针(40nt, 50nt, 70nt)与扩增产物的敏感度相差不大,见图 1、图版 I-B:

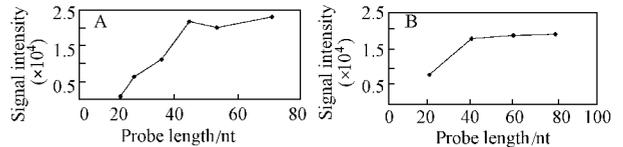


图 1 不同长度(nt)寡核苷酸探针杂交敏感度比较

Fig. 1 Effect of probe length on hybridization sensitivity

- A. Probe vs labeled PCR products (Human 23kD Highly basic protein);
- B. Probe vs labeled cDNA (positive control Luciferase)

2.3 寡核苷酸探针不同氨基修饰方法对检测敏感度的影响

将人高碱性蛋白 40 nt 寡核苷酸片段分别进行 5'和 3'氨基修饰,与荧光标记 PCR 扩增产物进行杂交,如图版 I-C 所示,2 种氨基修饰方法杂交信号强度相近,对检测的敏感度影响相差不大。

2.4 不同长度寡核苷酸探针杂交特异性比较

分别设计荧光素酶基因 20nt, 40nt, 60nt, 80nt 长度不同突变位点寡核苷酸探针(见下表),对其杂交特异性进行检测,结果见图版 I-D, 20nt, 40nt 突变探针信号强度与其未突变探针相比明显下降,前者更甚,而 60nt, 80nt 突变探针信号强度与其未突变探针相比无明显差异,因此,从杂交特异性方面来说,20nt、40 nt 特异性优于 60 nt、80 nt 探针。

表 1 各种长度不同突变位点寡核苷酸探针序列

Table 1 Sequence of probes with different length and mutant site

Probe length/nt	Sequence	G-C contents
1	20 TCTACTGGTCTGCCTAAAGG	50%
2	20(mutant) TCTACTGGT G TGCCTAAAGG	
3	40 CATGAACCTCCTCGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC	50%
4	40(mutant) CATGAACCTCCTCGGATCTA G TGGTCTGCCTAAAGGTGTC	
5	40(mutant) CATGAACCTCCTCGGATC A A G TGGTCTGCCTAAAGGTGTC	
6	40(mutant) CATGA TC TCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC	
7	40(mutant) CATGAA G TCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC	
8	60 TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGCTGCTCTGCCTCATAGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCG	53%
9	60(mutant) TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGCTGCTCT C CCTCATAGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCG	
10	80 GACAAGACAATTGCACTGATCATGAACCTCCTCTGGATCTA CTGGTCTGCCTAAAGG TGTCGCTCTGCCTCATAGAAGTGC	49%
11	80(mutant) GACAAGACAATTGCACTGATCATGAACCTCCTCTGGATCTA G TGGTCTGCCTAAAGG TGTCGCTCTGCCTCATAGAAGTGC	

2.5 小鼠细胞因子相关寡核苷酸表达谱芯片检测特异性和均一性测定

以制备的含 74 种小鼠细胞因子相关基因寡核苷酸芯片为研究对象,以荧光素酶基因为定量阳性对照,看家基因小鼠 β -actin、GAPDH、TFR、MHC、HPRT 为定量内标,结核杆菌 rpoB 基因以及空白点样液为阴性对照。制成 18 行 \times 15 列(同一基因纵向重复点 3 次)的寡核苷酸芯片。与小鼠胸腺组织总 RNA 的逆转录荧光标记产物(同一份总 RNA 分别标记 Cy5 和 Cy3,杂交前混合)进行杂交,结果见图版 I-E,从图中可看到,定量阳性对照信号、看家基因及其他细胞因子相

关基因 2 种荧光信号强度呈一定的比例,说明均一性较好,阴性对照结核杆菌 rpoB 基因以及空白点样液均无明显信号,说明特异性较好。

2.6 寡核苷酸表达谱芯片检测的重复性比较

从总 RNA 提取开始,用制备的小鼠细胞因子相关寡核苷酸芯片对小鼠胸腺组织的基因表达谱进行连续 3 次测定,结果见图版 I-F 和表 2,3 次重复实验各探针信号值经阳性对照校正后偏差小于 10%(随机选取部分探针数据),结果表明,用小鼠细胞因子及其受体相关寡核苷酸芯片测定小鼠胸腺组织基因表达谱,结果稳定可靠,重复性较好。

表 2 连续 3 次测定正常小鼠胸腺组织基因表达信号统计分析(部分质控与细胞因子)*

Table 2 Analysis of three results of gene expression profile of normal mouse breast grand tissue(part of controls and cytokins)*

Probe	1		2		3		CV
	Signal intensity	Modified	Signal intensity	Modified	Signal intensity	Modified	
Positive control	21000	/	28000	21000	16800	21000	< 10%
Negative control	230	/	325	244	180	225	< 10%
GAPDH	16500	/	20800	15639	12900	16125	< 10%
IL-10	18600	/	24400	18346	14700	18375	< 10%
GMCSF	12500	/	16400	12331	9400	11750	< 10%
NGF	3700	/	5100	3836	2900	3625	< 10%

* Signal intensity value of each probe got from average of three spot.

3 讨 论

针对用 cDNA 芯片测定基因表达谱存在的不足,本文对用基因特异寡核苷酸探针制备寡核苷酸表达谱芯片进行基因表达谱的测定进行了方法学上的探索,并就该方法的技术关键如敏感度、特异性、均一性、重复性、稳定性等方面进行了探讨,就敏感度来说,无论是 PCR 扩增产物还是逆转录的 cDNA 检测,40~80nt 寡核苷酸探针的检测敏感度均较好,杂交信号强度相差不大,且与相应的点至芯片上的 PCR 扩增产物信号强度差不多,说明就检测的敏感度来说,寡核苷酸表达谱芯片是可行的。从检测的特异性看,20nt、40nt 探针检测的特异性明显优于 60nt、80nt 探针。另外,在本实验中,小鼠胸腺组织表达谱中结核杆菌 rpoB 基因以及空白点样液均无明显信号,说明检测的特异性较好。因此,无论是从敏感度还是特异性方面来看,本方法制备的寡核苷酸表达谱芯片检测效果均较好。综合考虑敏感度、特异性以及经济适用等因素,选择 40nt 寡核苷酸探针制备寡核苷酸表达谱芯片比较合适。

本课题用小鼠细胞因子及其受体相关基因为研究对象,一方面,制备用以进行造血药物筛选的寡核苷酸芯片,另一方面,因小鼠胸腺、骨髓、脾脏组织含有大量的细胞因子及其受体相关基因 mRNA,故用以作为表达谱测定的研究对象,更具显著性意义。

采用定量阳性对照、以看家基因作为定量内标,同时使用同源性相差较远的基因和空白点样液作为阴性对照,可有

效地对逆转录和杂交过程进行监控,并对检测结果进行统计分析,有时由于污染、洗片不彻底或非特异性杂交等因素导致阴性对照也有微弱信号,可根据情况设定 Cutoff 值,排除阴性对照带来的影响。

由于是用总 RNA 直接逆转录标记荧光,故总 RNA 的提取质量对表达谱测定影响很大,纯度 OD_{260}/OD_{280} 值小于 1.8 或甲醛变性凝胶电泳 28S/18S 值小于 1.5,会严重影响其逆转录荧光标记效果及以后的杂交结果。

均一性和重复性比较实验证明,用本方法制备的寡核苷酸芯片检测基因表达谱均一性较好,结果稳定可靠。因此,作为基因表达谱研究的新的手段,寡核苷酸表达谱芯片有可能成为基因表达谱测定研究的发展方向。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Schena M, Shalon D, Dais R W *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270**(20): 467~470
- [2] Schena M, Shalon D, Heller R *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(20): 10614~10619
- [3] Ingrid Hedenfalk, David Duggan, Yidong Chen *et al.* Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2001, **344**: 539~48
- [4] Kazuya Kudoh, Manasi Ramanna, Roald Ravatn *et al.* Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin resistant

- ~ 4166
- [5] Nuwaysir E F , Bittner M , Trent J *et al.* Microarrays and toxicology : the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog* , 1999 , **24** (3) : 153 ~ 159
- [6] ZHANG I(张玲) , LING J H(凌建华) , HE Z W(何志巍) *et al.* Analysis of the gene expression in murine nasopharynx by mouse Atlas™ cDNA expression array. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展) , 2000 , **27** (1) : 86 ~ 90
- [7] XIANG C S(项春生) , CHEN Y I(陈益东) , JIANG Y(江源) *et al.* cDNA microarray and gene expression profile of virus infection. *Chinese Science Bulletin*(科学通报) , 1999 , **44** (5) : 3 ~ 6
- [8] LI Y(李瑶) , QIU M Y(裘敏燕) , WU C Q(吴超群) *et al.* Detection of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using DNA Microarray. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报) , 2000 , **27** (12) : 1042 ~ 1048
- [9] Lipshutz R J , Fodor S P , Gingeras T R *et al.* High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genet* , 1999 , **21** : 20 ~ 24
- [10] Lisa Wodicka , Helin Dong , Michael Mittmann *et al.* Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* , 1997 , **15** : 1359 ~ 1367
- [11] Edwin Southern , Kalim Mir , Mikhail Shepchinov. Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics supplement* , 1999 , **21** : 5 ~ 9
- [12] Michael D Kane , Timothy A Jatkoe , Craig R Stumpf *et al.* Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide(50mer) microarrays. *Nucleic Acids Research* , 2000 , **28** (22) : 4552 ~ 4557

Preparation and Analysis of Oligonucleotide Microarray for Expression Detection of Mouse Cytokine-associated Gene

HUANG Jian² CHEN Su-Hong¹ TONG Li¹ GUAN Wei¹ DING Yu²

LIANG Hao² LI Wu-Ju¹ WANG Sheng-Qi^{1*}

¹(Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850 , China)

²(Shenzhen YiShengTang Biological Products Co. Ltd , Shenzhen 518026 , China)

Abstract A new method for the preparation of oligonucleotide microarray for gene expression detection was found. The key techniques and standards of quality controlling for preparation of oligonucleotide microarray was explored using gene of human 23kD highly protein and Luciferase and mouse cytokine-associated genes. By the using of a software system MProbe , oligonucleotide probes were designed and BLAST. All the probes have a very high specificity , *i. e.* except target sequence , the similarity between the probe and non-target sequences is less than 70% and the hairpin structure are not exist in all probes. All the probes have the same length 40. GC contents in all probes are in a narrow scope(from 45% to 55%). All the probes are modified with amino at 5' or 3' terminal. The satisfied images with good sensitivity and very high specificity were obtained by the using of the methods above and also using of positive and negative controls and some internal controls(house keeping gene) to quantitate and balance expression of genes. High specificity , good sensitivity and stability have been verified by three continuous experiments using the oligonucleotide microarray to study gene expression profile of normal mouse breast grand tissue . The oligonucleotide microarray for expression detection prepared using our method have high specificity , good sensitivity and stability *et al.* It may be a more advanced method for analysis of gene expression profile.

Key words gene expression profile , oligonucleotide microarray , mouse cytokine

Received : 01-26-2002

This work was supported by Grants from Medical and Health Research Funds of PLA (No. 01Z019) and Science Research Funds of Beijing(No. H010210220113).

* Corresponding author. Tel 86-10-66932211 ; Fax 86-10-66932211 ; E-mail : sqwang@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>