

# 微观基因组学: Codelink 人基因组芯片分析 激光捕获显微切割细胞的基因表达图谱

F. Ducray<sup>1</sup>, A. Wierinckx<sup>1</sup>, C. Rey<sup>2</sup>, C. Legras<sup>3</sup>, M. F. Belin<sup>1</sup>, J. Honnorat<sup>1</sup>, and J. Lachuer<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup> Experimental Neurobiology and Physiopathology Laboratory, U433 INSERM, Lyon, France

<sup>2</sup> NeuroBioTec Service, IFR19, Bron, France

<sup>3</sup> Retroviruses and Comparative Diseases, UMR 754-UCBL-INRA-ENVL, Lyon, France

癌症研究的一个目的是为了鉴定介入癌症启动和演变的基因,从而了解和疾病相关的基因表达情况。先进的激光捕获显微切割技术(LCM)和高通量的基因表达技术提供了一个独有的机会说明在一个细胞水平上人类癌症的启动和演变过程中的分子遗传事件。高灵敏度,高特异性和重复性的Codelink生物芯片结合激光捕获显微切割技术(LCM)是分析显微切割细胞基因表达谱的强大工具。

## 介绍

癌症是多种和累积的遗传变化所导致的复杂结果,这些变化引起了参与细胞周期,凋亡,血管生成,细胞黏附,转膜信号和DNA修复中的基因活化和失活。由于有上百种的基因参与到这种恶性转型的机制中,所以全基因表达技术就提供了独有的机会来阐明这些分子遗传事件。这些技术就包括了基因表达谱芯片。激光捕获显微切割技术与高通量基因表达分析平台结合促使微观基因组学的快速发展并影响着全世界的癌症生物学(1, 2)。

由于在微观基因组学中的起始RNA量非常低,有两方面因素必须被考虑到。首先考虑的是要特异性的扩增RNA。RNA的扩增通常是用一轮(IVT)或两轮(d-IVT)的体外转录线性扩增(3)。通过这两轮的线性放大,能够将初始mRNA百万倍的扩增而没有非特异性偏差(4, 5)。

另一个考虑的因素就是灵敏度。Codelink表达谱芯片(GE Healthcare)采用了3-D液相凝胶包被表面并具30个碱基的寡核苷酸探针。该凝胶介质提供了液相杂交环境从而优化了探针和样本相互作用,提高了探针的特异性和阵列的灵敏度。该系统有超过三个数量级的线性动态范围,检测灵敏度低至1:2 000 000,并有卓越的重复性。每张Codelink UniSet Human 10K生物芯片都包含有来自于NCBI/Unigene数据库的10 000个30碱基探针(6)。除了这10 000个探针,Codelink芯片还包含有108个阳性参照和300个阴性参照。这篇文章里我们将介绍仅使用非常少量的10ng起始总RNA,在高灵敏度的Codelink芯片平台上采用两轮扩增(d-

IVT)结合激光捕获显微切割技术来获得高度重复性的基因表达谱。

## 方法

收集来自于法国Neurobio Tec Bank, Lyon的人类临床神经胶母样本。截取(7 $\mu$ m)的神经胶母样本冷冻后固定在玻片上。

采用PixCell II激光捕获显微切割系统(Arcturus Bioscience)显微切割神经胶母样本。并将包埋有一层薄的醋酸乙烯热塑料膜的专用盖子(CapSure HS LCM, Arcturus Bioscience)放置在组织上。一旦鉴定出肿瘤细胞,一束低能量的红外激光直接穿透盖子,熔解所选细胞上方的醋酸乙烯膜。当激光关闭,把膜从冷冻组织上剥离时所选细胞就被吸附在膜上,被捕获的细胞可被深入分析(图1)。

使用1000脉冲可捕获2000-3000个细胞,这大概会提取到25-40ng的总RNA。在这篇文章中应用1000脉冲四次重复切割来自于两个不同的神经胶母细胞进行研究。

通过激光捕获显微切割技术获得的神经胶母细胞提取总RNA, RNA的量采用毛细管凝胶电泳评估(数据未显示)。

使用Eberwine方法线性扩增总RNA(3)。从恶性显微切割细胞中提取的10ng总RNA,经过两轮扩增总共生成50-100ug aRNA。对每一批的样本,1 $\mu$ g总RNA适合一轮的线性扩增。

进行微阵列分析,我们将aRNA和Codelink UniSet Human 10K芯片杂交。用Codelink基因表达分析软件V4.0提取杂交芯片上的数据。再用GeneSpring v7.0软件进行数据分析(Agilent)。

