

Agilent 2100 Bioanalyzer 在基因差异表达研究中的应用

刘翠华¹、马文丽¹、袁石嵘¹、袁阳谦¹、袁文岭² 第一军医大学分子生物学研究所 广东 广州 510515 广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所 广东 广州 510010

摘要 目的 观察 Agilent2100Bioanalyzer 芯片分析系统(以下简称 Bioanalyzer)在基因差异表达研究中的应用。方法 应用限制性显示技术分别从正常和热休克处理后的酿酒酵母细胞中分离出 cDNA 片段,然后再用 Bioanalyzer 和传统的琼脂糖凝胶电泳技术对 RD-PCR 产物进行检测分析。结果 Bioanalyzer 能更快速、敏感地分离和显示差异表达的基因片段,且通过对差异片段进行定量比较,发现了数个表达有明显差异的基因片段。结论 Bioanalyzer 在基因差异表达研究中具有重要的应用价值。

关键词 芯片分析系统; Agilent2100Bioanalyzer; 限制性显示技术; 琼脂糖凝胶电泳; 酿酒酵母; 热休克; 基因差异表达
中图分类号: Q785; R394.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)12-1066-04

Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in the study of differential gene expression

LIU Cui-hua¹, MA Wen-li¹, SHI Rong¹, OUYANG Qian¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To study the application of Agilent 2100 Bioanalyzer in the study of gene differential expression. Method The total RNAs were extracted and purified from *Saccharomyces cerevisiae* to synthesize double-stranded cDNAs by reverse transcription. Restriction display-PCR was employed to obtain the cDNA fragments, which were examined by Agilent 2100 Bioanalyzer and agarose gel electrophoresis. Results The analysis showed that Agilent 2100 Bioanalyzer was more sensitive and faster to isolate and display the differentially expressed genes, providing at the same time accurate quantitative information for each fragment in the DNA sample. Conclusion Agilent 2100 Bioanalyzer can be instrumental for the study of differential gene expression.

Key words: chip analysis system, Agilent 2100 Bioanalyzer; restriction display-polymerase chain reaction; agarose gel electrophoresis; *Saccharomyces cerevisiae*; heat shock; differential gene expression

目前在生物学及生物化学实验室中最为常用的核酸分析技术是板状凝胶电泳技术,主要是琼脂糖凝胶电泳技术来进行 DNA 的分析。尽管它相对而言比较经济简便,但肉眼所得的结果可能有偏差,往往需结合荧光或紫外分光光度计作进一步的定量分析。同时这些仪器仅提供样品的总浓度,不能提供有关样品的组分或潜在的污染等方面的信息,不能满足样品克隆、测序或基因表达研究等实验的需要。并且上述操作相对费时,所消耗的样品量也较大。Agilent 2100 Bioanalyzer 芯片分析系统(以下简称 Bioanalyzer)是商品化的、基于生物芯片实验室的核酸分析系统,可克服传统的板状凝胶电泳的这些局限性。有多种试剂盒可对不同类型的核酸样品进行分析。其中 DNA 7500 LabChip 试剂盒最适于分析 100~7500 bp 范围

的 DNA 片段。本实验选用 DNA 7500 LabChip 试剂盒在 Bioanalyzer 上对热休克处理前后酿酒酵母细胞的基因表达进行分析,以探索这一基于生物芯片实验室的核酸分析系统在基因差异表达研究中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

酿酒酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)由广州军区总医院医学实验科提供。反转录酶为 GIBCO 公司的 Superscript 域 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒购自 Amersham Pharmacia 公司。限制性内切酶 Sau 3A、玉尧 4 DNA 连接酶、*coli* DNA 聚合酶玉等购自大连 TaKaRa 公司。溴化乙锭、琼脂糖等试剂购自上海生物工程有限公司。500 LabChip 试剂盒由 Agilent Technologies 提供。

1.2 Agilent 2100 Bioanalyzer 仪器和软件

所有的基于芯片的分离过程均在 Bioanalyzer 上进行。由一在 PC 机上运行的配套软件进行仪器的控制。该软件包可进行数据采集、呈现和解释功能。数据既可以凝胶样图像和 / 或电泳图的方式显示,也可以

收稿日期: 2002-08-13

基金项目: 国家自然科学基金(39880032)广州市重点科技攻关项目(99-Z-022-01)

