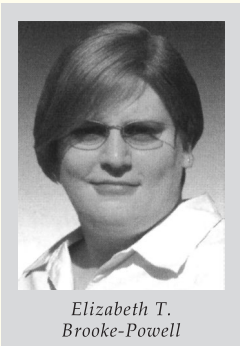


新一代反转录酶Transcriptor Reverse Transcriptase在Microarray中的应用

Elizabeth T. Brooke-Powell, Tikshna N. Mandal, and James W. Ajioka*
剑桥大学 病理学系

*联系作者: jwa@mole.bio.cam.ac.uk



Elizabeth T. Brooke-Powell

研究基因表达中组织和细胞差异的学者已经开始运用基因芯片的方法来解答在癌症研究乃至植物发育研究中遇到的问题。尽管该方法学已经很好地建立，但操作过程中的许多步骤仍需优化以提高实验整体的灵敏度和可信度。在这里，我们利用自制的*T.gondii* 12,000 cDNA

microarray来监测专性胞内寄生的病原菌 - *Toxoplasma gondii*的基因表达情况，以比较反转录酶标记靶序列的能力。信号强度柱状图显示，和其他常用的RNase H⁻ M - MuLV反转录酶相比，Transcriptor Reverse Transcriptase产生的信号分布向高信号强度区域有一个较大的偏移。这意味着获得的标记产物具有很高的特异性。4个重复基因芯片实验的Cy5/Cy3比值的相关性表明Transcriptor Reverse Transcriptase标记的产物比最新的RNase H⁻ M - MuLV的标记产物具有更高的重复性，并且外延信号点少。Transcriptor Reverse Transcriptase的酶学特性使之能得到最忠实于实验RNA的标记产物。

简介

基因表达的芯片分析已很快成为分子生物学研究的常用工具。它同时检测上万个基因的能力使得能以史无前例的视角观察细胞过程中的转录变化。基因芯片技术是对胞内病原菌，如*Toxoplasma gondii*进行基因研究的理想工具，因为可以同时监测宿主和病原菌的基因表达[1]。然而，检测系统必须根据病原菌的基因表达进行优化，因为*T. gondii*的RNA含量比宿主细胞的RNA含量至少低一个数量级。在过去的几年里，技术的发展使得这种方法更可靠和更机械化。

奇怪的是，标准操作程序中获得标记靶cDNA模板这一毫无疑问最关键的一步却在实质上没有改进。大多数的研究者或者直接使用共价结合荧光团的脱氧核苷酸或先使用amino-allyl脱氧核苷酸，后链接荧光基团的方法进行标记。这两种方法中，产物的标记效率和能获得的标记cDNA的数量在很大程度上和所使用的反转录酶相关。

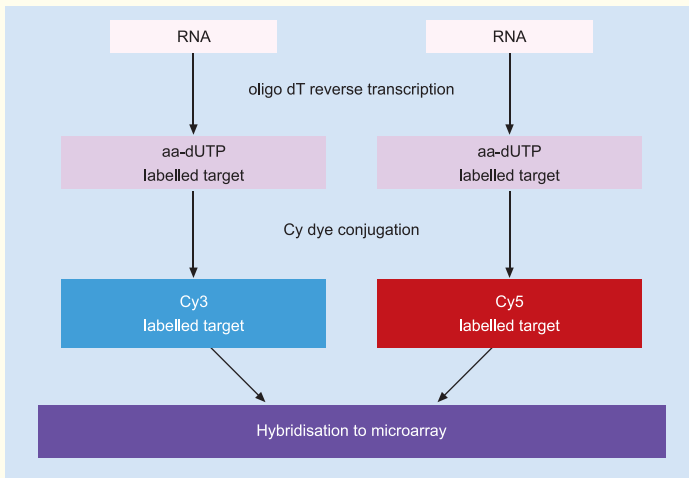


图1.芯片实验设计：实验中仅使用了单一*T.gondii* RNA样品。在同一芯片上检测的样本采用同样的反转录酶标记。染料在杂交到芯片之前单独偶合。每一芯片的数据均为两个独立标记的靶序列同时杂交到一张芯片的结果。Transcriptor Reverse Transcriptase和RNase H⁻ M - MuLV (Y产品, M - MuLV)各4张芯片。

