

The Validation of Mouse Toxicology Gene Chip Technology

小鼠毒理基因芯片的可靠性验证

敖琳¹/高利宏¹/胡冉¹/曾志雄²/
方志俊²/曹佳^{1,*}/杨梦苏²

(1. 第三军医大学预防医学系卫生毒理学教研室, 重庆 400038; 2. 香港城市大学基因组科技应用研究中心, 香港)

AO Lin¹, GAO Li-hong¹, HU Ran¹, ZENG Zhi-xiong²,
FANG Zhi-jun², CAO Jia^{1,*}, YANG Meng-shu²
(1. Department of Toxicology, College of Preventive Medicine,
Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
2. Applied Research Center for Genomic Technology, City University
of Hong Kong, Hong Kong, China)

【摘要】背景与目的: 建立小鼠毒理基因芯片杂交检测方法, 同时验证芯片数据的可靠性。材料与方法: 采用数据的标准化处理、芯片内的参照点分析、自身比较实验以及差异分析实验方法, 检验芯片数据的可靠性。结果: 局部均值化标准化方法使数据的线性趋势更加明显; 参照点分析显示芯片无非特异性杂交, 芯片内部基因表达的重复性较高; 自身比较实验中各个批次芯片的假阳性率在1%以下, 并且无明显差异; 差异分析实验中荧光交换标记方法可以减少染色误差的影响。结论: 以上结果初步表明, 所建立的基因芯片制作和检测技术能保证获得可靠性较好的数据。

【关键词】基因芯片; 毒理学; 可靠性分析

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)02-0139-05

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To establish the techniques of gene chip hybridization, and to verify the reliability of the gene chip data. MATERIAL AND METHODS: Several methods were applied to test the reliability of data, including data normalization treatment, analysis of reference spots, self-comparison test and differential expression experiment. RESULTS: The localized mean normalization method could be used to treat the original data effectively. There was no nonspecific hybridization in the negative control spots, and good reproducibility could be achieved among the repetitive genes in a chip. Meanwhile different batches of chips had good quality and reproducibility, and fluorescein swap labeling had advantages in reducing the staining errors. CONCLUSION: The results proved the validity of the chip hybridization and detection technology established in our lab.

【KEY WORDS】 gene chip; toxicology; analysis of reliability

目前利用基因芯片检测技术已产生了大量数据, 但作为一项新兴的技术, 基因芯片实验从前期的芯片制作到最后的的数据提呈, 都存在较多的干扰因素, 直接影响了数据的可靠性和可用性^[1]。国际上已有了一些有关芯片技术标准化和质量控制的研究成果, 我们前期自行设计、制作了小鼠毒理基因芯片^[2], 同时参照相关文献的研究结果, 进一步对该芯片的杂交检测方法进行可靠性验证, 以确保获得高质量的芯片和建立起合格的检测技术。

1 材料与方法

1.1 基因芯片 小鼠毒理基因芯片由本实验室与香港城市大学基因组科技应用研究中心联合设计制作, 含 1 796 个基因和 140 个参照点。

1.2 试剂和仪器 Tripure 分离试剂为 Roche 公司产品, Superscript II 逆转录酶试剂盒为 Invitrogen 公司产品, RNA 酶抑制剂和 dNTPs 为 Promega 公司产品, Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 为 PerkinElmer Life Science 公司产品; ScanArrayExpress 激光共聚焦扫描仪由美国

收稿日期: 2005-10-08; 修订日期: 2005-12-21
基金项目: 国家 973 课题分题 (No. 2002CB512901); 国家杰出青年基金资助项目 (No. 30125037); 国家自然科学基金资助项目 (No. 30271136, 30200354)
作者简介: 敖琳 (1971-), 女, 重庆市人, 博士研究生, 主要从事环境与毒理基因组学研究。