作者简介: 刘翠华(1976-),女,湖南长沙人,在读博士研究生,研究方向: DNA 芯片技术及应用研究。电话: 20-61648114-89098。本文通讯作者: 马文丽。

表格形式显示并且易于输出至不同的电子数字表格程序中

1.3 样品的准备

1.3.1 酵母细胞的培养 正常酵母细胞的培养院将酵母细胞单克隆挑入 2 ml YPD 液体培养基中20 r/min尧0 益培养 2 4 h遥经热休克处理的酵母细胞先在 37 益培养 1 h 后袁转到 30 益袁与正常酵母一同培养至对数生长期

1.3.2 酵母总 RNA 的抽提及 mRNA 的纯化 总 RNA 的抽提参照文献咱mRNA 的制备应用 Amersham Pharmacia 公司的 QuickPrepmRNA 纯化试剂盒袁操作方法按试剂盒说明

1.3.3 双链 cDNA 的合成 每 500 ng mRNA 加 5 滋 10 mmol/L dNTP尧Nasin 4 0 U尧ligo (dT)2 滋袁5 益加热 5 min袁水上迅速冷却袁短暂高速离心尧加入 5 伊第一链缓冲液 10 滋袁1 mol/L DTT 5 滋袁superscript域 4 0 0 U袁并用 DEPC 处理水调整体积至 50 滋遥混匀后室温放置 10 min袁2 益水浴 1 h袁水浴 2 min遥在第一链 cDNA 液中加入 50 U E.coli DNA 连接酶袁6 U DNA 聚合酶玉袁NaseH10 U尧适量的水和缓冲液袁混匀后 12 益 1 h尧2 益 1 h袁加入 5 滋 0.25 mol/L EDTA 终止反应遥纯化后用去离子水溶解

1.3.4 RD-PCR 按文献咱~5 咱进行遥将双链 cDNA 用 Sau 3A 玉酶切袁用 T4 DNA 连接酶连接接头(SIP院 5'-pGATCmCACACCAGCCAAACCCA-3' BIR院-G GTTTGGCTGGTGTG-3')袁再用通用引物 U渊TTTG-GCTGGTGTGGATCU冤进行扩增遥取其产物用选择性引物渊在通用引物 3' 端延伸 1 个碱基冤进行 PCR 扩增遥CR 条件院4 益 5 min袁4 益 30 s袁0 益 30 s袁2 益 1 min袁5 次循环尧2 益 7 min遥

1.4 芯片检测和分析

1.4.1 芯片的准备 按照 DNA7500LabChip 试剂盒所提供的说明进行遥每 1 试剂盒含有 25 块芯片和以下试剂:凝胶基质尧染料浓缩物尧DNA 相对分子质量标准(marker)尧DNA 长度测定梯度标准品(sizing ladder)尧注射器以及旋转过滤器遥凝胶-染料混合物的准备院将 400 滋 凝胶基质与 20 滋 染料浓缩物混合后袁用离心过滤器过滤遥将凝胶尧染料混合物注入分离芯片中袁将 5 滋 marker 加入各样品孔中

1.4.2 PCR 产物的芯片分离分析 取上述 PCR 产物各 1 滋 分别加入 12 个样品孔中 袁将 1 滋 ladder 加入指定的 ladder 孔中袁最后将芯片涡旋混匀后放入 Bioanalyzer 中进行自动检测分析

1.5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

取同样的 PCR 产物 1 滋 上样袁%的琼脂糖凝胶电泳袁0 V尧h 后用溴化乙淀渊将 5 滋 10 mg/ml 的溴

化乙淀加入 50 ml 的 1 伊 BE 中尧染色 15 min袁再以 50 ml 1 伊 BE 脱色 2 次以去除背景荧光袁然后用 UVP 扫描成像

2 结果

2.1 Bioanalyzer 与琼脂糖凝胶电泳分析的速度比较

通过芯片实验室(Lab-on-a-chip)技术袁Bioanalyzer 将样品的处理尧分离尧检测和数据分析等繁琐的步骤集成在 1 块仅 5 cm² 的芯片上遥与传统的凝胶电泳技术相比袁其分析速度显著提高袁可在 35 min 内完成对 12 个 DNA 样品的连续分析袁后者快 3~8 倍