材料和方法

寄生虫和RNA制备

寄生虫 (RH株) 按标准方法培养。宿主细胞为 NIH 3T3, 在单层细胞裂解前离心收集寄生虫。细胞重悬于 TRI 试剂 (Sigma)。RNA 提取按照试剂盒使用说明操作, 除 RNA 在异丙醇处理后不以乙醇沉淀而是直接加至 RNeasy Midi 纯化柱 (Qiagen)。样品结合柱子后, 直接进行推荐洗涤及两次进一步洗涤。以 450 μ l RNase-free 的水洗脱 RNA。洗脱产物常规乙醇沉淀。RNA 样品在真空干燥后重悬于 RNase-free 的水中, 终浓度 1 μ g/ μ l。

靶序列标记

标记按照 DeRisi 实验室 (www.microarrays.org) 提供的修订程序进行。程序的修改包括提高 amino-allyl-dUTP 与 dTTP 的比例至 6:4; 以 Tris-HCl 溶液平衡; 所有的逆转录在 42 $^{\circ}$ C 进行, 模板为按照上述方法提取的 15 μ g 总 RNA。每个反应的 Transcriptase Reverse Transcriptase 用量为 20 单位 (先加 10 单位, 1 小时后加另外 10 单位)。而另一逆转录酶 Y 每个反应需 400 单位 (根据说明书加 400U 处理 2 小时)。经标记的产物真空干燥后重悬于含 0.4 μ g 酵母 tRNA, 0.96 μ g poly-dA 和 2.7% SDS 的 34.5 μ l HGMP 杂交液 (内含 40% 甲酰胺, 5 \times Denhardt's, 5 \times SSC, 0.05M Tris-HCl pH 7.4, 1.0 mM 焦磷酸钠和 0.1% SDS)。更多信息请访问 www.hgmp.mrc.ac.uk/Research/Microarray/index.jsp

杂交

本文使用的基因芯片为单次点样、特殊定制芯片。它包含大约 12,000 个来自于非标准化文库的 ESTs (expressed-sequence tags) 序列。ESTs 经 PCR 扩增后用于点样, 在点样前以凝胶电泳的方式检测每一个点样样品的丰度和质量。每一张芯片都经过肉眼检查以及样本预扫描以去

除点样缺失。芯片在 55 $^{\circ}$ C 预封闭 1 小时 (10% BSA, 3 \times SSC), Milli-Q (Millipore) 水洗涤后离心干燥。煮沸后浸入 95% 乙醇溶液以固定 cDNA 样品。55 $^{\circ}$ C 预杂交 25 分钟 (10% BSA, 3 \times SSC, 0.001% SDS), Milli-Q 水洗涤 2 次后再以 100% 乙醇洗涤。芯片表面覆盖 lifter slip 盖玻片 (Erie Scientific), 在潮湿的 ArrayIt 杂交盒中进行 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后, 将芯片在依梯度降低的 SDS 溶液中各自洗涤 4 分钟 (溶液 1: 0.5 \times SSC, 0.1% SDS; 溶液 2: 0.5 \times SSC, 0.01% SDS; 溶液 3: 0.06 \times SSC), 最后离心干燥芯片。

找点和扫描

按说明操作使用 Axon 4000A 扫描仪扫描玻片。GenePix 4.1 软件查找直径为 150 μ m 的斑点。每一点的平均荧光强度值将用于最终的数据分析, 这些数据均不进行本底校正或芯片标准化处理。

数据分析

Excel 做相关曲线和柱状图。Cy5/Cy3 比值的数据还可从 Excel 导入 GeneSpring 6.0 最终分析基因特异性的效果。

结果和讨论

鉴于每一芯片实验均包括很多的实验步骤, 因此对结果的数据进行分析可评价特定步骤的效果。最理想的是, 标记的靶序列能在丰度和特性上真实地反映用于实验的 mRNA 的情况, 在保证最大灵敏度的同时具有高特异性, 同时在使用同一 mRNA 原始样品时, 得出前后一致的结果。对于第一种特性可以从所使用的酶加以推断, 随后的特性可根据图一所示的实验流程得出。简而言之, 实验中仅使用一种 RNA 样品, 每一靶序列的标记代表了一种独立的逆转录酶和染料偶合酶促反应。每一芯片得到的数据均为两个独立标记的靶序列同时杂交到一张芯片的结果。

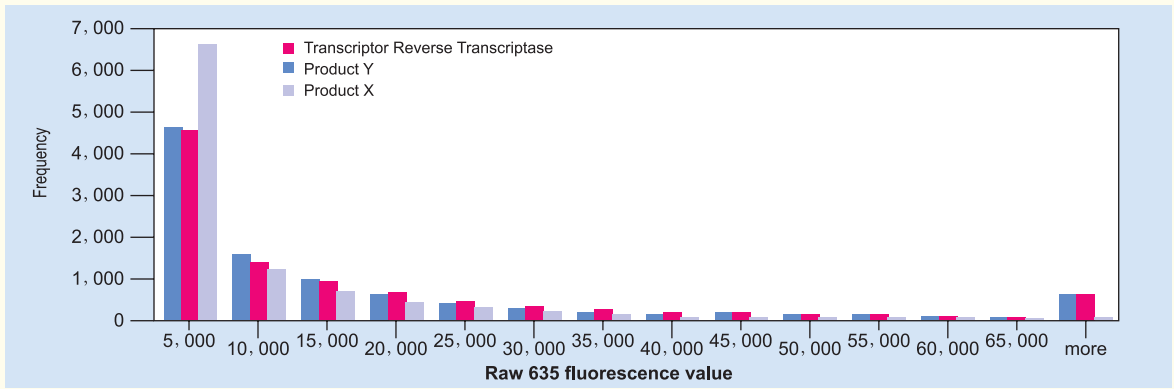


图2.Cy5单点荧光信号原始数据柱状图。三张芯片的每张芯片上9737个点的Cy5通路信号都经过量化。信号分布显示，与 Transcriptor Reverse Transcriptase和最新的RNase H⁻M-MuLV逆转录酶（Y产品）相比，RNase H⁻M-MuLV逆转录酶（X产品）的信号主要分布在低荧光值范围。相反，Transcriptor Reverse Transcriptase 和最新的RNase H⁻M-MuLV逆转录酶（Y产品）的信号主要集中在高荧光值范围（饱和状态）。

尽管有效杂交的标记靶序列的相对特异性可以通过估计荧光信号的总平均值在整个芯片信号中的组成而获得，但每一点（EST探针）的信号强度分布可以包含更多的信息。（图2）是Cy5通道收集的9737个原始荧光数据（未经标准化），因为使用了三种不同逆转录酶，这些数据分别有三组平行数据。和Transcriptor Reverse Transcriptase的结果相比，X产品的结果更多地分布在0-5,000的荧光级别，在更高荧光级别的信号相对较少。这种信号分布情况表明

Transcriptor Reverse Transcriptase标记cDNA的效率比X产品高。相比之下，Transcriptor Reverse Transcriptase和产品Y的结果信号分布类似，都是有50%以上的信号分布在高于5,000的荧光级别区域。高荧光值级别的信号是一些饱和信号，其中有一些是*T.gondii*基因已知的高丰度的转录子。Transcriptor Reverse Transcriptase在这一级别中有大量的信号，表明其在这一级别中低数量信号的X产品的标记能力要强。鉴于激光能源和PMT水平对所有三个芯片扫描都是一样的，因此结果的差异不可能是由图像获取过程造成的。

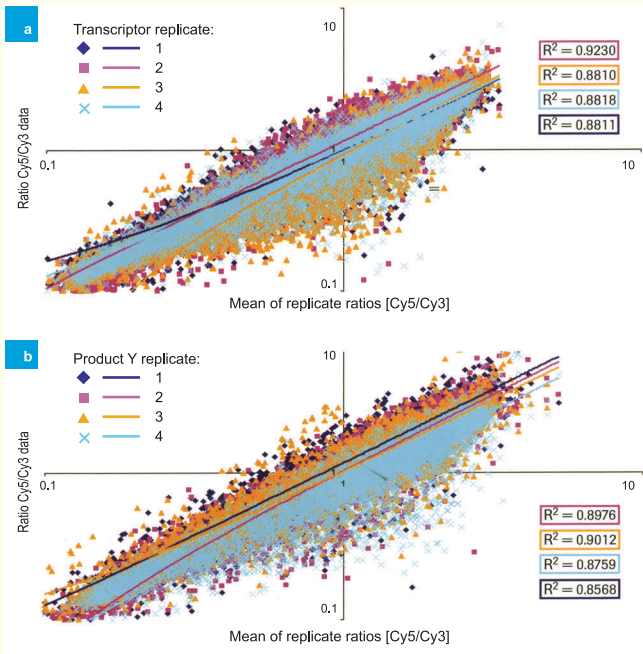


图3.a,b: Cy5/Cy3比值的相关性分布图。（a）采用Transcriptor Reverse Transcriptase的四张重复实验的芯片（b）最新的RNase H⁻M-MuLV逆转录酶的四张重复实验的芯片。每一种逆转录酶重复样本都与各自的均值相关联。

对于用于基因表达检测的芯片分析来说，靶序列标记的一致性对检测真正由于实验处理不同引起的转录差异是至关重要的。因为在所有的实验中使用同样的RNA样品，因此可以检测一种酶得到同样结果的重复性。使用Transcriptor Reverse Transcriptase和Y产品的芯片各做了4个重复。两种转录酶中的4个重复中每一点的Cy5/Cy3的比值与平均值比较的结果相似，但是Transcriptor Reverse Transcriptase的结果与均值的相关性比Y产品好得多（图3）。这可能是因为在Transcriptor Reverse Transcriptase的重复实验中导致逐渐偏离均值线的外延数据点较少。

为了检测Transcriptor Reverse Transcriptase或Y产品结果中总是产生强烈信号的信号点，采用GeneSpring来处理重复实验的数据。对一些cDNA探针的分析表明，在Transcriptor Reverse Transcriptase实验中易于形成强烈信号的探针是那些实质上已经截断的探针，而在产品Y的实验中易于形成强烈信号的探针是那些更靠近5'端截断的探针。尽管这一有趣的发现可能有多种解释，但至少有一点是肯定的，那就是Transcriptor Reverse Transcriptase的高处理能力可以得到更好的标记靶序列，并可有效处理那些探针cDNA已经被截断的试验样本。

结 论

信号强度分布的柱状图表明Transcriptor Reverse Transcriptase可用于高效的靶序列标记。许多研究者往往删除低于某一阈值（如1,000 - 2,000）的荧光信号，因此对于低表达量基因的分析来说增加标记靶序列的特异性是很重要的。

总的来说，上述数据表明Transcriptor Reverse Transcriptase在标记靶序列的能力方面和最新的RNase H⁻M - MuLV反转录酶相似，但Transcriptor Reverse Transcriptase的标记产物重复性佳，四

个重复实验的相关性大，仅有少数的外延信号点。Transcriptor Reverse Transcriptase的酶学特性（高处理能力和RNase H活性）使之能得到最真实体现实验mRNA的标记产物。这对于最新的寡核苷酸芯片分析是很关键的，因其所使用的探针涉及转录子的3'端，方便用以分析mRNA的不同剪接模式。及多种poly-A添加位点等等。

感谢医学研究中心人类基因组计划(MRC - HGMP)的Tom Freeman和Debbie Williams为本文制作*Toxoplasma*芯片。

本文得到生物工程和生物科学研究协会(BBSRC)的基金支助。

Reference 参考文献

1. Ajioka J et al.(2001),Exp.Rev.Mol.Med.6 January, <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204h.htm>

品 名	包 装	目录号
Transcriptor Reverse Transcriptase	250u (25个反应)	0 3531317 001 <i>New!</i>
	500u (50个反应)	0 3531295 001 <i>New!</i>
	2,000u (200个反应)	0 3531287 001 <i>New!</i>

选择您有用的网址

Name	Internet address	Contains information on
GDB	http://www.gdb.org	➤ Location of human genes. DNA fragments. fragile sites and breakpoints
Omim	http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/	➤ Human genes and genetic disorders
MGD	http://www.informatics.jax.org	➤ Genetics of laboratory mouse.
Arabidopsis	Http://genome-www3.stanford.edu/arabidopsis	➤ Genomic and related data, physical and genetic maps of <i>Arabidopsis thaliana</i>
Yeast	http://www.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast	➤ annotated complete DNA sequence of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Roche Molecular Biochemicals	http://biochem.roche.com	➤ total product portfolio available from Roche Molecular Biochemicals.
ATCC	http://www.atcc.org	➤ Amedcan type culture collection