* Correspondence to: CAO Jia Tel: 86-23-68752271, E-mail: caojia@tmmu.edu.cn

PerkinElmer Life Science 公司生产。

1.3 RNA 样本和荧光标记探针的制备 收获待检测的细胞样本, 采用 Tripure 分离试剂提取总 RNA, 方法参考 Tripure 试剂使用说明, 同时利用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 1% 变性胶电泳检测 RNA 完整性。取对照组和实验组 RNA 各 50 μg 分别进行逆转录反应合成荧光标记探针, 方法如下: RNA 溶液中加入 Oligo dT(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 2 μl , RNA 酶抑制剂(40 U/ μl) 0.25 μl , 加 DEPC 处理的 H_2O 调整体积为 10 μl , 70 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min, 冰浴 10 min。再加入以下试剂: 第一链缓冲液(5 \times) 4 μl , DTT(0.1 mol/L) 2 μl , dNTPs(A、G、C、T 的浓度分别为 0.5、0.5、0.5 和 0.1 mmol/L) 2 μl , SS II 逆转录酶(200 U/ μl) 1 μl , 同时对对照组和实验组分别加入 Cy3-dUTP(或 Cy5-dUTP) 各 1 μl , 上述反应体系于 42 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 进行逆转录反应。反应结束后加入 0.5 mol/L NaOH 0.1 mol/L EDTA 15 μl , 65 $^\circ\text{C}$ 温浴 10 min 水解残余的 RNA, 再加入等量的 0.5 mol/L HCl 1 mol/L Tris(pH 7.4) 中和。最后合并实验组和对照组探针, 移入 Millipore 柱中洗涤纯化探针。

1.4 芯片杂交、洗涤和扫描 探针中加入封闭液 4.5 μl , 10% SDS 0.15 μl , 于 100 $^\circ\text{C}$ 变性 2 min 后置冰上。探针点片、盖玻片封片后, 65 $^\circ\text{C}$ 湿盒孵育 18 h。杂交结束后, 玻片在 37 $^\circ\text{C}$ 的 SSC 和 SDS 洗涤液中洗涤, 离心甩干玻片。使用激光共聚焦扫描仪扫描芯片, 操作方法参照仪器使用手册。

1.5 数据的提取和标准化处理 利用 Quantarray 软件分析提取原始数据, 原始数据的标准化处理采用伍亚舟等^[1]的局部均值化标准化方法, 主要步骤为: 根据荧光强度、杂交点面积、直径等标准筛选出合格的杂交点; 按照总荧光强度大小对杂交点进行排序、分组, 采用 Trimmean 函数获得每个杂交点的标准化因子(NF); 最后计算每点的原始表达比值(Ratio)和标准化后的表达比值(Ratio'), 其中 $\text{Ratio}' = \text{Ratio}/\text{NF}$, 杂交点的表达比值即为实验组荧光信号强度与对照组荧光信号强度的比值。

1.6 芯片内参照点的信号分析 芯片中的参照点包括 3 类: 空白对照点(29 点), 酵母基因对照点(15 点)和看家基因对照点(96 点)。分析内容包括: 空白对照点和酵母基因对照点的图像、荧光信号强度以及信号/噪声比值(SNR); 看家基因对照点的 Ratio 值及其变异系数(CV)等。其中 SNR 表示为: $\text{SNR} = \text{荧光信号强度}/\text{背景强度的标准差}$ 。

1.7 自身比较实验 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 分别标记相同的 RNA 后进行芯片杂交试验。样本来自培养

的小鼠 BALB/c 3T3 细胞, 提取细胞总 RNA 后, 在每次杂交试验时将 RNA 平均分为 2 份, 逆转录反应时分别标记 Cy3 或 Cy5, 按照上述芯片杂交检测方法进行试验, 检测所用芯片从自行制作的各个批次小鼠毒理基因芯片中随机抽取。数据经过标准化处理后, 分析芯片的假阳性基因数, 计算假阳性率(False positive rate, FPR), FPR 为假阳性基因数占基因总数的百分率。

1.8 差异分析实验 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 分别标记两种不同来源的 RNA, 比较二者基因表达的差异。样本分别来自 BALB/c 3T3 细胞两阶段转化实验中的对照组(溶剂二甲基亚砷处理的细胞)和实验组(促癌剂岗田酸处理 7 d 的细胞)。逆转录反应时, 采用 2 种方法进行荧光标记: ①对照组 RNA 标记 Cy3, 实验组 RNA 标记 Cy5; ②实验组 RNA 标记 Cy3, 对照组 RNA 标记 Cy5, 其余方法同上述芯片杂交检测实验。数据经过标准化处理后, 筛选芯片的差异表达基因, 同时分析芯片间的相关系数(r), 其中 r 采用 Pearson 相关系数:

$$r = \frac{\sum_i (\chi_i - \bar{\chi})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (\chi_i - \bar{\chi})^2 (y_i - \bar{y})^2}}$$

其中 x, y 分别为 2 张芯片

中每个基因相应的 Ratio 值。

1.9 统计学方法 数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 RNA 样本的质量检测结果 用于芯片检测的 RNA 样本质量要求符合以下条件: ①电泳检测 RNA 的完整性好, 28S 和 18S 的条带明亮、清晰; 28S 的亮度为 18S 的 2 倍以上; 5S 条带不明显; 无 DNA 污染。②紫外分光光度计检测 RNA 的纯度好, A_{260}/A_{280} 比值大于 1.8。本实验用于芯片检测的 RNA 均达到上述要求, 确保了实验结果的可靠性(图 1)。