2.2 寻找酿酒酵母热休克前后的差异表达基因片段

表 1 Agilent2100bioanalyzer 与琼脂糖凝胶电泳分析所需时间比较

Tab.1 Different time lengths required for examination by Agilent 2100 bioanalyzer versus agarose gels

Procedure	Time(min)	
	Chipsystem	Agarosegelsystem
Preparation(sampleloadingincluded)	5	30
Separation	30	30-180
Staining/destaining	-	15
Scanning/analysis	-	20
Total	35	95-245

通过分析 RD-PCR 产物的 2% 琼脂糖凝胶电泳 UVP 成像结果 渊图 1 冤和 Bioanalyzer 的凝胶样图像 渊图 2 冤表明袁两者的电泳图谱较为一致袁但 Bioanalyzer 的凝胶样图像中的条带不仅更为清晰和平整袁而且可分离和检测到不能被琼脂糖凝胶检测到的片段遥琼脂糖电泳难以检测到长度低于 100 bp 或浓度低于 0.5 ng 的 DNA 条带袁且分辨力不高袁很多条带不能被很好地分开袁因而不易发现和比较差异表达的基因片段遥而从 Bioanalyzer 的图像中我们可以清楚地观察到浓度低至 0.02 ng 的 DNA 片段以及短至 50 bp 的 DNA 条带袁这比前者的灵敏度要高 25 倍遥因而可方便地比较酿酒酵母在热休克前后各亚组 RD-PCR 基因片段数及其量的变化袁以寻找差异表达的基因遥图 2 中的奇数泳道显示的是正常酵母袁偶数泳道为热休克处理后的酵母袁A-TT 表示各 RD-PCR 亚组遥通过对各 RD-PCR 亚组的比较发现袁酿酒酵母在热休克后其 TT 亚组中大部分基因表达上调袁而 GG 和 TC 亚组则大部分基因表达下调袁这些基因表达的变化难以在琼脂糖电泳图上发现遥图 2 中箭头标示的成对条带为热休克前后表达差异明显的基因片段

2.3 应用 Bioanalyzer 分析软件对酵母细胞热休克处理前后的基因表达进行定量分析

Bioanalyzer 不仅可直接从其凝胶样图像上寻找

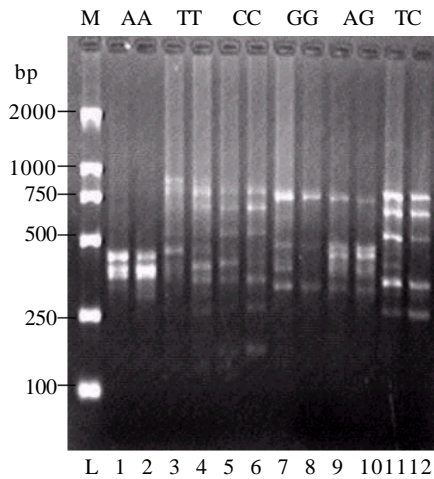


图 1 酵母细胞 RD-PCR 产物的 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoretic analysis of the gene fragments amplified by RD-PCR on 2% agarose gel

M:DNAMarkerDL2000;Lane1,2:PCRsubgroupsofAA;Lane3,4:PCRsubgroupsofTT;Lane5,6:PCRsubgroupsofCC;Lane7,8:PCRsubgroupsofGG;Lane9,10:PCRsubgroupsofAG;Lane11,12:PCRsubgroupsofTC;Lane1,3,5,7,9,11:RD-PCRproductsofnormalyeastcells;Lane2,4,6,8,10,12:RD-PCRproductsofyeastcellsafterheatshock

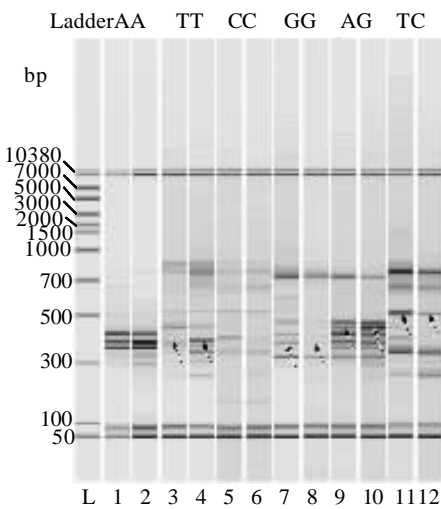


图 2 酵母细胞 RD-PCR 产物在 Agilent2100 bioanalyzer 系统中的凝胶样图

Fig 2 Gel image of RD-PCR products of normal yeast and yeast after heat shock examined by Agilent 2100 Bioanalyzer Lane1,3,5,7,9,11:RD-PCRproductsofnormalyeastcells;Lane2,4,6,8,10,12:RD-PCRproductsofyeastcellsafterheatshock.The differentially expressedgenes(indicatedby)areclearlydisplayedinpairs

差异表达的条带其数据分析软件还可将不同样品的电泳图叠加起来进行比较从而可更直观而方便地观察差异片段图 3 此外还可直接对 DNA 样品进行准确的定量从而可对差异表达的基因片段进行更精确的比较分析通过对观察到的各 RD-PCR 亚组中的差异条带进行定量比较发现了数条表达差异明显的基因片段表 2 从表中可见 TC 亚组中正常组

的第 6 个条带与热休克组的第 5 个条带为同一基因片段 通过对片段长度的比较而确定且后者的 DNA 量不到前者的 1/4 表明其表达显著下调

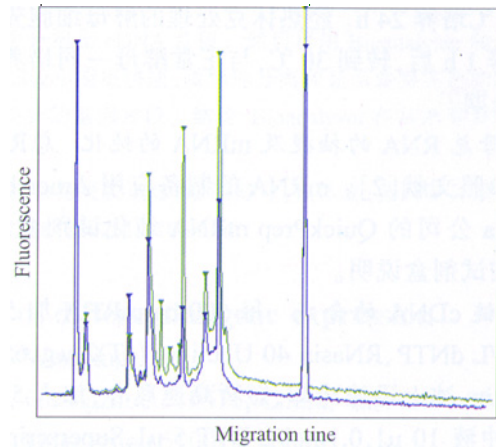


图 3 热休克前后酵母细胞 GC 亚组 RD-PCR 片段在 Agilent2100Bioanalyzer 上的电泳叠加比较图

Fig.3 Overlay of the 2 electropherograms of RD-PCR fragments in subgroup GC of normal yeast and yeast after heat shock analyzed by Agilent 2100 Bioanalyzer Greenline:normalyeast;Blueline:yeastafterheatshock

表 2 热休克处理前后酵母细胞 GC 亚组 RD-PCR 差异片段的定量比较分析

Tab.1 Quantitative comparison of differential RD-PCR fragments in subgroup GC of normal yeast and yeast after heat shock

Normalyeast			Yeastafterheatshock			Ratio
Peak	Size(bp)	Concentration (ng/滋)	Peak	Size(bp)	Concentration (ng/滋)	
2	93	2.60	2	93	2.40	1.08
3	261	1.10	3	259	1.50	0.73
4	341	4.70	4	340	3.00	1.57
6	513	3.00	5	513	0.71	4.23
7	661	2.30	6	660	1.50	1.53
9	788	4.90	7	788	2.50	1.96

3 讨论

随着生命科学研究的不断发展传统的 DNA 分析技术越来越难以适应现代实验室对 DNA 样品分析效率的要求最近推出的第 1 个基于芯片实验室技术的核酸分析系统 Agilent2100Bioanalyzer 能更快速简便地进行 DNA 样品的分离检测以及定量分析它是通过微流体技术对样品进行分离当给芯片加入电压时样品便在芯片上的显微蚀刻管道中进行毛细管电泳在样品流动过程中不同 DNA 片段根据其大小被分离凝胶 - 染料基质中的荧光染料可对样品进行染色从而使其可被检测由于分离管道的缩短和高电场强度的应用使得分离微量 DNA 样

品的速度显著加快。有一微机与其相连以便于对样品的分离进行控制。对片段大小和浓度信息进行记录。以及对数据进行实时的自动化分析和处理。而实现了样品分离、检测和结果分析过程的简化和集成。其操作仅包括 3 步:即加样、运行分析程序以及观察结果。它可在 30min 左右完成对 12 个样品的连续分离分析。并可实时显示分析结果。而在应用琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 分析时操作相对繁琐。且费时费力。需要较大的样品。需要进行凝胶的制备。凝胶染色。脱色。成像及结果分析等步骤。且还有接触致癌物质如 EB 的潜在性危险。

在基因表达研究中。为获得有关基因差异表达的信息。需对微量的核酸样品进行分析。因而检测的灵敏度显得非常重要。Bioanalyzer 通过一个高度灵敏的荧光检测系统对样品进行检测。因而与传统的核酸分析方法相比。它具有更高的灵敏度。所需的样品量和试剂量显著减少。只需 1 滋的 DNA 样品。本实验以酿酒酵母热休克前后的 RD-PCR 产物分别进行 Bioanalyzer 分析和琼脂糖凝胶电泳分析比较。研究结果显示 Bioanalyzer 可清楚地显示很大浓度范围。低至 0.02ng 以及短至 50 bp 的 DNA 片段。且可更好地分离各 DNA 条带。而便于对基因的表达差异进行比较。而琼脂糖凝胶电泳的图像很不清晰。尤其在较低浓度时。不能很好地显示各 DNA 片段。难以发现差异表达的基因。

Bioanalyzer 可在确定 DNA 样品大小以及检测样品纯度的同时。对 DNA 片段进行准确定量。这一优点使其可用于对基因的表达进行定量研究。其定量的准确度和重复性由以下几方面得到保证。Bioanalyzer 有配套的试剂盒和标准化的操作方法。因而减少了人为因素的影响。提高了结果的可重复性和准确性。同时也有助于减少不同操作次数之间。芯片之间以及仪器之间的误差。是由于染料结合的非均一性。Bioanalyzer 芯片分析系统中。不仅应用了常规的外标准。zinger ladder。还在每一泳道中加入了内标准。markers。可进行各样品条带大小和浓度的校正。这就减少了各个样品顺序流经分离管道的过程中产

生的轻微变异。而通常在凝胶电泳过程中不加入内标准。此外。琼脂糖电泳时。在将样品加入浸入电泳液中的凝胶的过程中也会产生变异。而 Bioanalyzer 无需此步骤。本实验通过对热休克前后的酵母差异表达基因片段进行定量比较。发现了数个表达有明显差异的基因片段。

Bioanalyzer 芯片分析系统除了可用于 DNA 分析。还可结合相应的其他试剂盒进行 RNA、蛋白质以及细胞等样品的分析。本文应用其对酿酒酵母细胞热休克处理前后的基因表达进行分析。以探索其在基因差异表达研究中的应用。表明 Bioanalyzer 可清晰地分离和显示酵母的 RD-PCR 基因片段。并可对差异基因片段进行定量和比较分析。因而可为进一步的基因克隆和功能分析提供重要指导。

参考文献

- 咱暂奥期伯 F, 布伦特 R, 金斯頓 RE. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 524-5.
- 咱暂SchmittME, BrownTA, TrumppowerBL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(10): 3091-2.
- 咱暂马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示 D-PCR 一种新的差异显示技术. 咱暂见: 孙志贤, 主编. 全生生物化学与分子生物学研究进展. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113.
- 咱暂郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶 AP 的差异表达显示. 咱暂见: 叶鑫生, 沈倍奋, 主编. 细胞调控探索. 北京: 军事医学出版社, 1998. 73-92.
- 咱暂马文丽, 郑文岭, 崔东, 等. 利用瓷片材料制备 DNA 微集芯片. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(3): 285-9.
- Ma WL, Zheng WL, Cui D, et al. DNA microarray chips made on surface of ceramic slides. *J Biochem Biophys*, 2000, 32(3): 285-9.
- 咱暂Lu CY, Tso DJ, Yang T, et al. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clin Chim Acta*, 2002, 318(1-2): 97-105.
- 咱暂Nachamkin I, Panaro NJ, Li M, et al. Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2): 754-7.
- 咱暂Gottwald E, Muller O, Polten A. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Electrophoresis*, 2001, 22(18): 4016-22.

我国医学教育的开山之刊《医育曳》

为廓清中国医学各学科期刊的发展脉络。第四军医大学学报编辑部王睿等最近运用文献考证和编辑学方法对创刊于 1935 年 10 月的《医育曳》月刊做了首次研究。确认其为最早的医学教育期刊。将其特色归结为: 反映医学教育的发展进程和水平。反映医学院校发展概况等。并对其动态栏目设置、编辑点评和倡导学术争鸣、倡导医学论文的规范化、倡导教研相长和编研相长等编辑思想和方法做了分析。