

Thermomixer 舒适型恒温混匀仪

应用于基因微阵列杂交反应中

研究不同探针合成方法对杂交信号强度的影响

示例

寡核苷酸基因微阵列和 cDNA 微阵列是现代分子生物学研究中基因表达分析最为有力的研究工具之一^[1]。在化学修饰的玻璃片基上结合了高密度的 DNA 探针矩阵，通过与荧光分子标记的 cDNA 或 cRNA 的杂交，微阵列技术可以在一次实验中同时对几千个基因的表达状况进行分析。微阵列的制备和扫描检测需要特殊的设备，而探针的杂交反应通常在一个用盖玻片封住，并浸入装有水的 50 ml 试管中，放入水浴或孵育箱进行杂交。这种方法常常由于混匀不够充分而无法保证结果的重复性和检测的灵敏度，而且还需要额外添加甲酰胺来防止杂交缓冲液的蒸干。

本文中，我们采用寡核苷酸微阵列技术对黄羽扇豆的 11 个高同源性，编码致病机制相关的 class 10 (PR-10) 蛋白表达

进行了分析^[2]。我们早期的研究发现有一些 PR-10 的同源蛋白的表达调节源于环境的胁迫性，例如致病菌的侵入、损伤或外源植物激素的影响。微阵列技术的应用对 PR-10 基因的表达谱研究是极为有力的工具，它可以快速的鉴别出不同个体在各种不同的胁迫因子影响下发生的表达调节变化。这项研究工作的目的在于对待研究的样本制备的实验流程进行优化。

我们采用了两种不同的引物延伸方法来合成双链 cDNA：方法 A，通过 Oligo(dT) 和 5' 端通用引物来合成所有的 cDNA；方法 B，通过 PR-10 特异性引物和 Oligo(dT) 选择性扩增 PR-10 的同源基因的 cDNA。然后制备生物素标记的 cRNA 探针，用于微阵列的杂交。

材料和方法

微阵列的制备

我们合成了 42 个来自于黄羽扇豆，针对 11 个 PR-10 基因和 6 个对照基因的 28 bp 的特异性寡核苷酸探针，通过基因芯片点样仪 Spot-Array 24 (PerkinElmer® Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA) 将探针以 8 个重复拷贝制备于 SCHOTT Nexterion® Slides E 片基上 (Schott, Jena, Germany)

经过复水化处理后，探针被固定 (30 min, 120 °C)，在室温下用缓冲液 (0.1% Triton X-100 (5 min), 1 mM HCl (2 x 2 min), 100 mM KCl) 依次洗涤。

然后，根据片基制造商的说明书建议，将微阵列置入 Nexterion Blocking 溶液中 50 °C 孵育 15 min，再用水在杂交前冲洗。

待测样品的标记

用 Chomczynski 和 Sacchi 方法^[3]从 4 周龄的黄羽扇豆叶片提取总 RNA，用 2M LiCl 选择性 RNA 沉淀进行富集。用两套不同的引物反转录合成双链 cDNA，(A) 两个通用引物^[4]；(B) 一个 Oligo(dT) 引物和序列特异性正向引物。

特异性的正向引物已经经过了前期的 PCR 证实。然后根据 Affymetrix 说明书的流程，用 GeneChip® Expression 3'

IVT 扩增试剂 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 通过体外转录标记合成 cRNA。

杂交

将 cRNA 经片段化处理后，将生物素标记的 cRNA 溶解于 900 µl 杂交缓冲液中 (2x MES, 94.5 µg BSA, 79.2 µg 鲑精 DNA)，加入杂交小室 (Whatman Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) 内。

杂交过程在 Eppendorf Thermomixer comfort 舒适型混匀仪的可替换式 Thermoblock 片基杂交模块 (图 1) 中在 45 °C 下进行 16 个小时，同时以 500 rpm 进行振荡混匀。为了保持适当的湿度环境，将 Thermoblock 模块的垫片用去离子水润湿，置入模块的内腔中。