## 微观基因组学的确证

由于存在样本源的差异(LCM和大块肿瘤),我们采用分层聚类(hierarchical clustering)的方法来探索观察到的所有相对差异。对于这次的分析,我们比较了两个神经胶母样本GB1和GB2中连续的组织部分所捕

获的两个近端的 LCMs 或两个远端的 LCMs (图 2A)。再使用 GeneSpring v7.0 软件完成聚类分析。分层聚类图表显示了很好的分子信号的分布, 这些信号来源于激光捕获对应的位置和对应的肿瘤, 说明激光捕获技术不会产生假信号。

### 结论

该方法的精确性, 技术的重复性和灵敏性说明采用 d-IVT 和 Codelink 生物芯片可以作为一种常规类似组织切片检查的方法来分析临床微量样本。

### 感谢

这项工作得到了 Rhone-Alpes (France) 的支持。

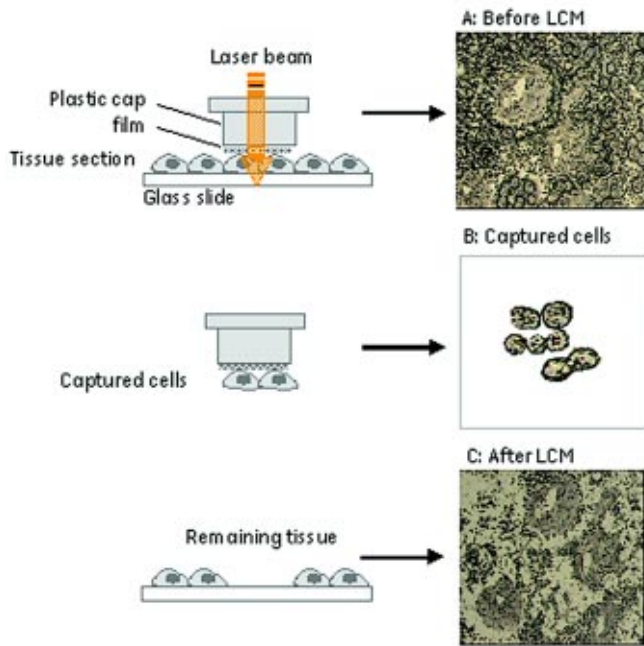


图 1 激光捕获显微切割 (LCM) 神经胶母样本。A: LCM 前; B: 捕获的肿瘤细胞; C: LCM 后

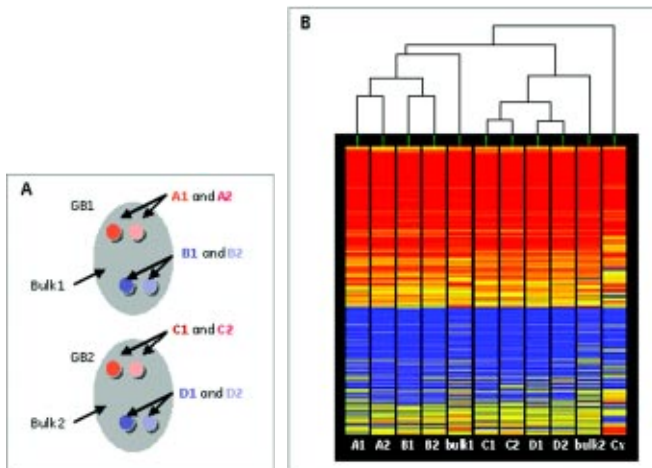


图 2 A: 实验的设计。分析两个大块的神经胶母样本(GB1, GB2)。从每块肿瘤样本上, 通过激光捕获提取两个邻近组织, 该组织来自于肿瘤上的两个不同部分。B: 原始肿瘤样本和激光捕获肿瘤样本的分层聚类图表。样本之间的关系通过 Pearson Correlation 方法计算。Cx 是正常的皮层组织。

### 参考文献

1. Taylor, T. B. et al. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses. *Cytometry A* 59, 254-261 (2004).
2. Luo, L. et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat. Med.* 1, 117-122 (1999).
3. Van Gelder, R. N. et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1663-1667 (1990).
4. Luzzi, V. et al. Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis. *J. Mol Diagn.* 5, 9-14 (2003).
5. Gold, D. et al. A comparative analysis of data generated using two different target preparation methods for hybridization to high-density oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 5, 2 (2004).
6. Ramakrishnan, R. et al. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res.* 30, e30 (2002).

### 订购资料

产品	货号
CodeLink UniSet Human 20K I, 6-pack	300019-6PK
CodeLink UniSet Human 20K I, 24-pack	300019-24PK
CodeLink Expression Software Kit v4.1	310033-00