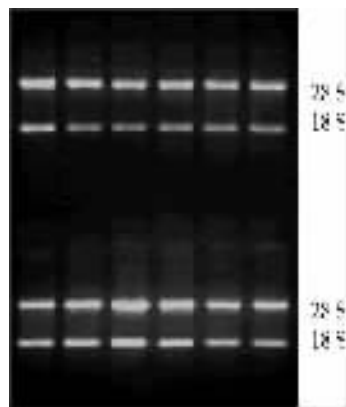


图 1 部分 RNA 样本的电泳图
Figure 1 The electrophoresis image of some RNA samples

2.2 数据的标准化处理结果 采用适当的标准化方法对原始数据进行处理,能够减少芯片杂交检测过程中系统误差的影响。我们对本研究中所有芯片的杂交图像和原始数据进行分析后发现,同一芯片上各杂交点的信号存在强度差别较大的现象,因此适合采用局部均值化方法,在不同的信号强度范围内分别对数据进行标准化处理。图 2 为某张芯片的原始数据和标准化后数据的比较,可见标准化后 Cy3 与 Cy5 信号强度的关系散点图有了明显的改善,数据的线性分布趋势更加明显,更趋于分布在 $Y = X$ 的直线上。

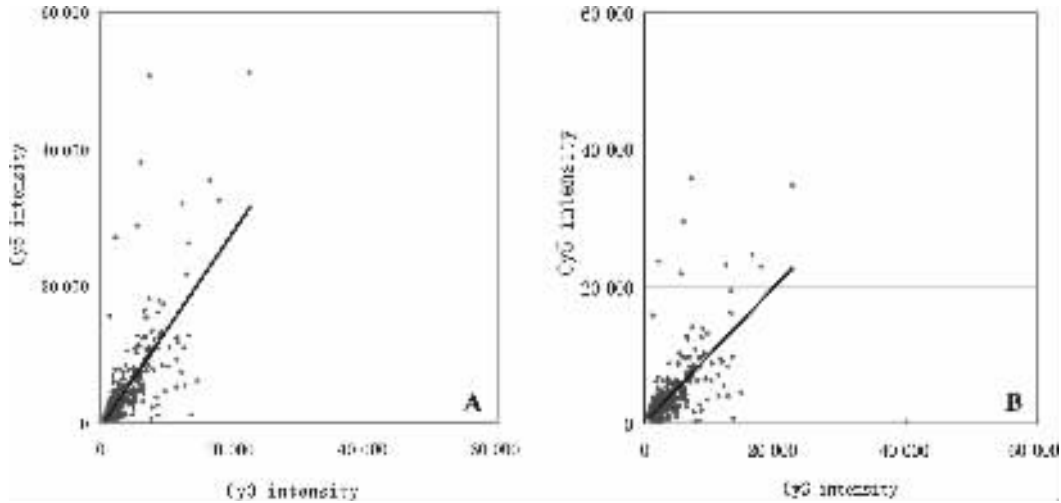


图 2 标准化前后两通道(Cy5/Cy3)信号强度的分布情况。A: 标准化处理前; B: 标准化处理后
Figure 2 The distribution of signal(Cy5/ Cy3) before or after normalization treatment. A: Before normalization treatment; B: After normalization treatment

2.3 芯片内参照点的信号分析结果 对参照点的分析显示,每张芯片上阴性对照点(包括空白对照点和酵母基因对照点)的信号很弱,荧光强度和信噪比均明显低于筛选出的合格杂交点,表 1 为本研究中随机抽取一张芯片的统计结果,提示阴性对照点不存在非特异性杂交,芯片结果是有效的。同时芯片上设计有 24 个看家基因,每个基因重复点样 4 次,即 96 个杂交点。检测结果表明芯片内重复点样基因的表达比值变化很小, CV 值低,提示芯片内部基因表达检测的重复性高,表 2 为随机抽取的一张芯片中 4 个看家基因的统计结果。

表 1 空白对照点、酵母基因点与筛选基因点的信号比较

Table 1 The comparison of signal between blank spots, yeast genes and filtered genes

Groups	n	Intensity		SNR	
		Log ₁₀ (Cy3)	Log ₁₀ (Cy5)	Log ₂ (Cy3)	Log ₂ (Cy5)
Blank Spots	29	2.62 ± 0.22 *	2.57 ± 0.22 *	1.95 ± 0.48 *	1.74 ± 0.49 *
Yeast Genes	15	2.71 ± 0.21 *	2.69 ± 0.21 *	1.80 ± 0.52 *	1.65 ± 0.41 *
Filtered Genes	1101	3.65 ± 0.43	3.41 ± 0.21	3.66 ± 1.27	3.43 ± 1.15

Compared with filtered genes group, * $P < 0.001$; SNR represents the signal noise ratio.