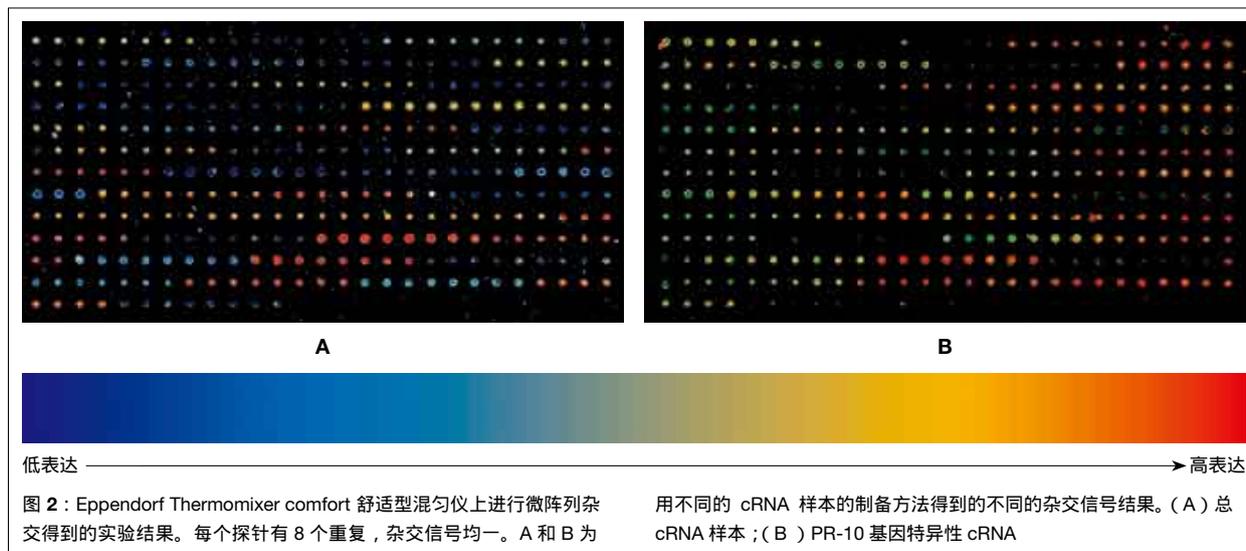
图 1：在 Thermomixer comfort 舒适型混匀仪上进行微阵列杂交。

免疫化学检测

杂交结束后, 根据 Affymetrix 的实验方法^[5], 用含有 Cy3 标记的链霉亲和素溶液对微阵列进行反复的洗涤和孵育。

数据的扫描和分析

在 ScanArray[®] Express 基因芯片扫描仪 (PerkinElmer[®] Life and Analytical Sciences) 对干燥后的微阵列进行扫描, 用 ScanArray Express 软件对数据进行适应性圆周量化 (Adaptive Circle quantification) 和分析。



结果和讨论

在实验 A 中, 由于 cDNA 的合成是来自于 Oligo(dT) 和通用引物, PR-10 转录子与待测样本组织中的所有 mRNA 同时被进行了反转录 (尽管这些 PR-10 转录子以外的基因表达我们并没有进行这方面的检测)。而在实验 B 中, 只有很小一部分 PR-10 特异性的 cDNA 被合成。总 cRNA 样本 (A) 和 PR-10 基因特异性 cRNA (B) 在同一张微阵列上进行了杂交和检测。

尽管在这两个实验中在微阵列上都得到了杂交信号, 但比较而言, 方法 B 的灵敏度更高 (图 2)。在实验 B 中, 比较实验 A 中总 cRNA 的使用量, 用于杂交的 cRNA 量不到实验 A 的十分之一, 但微阵列的杂交信号强度却远高于实验 A 的结果。

进一步用 RT-PCR 的方法对高同源性的 PR-10 基因的不同表达水平进行了验证 (数据未在此列出)。我们确信, 这种针对性的微阵列将会是一个非常有用的研究工具, 用于鉴别这类及其相似的 PR-10 多基因家族成员。我们也相信, 对各种致病性相关基因的表达谱分析将对分子诊断产生帮助, 如鉴定和识别各种不同类型的植物致病菌、细菌、真菌和病毒。

而且, 在微阵列的杂交结果中, 每一个探针的杂交信号点都可比较, 本底信号低, 分布均匀。在杂交过程中, 没有发现

杂交缓冲液挥发干的现象, 这说明可替换式 Thermoblock 片基可以做为一个性价比很好的基因芯片杂交仪, 用于标准的自动化的杂交过程, 操作简便, 而且能保证高质量的实验数据。

参考文献

- [1] Aharoni, A., Vorst, O., DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol. Biol.* 48: 99-118, 2001
- [2] Handschuh, L., Femiak, I., Kasperska, A., Sikorski, M.M., Pathogenesis-related proteins of subclass PR-10.2 in yellow lupine – comprehensive analysis. *Proceedings of the XIIth International Congress on "Genes, Gene Families and Isozymes"*, Berlin 2003
- [3] Chomczynski, P., Sacchi, N., Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987
- [4] Ji W., Zhou W., Gregg K., Lindpaintner K., Davies S., A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials. *Anal. Biochem.* 331: 329-339, 2004
- [5] Affymetrix Inc. *GeneChip Expression Analysis, Technical Manual*

作者 Luiza Handschuh, Agnieszka Żmieńko, Wiesława Włoszczak, Michał M. Sikorski & Marek Figlerowicz; Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland