

快速老化小鼠海马差异表达 cDNA 芯片的制作

Preparation of the cDNA Microarray on the Differential Expressed cDNA of Senescence-accelerated Mouse's Hippocampus

程肖蕊, 周文霞*, 张永祥

CHENG Xiao-Rui, ZHOU Wen-Xia* and ZHANG Yong-Xiang

军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China

摘 要 老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中最普遍的痴呆类型,是一种神经退行性紊乱疾病,目前临床上还没有有效的治疗方法。快速老化小鼠亚系 P8(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8)是研究增龄相关性认知缺陷机制以及研究脑老化机制的良好动物,同时也是研究 AD 较为理想的实验动物模型之一。cDNA 芯片技术可以同时规模研究成千上万个基因的表达,尤其适于 AD 这种多机制、多靶标、多途径的复杂疾病的研究,为了揭示 AD 的发病机制,发现用于治疗 AD 的药物靶标,以 SAMP8 和 SAMR1 海马抑制消减 cDNA 文库中的 cDNA 片段为材料,以 β -actin 和 G3PDH 为内参,设计了 $16 \times (14 \times 14)$ 点阵方案,并点制了含有 3136 个点的 SAM 海马差异表达 cDNA 芯片。芯片背景均匀一致,点的大小均一,排列规则整齐。在靶分子与探针杂交过程中,进行了杂交条件和洗涤芯片的优化。将杂交结果进行统计分析,选择差异表达的 cDNA 进行测序并进行生物信息学分析,用实时定量 RT-PCR 对部分基因的表达进行了验证,检测了芯片筛选结果的可靠性。该芯片的成功制备为进一步进行差异表达基因的筛选和研究提供了良好的手段,并将成为揭示 SAMP8 脑老化和 AD 发病机制的有力手段。

关键词 老年性痴呆, cDNA 芯片, 差异表达, 实时定量 RT-PCR, 快速老化小鼠

中图分类号 R183 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0457-08

Abstract Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. AD is an invariably fatal neurodegenerative disorder with no effective treatment. Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) is a model for studying age-related cognitive impairments and also is a good model to study brain aging and one of mouse model of AD. The technique of cDNA microarray can monitor the expression levels of thousands of genes simultaneously and can be used to study AD with the character of multi-mechanism, multi-targets and multi-pathway. In order to disclose the mechanism of AD and find the drug targets of AD, cDNA microarray containing 3136 cDNAs amplified from the suppression subtracted cDNA library of hippocampus of SAMP8 and SAMR1 was prepared with 16 blocks and 14×14 pins, the housekeeping gene β -actin and G3PDH as inner conference. The background of this microarray was low and unanimous, and dots divided evenly. The conditions of hybridization and washing were optimized during the hybridization of probe and target molecule. After the data of hybridization analysis, the

Received: November 30, 2005; Accepted: January 11, 2006.

This work was supported by the Chinese National Key Project of Basic Research (No. G1999054401, 2004CB518907), the National Natural Science Foundation of China (No. 30200367) and the Fund for Young Scientist in BIPT (No. 2004D0302).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931625; E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

国家重点基础研究发展 973 项目(No. 2004CB518907, G1999054401)、国家自然科学基金(No. 30200367)和军事医学科学院青年研究基金(No. 2004D0302)资助项目。

differential expressed cDNAs were sequenced and analyzed by the bioinformatics, and some of genes were quantified by the real time RT-PCR and the reliability of this cDNA microarray were validated. This cDNA microarray may be the good means to select the differential expressed genes and disclose the molecular mechanism of SAMP8's brain aging and AD.

Key words Alzheimer's disease (AD), cDNA microarray, differential expressed gene, real time RT-PCR, senescence-accelerated mouse

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中最普遍的痴呆类型,是一种致命的神经退行性紊乱疾病,没有有效的治疗方法,没有权威性的临死前诊断检测标准。在疾病的起始阶段,脑中变化了解的很少^[1]。以AD为代表的神经退行性疾病已成为严重危害人类健康的四大杀手疾病之一。快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)是由日本京都大学竹田教授经过筛选培育而成的老化模型小鼠,包括快速老化的P系(SAM-prone, SAMP)和抗快速老化的R系(SAM-resistant, SAMR)两大系,SAMP8是快速老化亚系之一,并且有品系特异的病理表型,而SAMR1则与正常小鼠相似,在研究SAMP8时常被用来作为对照。研究表明,SAMP8是研究增龄相关性认知缺陷机制以及研究脑老化机制的良好动物^[2],同时也是研究AD较为理想的实验动物模型之一^[3]。

从cDNA芯片于1995年^[4]第一次被详细描述到1999年^[5]被用于DNA拷贝数分析至今,已被应用于神经生物学领域,同时规模研究成千上万个基因的表达,以揭示中枢神经系统疾病的病理生理学机制,并成为研究治疗这些疾病或进行神经保护的新靶标的有力工具^[6]。如用于研究帕金森病(PD)与选择性多巴胺神经元降解的相关因子^[7]、揭示Methylazoxymethanol (MAM)在发育的神经系统中的靶性潜在分子网络^[8]、研究寻找安非他明(amphetamine)诱导的成年和发育中的神经毒的生物标志物^[9]、寻找神经胶质瘤的诊断标志和潜在治疗靶标^[10]、研究药物滥用相关的认知缺陷与轴突导向分子间的关系^[11]、研究果蝇的组蛋白去乙酰转移酶(histone deacetylase, HDAC)直接的或间接的基因靶标以及它们生理学功能和酶特异性^[12]、氟哌啶醇(haloperidol)或isperidone的作用机制^[13]等。这些研究都取得了明显的结果,为后续研究提供了导向。

本研究在已经建立的雄性SAMP8和SAMR1海马抑制消减cDNA文库^[14]的基础上,以文库中1536个克隆为材料,经PCR扩增、纯化、制作cDNA芯片。从SAMP8和SAMR1海马组织的总RNA反转录合成单链cDNA,在反转录过程中分别加入aa-dUTP进行

标记,再与CY3和CY5荧光素结合,将所合成的荧光素标记的单链cDNA作为靶分子,同cDNA芯片进行杂交,分析基因表达谱,对差异表达cDNA进行测序并进行生物信息学分析,利用实时定量RT-PCR对芯片筛选结果的可靠性进行了验证,期望所制作的芯片体系能够成为揭示SAMP8脑老化和AD发病的分子机制以及寻找治疗AD的药物靶标的有力工具。

1 材料和方法

1.1 动物

SAMP8和SAMR1由日本京都大学引进,本院动物中心繁殖饲养。选择12月龄雄性小鼠海马组织进行实验。

1.2 芯片的制作

1.2.1 所用引物:巢式PCR引物1:5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3';巢式PCR引物2R:5'-AGCGTGGTCCCGGCCGAGGT-3'。G3PDH 5'引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';G3PDH 3'引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。β-actin上游引物:5'-CAC TAT TGG CAA CGA GCG GTT C-3';β-actin下游引物:5'-ACT TGC GGT GCA CGA TGG AG-3'。Oligo d(T)12-18:5'-TTT TTT TTT TTT-TTT TTT-3'。

1.2.2 cDNA的获得:以巢式PCR引物1和引物2R扩增消减文库中的1536个克隆,分别用G3PDH和β-actin各自的上下游引物从SAMP8海马的总RNA中扩增G3PDH和β-actin的cDNA片段,用Taq DNA聚合酶(MBI Fermentas)在PCR仪(Biometra UNO II DNA Thermocycler, Biometra)上95℃孵育5min后,按下述条件开始PCR循环反应:94℃1min,68℃1.5min,72℃2min,共30个循环,最后72℃延伸10min。利用MultiScreen-PCR Plates (MILLIPORE, MANU 030)对PCR扩增产物进行纯化回收,用12μL 50% DMSO (AMRESCO)溶解纯化的PCR产物。

1.2.3 cDNA芯片的点制:以纯化的PCR扩增产物作为制备芯片的样品,利用MicroGrid II 610型点样仪(BioRobotics)以针点的方式将每个cDNA片段按照每张芯片含16 block,每个block为由14×14个点

组成的矩阵方式有序地点样于醛基化修饰的载玻片 (CSS-100 Silylated Slides (Aldehyde), CEL Associates, Inc.) 上。芯片点样仪控制软件为 TAS Application Suite (MicroGrid II) (Version = 2.2.0.0) AxSys (BioRobotics), 将点制好的芯片在 Hofer UVC500 Crosslinker (Hofer Pharmacia Biotech Inc.) 进行交联。

1.2.4 荧光探针的制备以及和芯片的杂交: 利用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取 12 月龄雄性 SAMP8 和 SAMR1 海马组织总 RNA, 利用 SuperScript™ III Rnase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) 进行 cDNA 第一链的合成和 cDNA 的氨基 (aa-dUTP, Amersham pharmacia biotech) 标记, 利用 GIAquik PCR purification Kit (QIAGEN) 进行氨基标记 cDNA 的纯化, cDNA 荧光标记所用的荧光素为 Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP (Amersham pharmacia biotech), 利用 MinElute™ Reaction Cleanup kit (QIAGEN) 进行荧光标记 cDNA 的纯化。

进行芯片表面醛基封闭和预杂交之后, 于荧光标记物中, 加入 35 μ L 杂交液, PCR 仪中 98 $^{\circ}$ C 变性 5min, 低速振荡, 离心, 98 $^{\circ}$ C 变性 5min, 12 000r/min 离心 5min, 取尽所有杂交液, 点加于芯片上, 盖上盖片, 湿盒中 42 $^{\circ}$ C 杂交 18~20h。取出杂交后的芯片, 轻轻除去盖片。芯片置于支架上, 于 1000mL 烧杯

中加入 500mL 的洗液 I (1 \times SSC, 0.06% SDS), 用力摇动支架洗涤 2min。芯片置于新的支架上, 于 1000mL 烧杯中加入 500mL 的洗液 II (0.06 \times SSC), 洗涤 2min。于 1000mL 烧杯中加入 500mL 的 95% 乙醇, 漂洗芯片 2min, 吹干芯片, 扫描仪 (GenePix™ Personal 4100A, Axon Instruments Inc.) 扫描芯片。

1.2.5 杂交信号的检测以及差异表达基因的生物信息学分析: 利用 GenePix Pro 4.1 软件 (Axon Instruments Inc.) 对扫描的荧光信号进行分析, 比较每个 cDNA 在 SAMP8 和 SAMR1 海马组织间表达水平的差别。对所获得的差异片段利用 Beckman 公司的 CEQ™ DTCS Kit (Dye Terminator cycle sequencing kit) 制备测序反应, 在 3100 型基因分析仪 (ABI) 上测序。使用 NCBI/BLAST 程序进行核酸序列对库的检索, 进行 DNA 序列同源性分析。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测芯片筛选结果的可靠性

选择了 6 个不同的基因, 基因名称和引物参见表 1, 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取 12 月龄雄性 SAMP8 和 SAMR1 海马组织总 RNA, 利用实时定量 PCR 仪 (LightCycler Operator, Roche), 采用 Sybgreen 1 荧光素, 运用标准曲线法进行绝对定量, 分析这 6 个基因的差异表达。

表 1 实时定量 RT-PCR 所用基因引物

Table 1 Primer sequences used for the real-time RT-PCR

Gene symbol	Up-primer sequence	Down-primer sequence
β -actin	CACTATTGGCAACGAGCGGTT C	ACTTGGCGTGCACGATGGAG
KDELRI	CTATATCACCAAAAGTCTGAAGGG	AAAGGCAAAAAGGCTACAAACAG
Dnch1	ATCCTTGATGTTCTCCACGGTG	CAACAATGCTCAAAGGTCCTG
CSTN1	AACCTGGTITCTGGGAGGGAAG	CCCACGCAGTCACTAACCATTTT
Kpnb3	GCCCAACAATACCAATCTACC	TATTTGGAGTTAGTCTTCTGGCAG
MTCO1	TATCCAACATCATCCCTTGACATCG	CAGTAGCGTCTGCTATTCTCTG
EPHB6	CACCTCAGTGATGTGGCTCAG	AGGCATGGAAGCTGGAGTAGAG

2 结果

2.1 cDNA 芯片的制备

扩增文库中的克隆, 获得长度在 250bp~1000bp 的 1 536 个特异单一的 cDNA 片段, 作为芯片上内参的基因 β -actin 扩增产物的长度为 370bp、G3PDH 扩增产物的长度为 450bp, 且皆为靠近 3' poly(A) 尾端的结构 (见图 1)。G3PDH 基因是在抑制消减杂交中作为对照使用的看家基因, 同时被用来评价抑制消减的效率。 β -actin 是鼠的另一个看家基因。扩增这两个基因作为 cDNA 芯片上的阳性对照, 可以作为芯片荧光信号检测的对照, 估计背景噪音, 作为评价

杂交信号强度的换算系数, 以便于正确分析芯片数据。

最终制作的芯片包含 16 个区 (block), 每个区由 14 \times 14 个点组成矩阵, 故点制的芯片上共含有 3136 个点。所点的区距玻片的边缘距离为: 距上为 4mm、距左为 3.5mm、距右为 3.5mm, 点与点的距离为 300 μ m, 点的直径为 150 μ m。该芯片的 3136 个点是由 SAMR1 和 SAMP8 海马的两个 cDNA 消减文库中的 1536 个克隆的 cDNA 片段、一个 β -actin 基因片段和一个 G3PDH 基因片段组成的。文库中每个 cDNA 片段重复点 2 次, 形成 3072 个点, β -actin 基因片段和 G3PDH 基因分别重复点 32 次, 形成 64 个阳

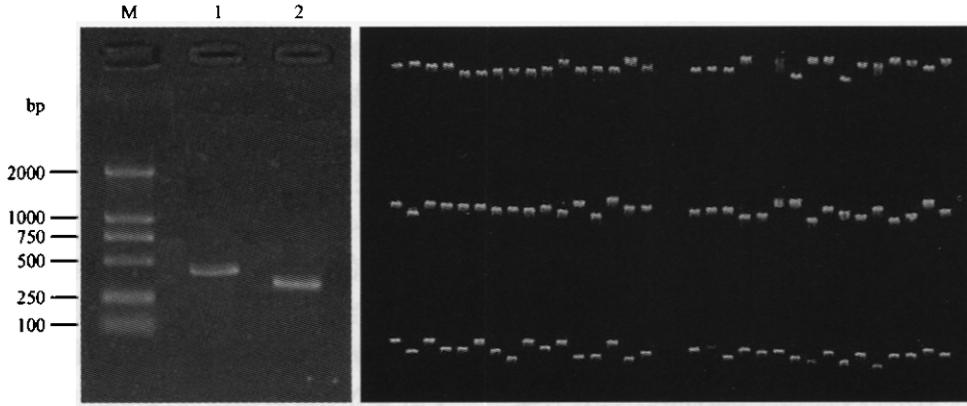


图1 文库中 cDNA 片段的扩增以及 β -actin 和 G3PDH 基因的扩增

Fig.1 Amplification of cDNA in the two SSH libraries, gene β -actin and G3PDH

M: marker DL-2000; 1: gene G3PDH; 2: gene β -actin; Right fig: cDNA in the two SSH libraries.

性对照点,分布于每个区的第一行最后4个点。利用扫描仪 GenePix 4100A 对点制的芯片进行质量检测(见图2)。图示表明,所制作的芯片背景均匀一致,背景噪音低,点的大小均一,每两个重复点的形状一致,排列规则整齐,保证了芯片的可控性和可读性;有个别位置漏点,这对于3136个点来说,可忽略不计,芯片具有一定的容错性。有浓度较高而点偏大的点,由于数据分析是依据每点荧光的背景值和前景值来计算的,所以并不影响实验结果;通过在芯片上设置看家基因对芯片的灵敏度、重复性和可靠性进行质控;由于芯片上所点的探针都是过量的,所以就保证了靶分子检测的灵敏度和相对准确的定量结果;这些特性表明所制作的芯片质量良好。

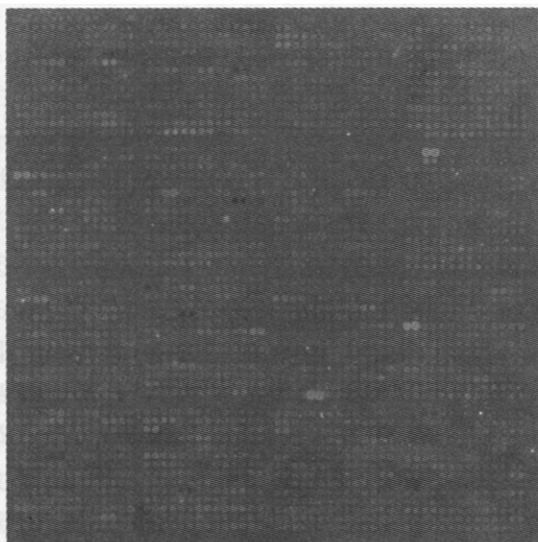


图2 制作的 cDNA 芯片

Fig.2 The prepared cDNA microarray

2.2 cDNA 芯片技术筛选 SAMR1 和 SAMP8 海马差异表达基因

将杂交结果利用 GenePix™ Personal 4100A 扫描仪、GenePix Pro 4.0 图像分析软件进行图像处理和数据分析。图像处理结果见图3,杂交的背景噪音很低,背景干净、均一;信号清晰,阳性对照明显、均一,杂交特异;无沉淀的探针及其它杂交假象,亦无灰尘污染物等。但有许多点没有荧光信号,其原因:一可能是该基因丰度较低而无法检测到;二是这些 cDNA 位于相应 mRNA 的 5'端,反转录时因延伸不够充分而使得标记的探针中不包括这些序列;三是样品漏点或点上的浓度太低。

本实验数据分析所依据的原则是:①采用看家

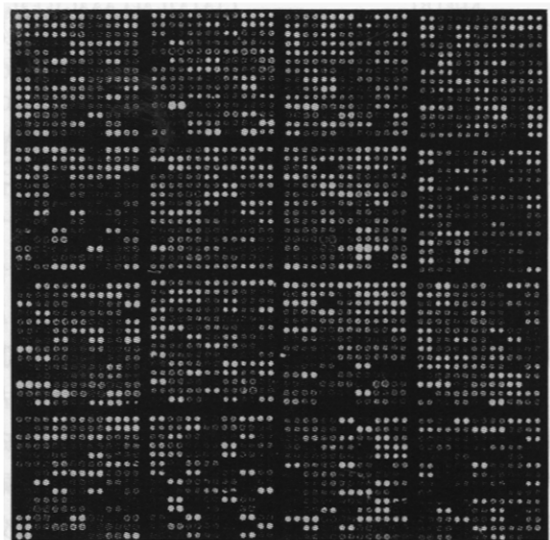


图3 cDNA 芯片筛选 SAMR1 和 SAMP8 海马差异表达基因

Fig.3 Differential expressed genes in the hippocampus of SAMP8 and SAMR1 screened by the cDNA microarray

基因 β -actin 和 G3PDH 对照的两种荧光强度的比值作为归一化因子,对数据进行标准化校准;②剔除荧光信号强度前景中位值小于背景荧光信号强度中位值 2 倍的克隆;③进行独立的 6 次杂交实验,并对两样品进行 Cy5 与 Cy3 标记的互换,最后取其一致的数据来分辨差异表达基因。数据分析结果表明,差异大于 1 倍的有 1220 个 cDNA, 占总 cDNA 的 79.4%, 差别在 1 倍以内的 cDNA 有 316 个, 占总

cDNA 的 20.6%, 共 316 个 cDNA, 选择表达量相差 1.6 倍以上的 191 个 cDNA 片段对应的克隆进行序列测定和生物信息学分析。结果表明, 共有 174 个克隆被测通, 其序列长度分布在 120 ~ 1100bp 之间, 还有 17 个因含有重复序列或其它可生成二级结构的成分或为非特异而无法被测出, 还有部分是由于测序结果中含有的特异序列太短而无法对其进行后续分析。

表 2 在 SAMP8 海马中差异表达的功能明确的基因
Table 2 Differentially expressed genes in the hippocampus of 12-month-old male SAMP8

Gene symbol	Function	Process	Clone ID	Differential expression
Fin14	Association with apoptosis	Signal transduction; Cell communication	T8-1-21	+ 1.97
Ntrk2	phosphorylates itself and members of the MAPK pathway	Signal transduction ; Cell communication	T8-1-50	+ 1.92
KTN1	molecular motor of the transport of organelles	microtubule-based movement	T8-2-99	+ 2.21
ZNF238	Transcription regulator activity	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	T8-3-269	+ 2.14
ARNT2	transcription factor activity and protein heterodimerization activity	Signal transduction ; Cell communication	T8-3-285	+ 3.24
NEFL	Structural molecule activity	Cell growth and/or maintenance	T8-3-286	+ 2.11
RAF1	Protein serine/threonine kinase activity	Signal transduction ; Cell communication	T8-4-296	+ 2.22
Reticulocalbin 2	Calcium ion binding	Signal transduction ; Cell communication	T8-4-370	+ 2.81
Rock1	Protein serine/threonine kinase activity	Signal transduction ; Cell communication	T8-4-383	+ 1.7
ADRBK1	ubiquitous cytosolic kinase activity	signal transduction; protein amino acid phosphorylation	T8-5-430	+ 2.09
MTCO3	Oxidative phosphorylation	Energy metabolism	T8-6-508	+ 1.75
Dnch1	microtubule motor activity; ATP binding	microtubule-based movement; mitotic spindle organization and biogenesis	T8-7-638	+ 8.5
RPS21	structural constituent of ribosome	cell differentiation; protein biosynthesis	T8-7-641	+ 2.96
Kpnb3	Transporter activity	Transport	T8-8-696	+ 1.72
KDELRL1	receptor activity; KDEL sequence binding	protein transport	T8-9-821	+ 1.92
MTCO1	oxidoreductase activity; cytochrome-c oxidase activity	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	T8-9-826	+ 2.28
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity; oxidoreductase activity	electron transport	T8-9-861	+ 2.32
CSTN1	Calcium ion binding	Signal transduction ; Cell communication	T8-9-836	+ 2.26
EPHB6	protein-tyrosine kinase activity; protein serine/threonine kinase activity	Signal transduction ; Cell communication	8-9-784	+ 2.06
RAB26	nucleotide binding; GTP binding	small GTPase mediated signal transduction; intracellular protein transport	T1-1-38	- 1.91
Strn4	Efficiency regeneration respond factor in nerve system	Signal transduction ; Cell communication	T1-2-110	- 2.07
Fhit	Hydrolase activity	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	T1-3-232	- 2.03
GANP	Regulation of cell cycle	Signal transduction ; Cell communication	T1-7-649	- 1.66
Fyc1	Binding with Zn2+ ; involved in tumor.	Signal transduction ; Cell communication	T1-8-676	- 1.80
Map4k6-pending	protein kinase activity	protein amino acid phosphorylation	T1-9-774	- 1.96
CAMK2A	protein serine/threonine kinase activity; transferase activity; ATP binding; nucleotide binding	protein amino acid phosphorylation; Signal transduction ; Cell communication	T1-1-48	- 24.5
Ttc3	ubiquitin-protein ligase activity; zinc ion binding	protein ubiquitination	T1-1-47	- 1.91
DUSP	phosphoprotein phosphatase activity	protein amino acid dephosphorylation	T1-6-509	- 1.84
STUB1	Ligase activity	Metabolism; Energy pathways	T1-4-350	- 3.14

* The fold change of gene expression is greater than 1.6 is considered significant.

利用公共数据库对这些基因的功能及其相关信息进行检索,分析其功能,尤其是其与认知有关的功

能,结果表明,上述 174 个序列共对应 91 个不同的基因,其中 53 个有蛋白质产物、有一定功能提示,在

这 53 个基因中,具有更明确基因功能和蛋白质功能线索提示的基因有 30 个,其中有 11 个在 SAMP8 中表达下调,有 19 个在 SAMP8 中表达上调,具体结果见表 2。另外,还有 38 个无明确基因功能、无蛋白质产物、无蛋白质功能线索或无任何功能提示的序列,然而这些序列又确实在 SAMP8 和 SAMR1 海马中存在差异表达,提示这些基因蕴含着大量的生物学信息,可能与 SAMP8 的病理变化有关,拟进一步研究其特性。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测芯片筛选结果的可靠性

本研究对 cDNA 芯片筛选出的 191 个 cDNA 进行了生物信息学分析,结果表明,这些基因的产物参与了从线粒体能量代谢到细胞形态的改变以及到多个复杂信号转导通路的调节,还有一些未知基因。如果将这 191 个序列皆进行引物的设计并每个都进行 RT-PCR 的实时定量,那将是一件异常费时、费钱、费力而不必要的工作。所以本实验根据差异表达基因的产物及其功能提示,选择了 6 个在 SAMP8 海马中表达上调的、具有重要意义且与中枢认知功能紧密相关而其作用途径明显不同的基因进行了有代表性的验证。将选定的基因进行实时定量 RT-PCR 表达分析,采用绝对定量方法,并用看家基因 β -actin 进行实验误差的校正,将其浓度进行比较,并归一化(归一化因子为 4.169 7)去除系统误差后,结果表明(表 3):与 SAMR1 相比,这 6 个基因皆在 12 月龄雄性 SAMP8 海马中表达上调,上调倍数从 1.68 倍到 10.3 倍不等,基因表达变化的方向与 cDNA 芯片筛选的结果一致,证明了芯片筛选差异表达基因的结果是可靠的。

表 3 各基因在 12mon 雄性 SAMP8 和 SAMR1 海马组织中的表达

Table 3 Detection and analyses of differentially expressed genes in the hippocampus of 12-month-old male SAMP8 and age-matched SAMR1 by the real time quantitative RT-PCR

Gene name	Expression of gene($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		Gene differential expression
	SAMP8	SAMR1	
Dnchc1	7.29×10^{-9}	6.23×10^{-9}	4.88
MTCO1	2.52×10^{-6}	6.26×10^{-6}	1.68
CSTN1	3.97×10^{-8}	1.61×10^{-8}	10.3
EPHB6	3.76×10^{-8}	4.24×10^{-8}	3.69
KDELRL1	2.55×10^{-10}	5.29×10^{-10}	2.01
Kpnb3	2.24×10^{-7}	1.09×10^{-7}	8.55

* The calibrator is 4.169 7.

3 讨论

芯片技术允许在一个单独的试验中同时评价和

比较成百上千个基因,提供巨大的信息量,但是试验所产生的数据分析和可靠性却依赖于试验的各个因素,如生物样品的性质、RNA 获得的方法、扩增、杂交流程、基因芯片的制备以及硬件和软件等因素^[15]。制作基因组芯片的材料主要有基因组克隆、cDNA 克隆和 PCR 产物三种,而目前主要是采用基因组克隆^[16]。用 cDNA 为材料制作芯片的益处是:cDNA 克隆易于获得;对 DNA 拷贝数和基因表达的分析具有操作的平行性^[17]。但通常也有以下一些限制:只可检测已知基因;对于所谓的“基因沙漠”即非转录区却无法分析;对于单拷贝基因缺失和低拷贝基因检测的敏感度和特异性需要提高;由于 cDNA 克隆包含一些冗余序列从而使结果分析变得复杂^[16]。本研究力求克服 cDNA 芯片的局限性,在以下各方面作了优化。

玻片的表面和点样缓冲液对于可重复的高信度的芯片分析来说是关键。早期报道多用 $3 \times \text{SSC}$ 将 DNA 点于多聚 L-赖氨酸包被玻片上。近年醛基化包被玻片因其均一的表面和低背景被广泛应用。据报道,用 50% DMSO 溶解点样样品的杂交信号强度比 $3 \times \text{SSC}$ 强,同时 DMSO 使 DNA 变性,保持单链状态,以便 DNA 能更好地与玻片结合,为杂交提供了更加单一的靶分子。另外,DMSO 是吸湿性的,沸点高,不易蒸发,降低液体的蒸发效率,从而允许 DNA 样品较长时间保存。本研究采用了醛基化包被玻片,50% DMSO 来溶解点样样品。

点制芯片所用的点样针有空心针和实心针。空心针与实心针相比,是利用毛细作用将样品吸入针腔中,再通过表面张力作用将液体点在玻片上,具有所点样品浓度均一、大小一致的特点,本研究采用了空心针;机械臂的操作速度、温度、湿度等参数决定了点的形状和大小及 DNA 与玻片的结合效率。本研究使用的相对湿度为 45%,温度为 22°C ,避免了因样品的蒸发而对芯片点制质量的影响;在点制芯片时,保证点样柜整洁无尘,防止因灰尘颗粒对芯片质量的影响。

芯片分析的探针是通过以 RNA 为模板反转录,在第一链 cDNA 合成过程中掺入荧光标记脱氧核苷酸获得的。有用总 RNA,也有用 poly(A⁺) RNA 来进行反转录反应。Oligo(dT) 引物从总 RNA 反转录合成探针,可从小量起始 RNA 中获得高质量探针而不需要 poly(A⁺) 的纯化,同时具有较低的杂交背景,应用的较多,本研究也采用该法;早期报道多用 cyanine3-dUTP 和 cyanine5-dUTP 直接标记探针,

cyanine 标记的 dCTP 也被大量应用,但在第一链 cDNA 合成中 Cy-3 和 Cy-5 标记核酸存在不同结合效率,从而导致 Cy-3 和 Cy-5 标记效率的不均等,并最终造成一些染料特异性杂交偏性,导致假阳性。本研究在第一链合成中,掺入氨基烯丙基标记 (amino-allyl-labeled) 核酸,再与 Cyanine 荧光素的 NHS 酯 (NHS-ester) 共价结合,提高了 Cy-3 和 Cy-5 标记效率,克服了 Cy-3 和 Cy-5 标记效率的不均等,该方法已被大量的真核和原核表达分析证明是高度有效的,但其缺点是费时费力;在探针制备的全过程中,反转录是最为重要的步骤,所用的反转录酶是最为关键的,报道中常用 AMV、MMLV、Superscript II RT 等,本研究采用了 Superscript III RT,提高了合成效率和质量。

探针与靶分子的杂交要求获得高特异性和低背景,本研究做到了可重复性和高质量杂交。一方面,醛基化包被玻片与 DNA 有着很高的结合效率。在杂交之前,需要将芯片在 60mJ 的紫外线下进行交联,封闭或失活游离的醛基,否则会有非特异杂交产生,造成高背景;同时,在杂交之前,本研究用 NaBH_4 又对其进行了醛基封闭以及多步洗涤。另一方面,进行芯片预杂交可以在探针结合之前,洗脱掉未结合的 DNA,减少与探针杂交的竞争,减少背景。另外,本研究对同一实验每次进行了独立的 6 次杂交实验,并对两样品进行了 Cy5 与 Cy3 标记的互换。

芯片杂交结果的分析过程包括两个步骤:图像处理和数据分析。图像分析要求弱的点调整到易于观察,杂交结果要求低水平、统一背景和好的信噪比。首先,芯片上点所代表的基因必须明确,并将其从假信号中区分开来,如沉淀的探针、别的杂交假象、灰尘污染物等;另外不定的强度和不均一的玻片背景及不规则的操作都会影响结果。通常点的位置依据该点的荧光背景来估计,而不是依据均一背景来大规模估计所有的图像;其次是背景的估算,即每点的杂交信号强度减去背景。目前有两种方法来计算杂交信号强度,一种是使用每点的平均强度,通常采用 Cy3 比 Cy5 强度的比率来估算差异表达基因,另一种是使用均一化对照,即在芯片上分布有阳性、阴性对照,其数值作为归一化因子,用来对杂交数据的归一分析,本研究就采用该法来分析数据,将看家基因 β -actin 和 G3PDH 的数据作为归一化因子,具有统一性和相对准确性;数据分析首先是对每一个点两个扫描通道的相对荧光强度值进行均一化。对于荧光标记的标记效率和检测效率的差异调整以

及在分析中所测两个样品起始 RNA 质量差异的调整来说,均一化是必要的。Cy5 与 Cy3 的平均比值和强度变化只有被重新调整之后,实验数据才能够正确分析。均一化应建立在实验设计中,通常是进行芯片上全部基因荧光强度的收集、线性回归分析、利用某些基因的子集如看家基因或者添加一套对照等作为归一化因子三种。本研究采用了看家基因 β -actin 和 G3PDH 作为归一化因子。在处理低表达基因时一定要仔细,统计学上的波动会导致计算比率的巨大偏差,最终会使低表达基因漏检。本研究所采用的标准是在两个通道中强度皆大于背景的点被分析;在归一化之后,就要分析数据以指明差异表达基因。本研究为了从随机变化中真正分离出差异表达基因,进行了独立的 6 次杂交实验,并对两样品进行了 Cy5 与 Cy3 标记的互换,最后取其一致的数据来分辨差异表达基因。

最后,本研究采用了实时定量 RT-PCR 方法验证了由所制作的 cDNA 芯片筛选出来的差异表达基因,证明了芯片筛选差异表达基因的可靠性。由于该芯片是用快速老化模型小鼠海马的差异表达基因制作而成,所以该芯片可用于筛选中枢神经系统疾病相关基因尤其是与脑老化相关的神经退行性疾病相关基因,同时也可用于治疗这些疾病的药物作用机制和靶标的相关研究,本课题组已经应用其来研究 AD 发病的分子机制以及寻找治疗 AD 的药物靶标,并用来研究我国传统中药复方治疗疾病的分子机制,从而为开发新药提供了有力工具。如利用该芯片筛选 2 月龄、6 月龄和 12 月龄 SAMP8 和 SAMR1 海马和皮层的差异表达基因,初步揭示了 SAP8 脑老化以及学习记忆功能增龄性衰退的分子机制;利用该芯片筛选天然产物石杉碱甲 (Huperzine A) 和我国传统中药复方六味地黄汤 (LW)、八味地黄汤 (BW)、调心方 (TXF)、黄连解毒汤 (HL)、当归芍药散 (DSS) 对 SAMP8 海马和皮层基因表达的影响,研究 Morris 水迷宫 (Morris water maze)、穿梭箱 (shuttle box)、跳台 (step down)、避暗 (step through)、长时程增强 (LTP) 对 SAMP8 海马和皮层基因表达的影响,目前已初步形成我国传统中药复方治疗 AD 的分子网络机制,获得治疗 AD 的候选分子组合靶标 52 个。

致谢 本研究受到军事医学科学院微生物和流行病学研究所杨瑞馥研究员和周冬生博士的技术指导,在此表示感谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lap Ho, Naresh Sharma, Laurel Blackman *et al.* From proteomics to biomarker discovery in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 2005, **48**: 360 - 369
- [2] Poon HF, Castegna A, Farr SA *et al.* Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience*, 2004, **126**: 915 - 926
- [3] Poon HF, Farr SA, Thongboonkerd V *et al.* Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochemistry International*, 2005, **46**: 159 - 168
- [4] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270**: 467 - 470
- [5] Pullark J, Perou C, Alizadeh A *et al.* Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 1999, **23**: 41 - 46
- [6] Florence M Bareyre, Martin E Schwab. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *TRENDS in Neurosciences*, 2003, **26**(10): 555 - 563
- [7] James G Greene, Raymond Dingleline, Greenamyre J Timothy. Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, 2005, **18**: 19 - 31
- [8] Kisby GE, Standley M, Lu X *et al.* Nagalla. Molecular networks perturbed in a developmental animal model of brain injury. *Neurobiology of Disease*, 2005, **19**(1 - 2): 108 - 118
- [9] William Slikker Jr, John F Bowyer. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **206**: 255 - 260
- [10] Chen Juxiang, Xu Jian, Zhao Wei *et al.* Characterization of human LNX, a novel ligand of Numb protein X that is downregulated in human gliomas. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, **37**: 2273 - 2283
- [11] Amine Bahi, Jean-Luc Dreyer. Cocaine-induced expression changes of axon guidance molecules in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci*, 2005, **28**: 275 - 291
- [12] Karl Ekwall. Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends in Genetics*, 2005, **21** (11): 608 - 615
- [13] Lilia'na Z Fehe'r, Ja'nos Ka'lma'n, La'szlo' G Puska's *et al.* Impact of haloperidol and risperidone on gene expression profile in the rat cortex. *Neurochemistry International*, 2005, **47**: 271 - 280
- [14] Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX. Construction of suppression subtracted cDNA library of hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2004, **28**: 19 - 21
- [15] Ricardo Cristobal, Wackym P Ashley, Joseph A Cioffi *et al.* Assessment of differential gene expression in vestibular epithelial cell types using microarray analysis. *Molecular Brain Research*, 2005, **133**: 19 - 36
- [16] Kiran K Mantripragada, Patrick G Buckley, Teresita Diaz de Stahl, Jan P Dumanski. Genomic microarrays in the spotlight. *TRENDS in Genetics*, 2004, **20** (2): 87 - 94
- [17] Beheshti B, Braude I, Marrano P *et al.* Chromosomal localization of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarray comparative genomic hybridization. *Neoplasia* 2003, **5**: 53 - 62