表 2 芯片内看家基因表达比值的重复性分析

Table 2 Results of reproduction analysis of ratio of house-keeping genes in a chip

Gene name	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	$\bar{x} \pm s$	CV
Tubb5	1.082	1.048	1.071	1.040	1.060 ± 0.020	0.018
Rps9	1.470	1.327	1.420	1.344	1.390 ± 0.067	0.048
α-tubulin	0.769	0.812	0.738	0.720	0.760 ± 0.040	0.053
H2-D1	0.652	0.529	0.603	0.555	0.585 ± 0.054	0.092

Note: Spot 1, 2, 3 and 4 represent four repetitive spots of one house-keeping gene in a chip.

2.4 自身比较实验结果 自身比较实验的目的主要是发现可能存在的系统误差。理论上,自身比较实验中所有基因的表达比值应该为 1.0,但是由于实验体系中的系统误差,一部分基因的比值会偏离 1.0,按照差异表达基因的筛选标准,其中比值超过筛选标准的基

因,称为“假阳性基因”。我们对制作的 5 个批次芯片(批号为 C, E, F, G, H)进行了自身比较实验,分别采用目前常用的 2 种筛选标准(Cutoff)来统计假阳性基因数。表 3 显示,2.0/0.5 筛选条件下的假阳性基因数平均为 10.86, FPR 值在 1% 以下。此外在每个筛选标准下,



表 3 自身比较实验中不同批次芯片的假阳性基因数比较

Table 3 The comparison of number of false positive genes between different batch of chips on self-comparison experiment

Cutoff	C1	C2	C3	E	F	G	H	P Value	Mean
2.0/0.5	11(0.57)	15(0.77)	6(0.31)	12(0.62)	7(0.36)	9(0.46)	16(0.83)	> 0.05	10.86(0.56)
1.75/0.67	68(3.51)	47(2.42)	59(3.05)	67(3.46)	70(3.62)	51(2.63)	56(2.89)	> 0.05	59.71(3.08)

Note: The number in the parenthesis represents false positive rate (FPR, %).

芯片之间的假阳性基因数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明不同批次芯片对杂交结果无明显影响, 提示本研究制作的芯片质量稳定, 数据的重复性、可靠性较好。

2.5 差异分析实验结果 在差异分析实验中, 采用两种荧光标记方法完成了 3 张芯片杂交, 其中 2 张采用相同的标记方法 (Chip1 和 2), 1 张采用荧光交换标记方法 (Chip3)。按照 2.0/0.5 的筛选标准, Chip1, 2, 3 的差异表达基因数分别为 44、53 和 51, 其中 Chip1 与 Chip2 的共同差异基因数为 33, Chip1, 2 分别与 Chip3 的共同差异基因为 22 和 26, 表明在标记方法相同的重复实验中获得共同差异基因更多, 同时 Chip1 与 Chip2 的相关系数 (r) 为 0.93, 而 Chip1, 2 与 Chip3 的 r 值分别为 0.91 和 0.89, 存在下降趋势。此外, 荧光交换实验中, Chip1 与 Chip3, Chip2 与 Chip3 的共同差异基因中分别有 1 个和 2 个基因的表达方向相反; 而在 Chip1 和 Chip2 中未发现此现象。

3 讨论

基因芯片杂交实验的全过程存在一定的系统误差, 涉及 RNA 抽提、荧光双色标记、杂交洗涤以及芯片扫描和数据分析等各个环节^[1]。为此, 我们通过数据的标准化处理、自身比较实验以及荧光交换实验等方法, 检验了数据的可靠性, 以减少或消除系统误差的影响。

有研究者分析了总 RNA 和 mRNA 来源的探针与芯片杂交的差异^[4], 显示这两种方法能获得较高的一致性, 未经纯化的 RNA 同样能有效地用于芯片检测, 而分离的 mRNA 因有不同程度的丢失而导致荧光信号较弱, 因此我们直接使用总 RNA 进行实验, 未采取 mRNA 分离纯化步骤。此外, 由于芯片检测对实验条件的变化高度敏感, 因此我们推测 RNA 样本的微小差异将给数据带来明显影响, 从而导致假阳性或假阴性结果的出现, 为此在 RNA 样本的制备过程中, 对实验组和对照组样本采用相同方法、相同试剂、同时进行抽提。

芯片扫描图像中提取的原始数据需要经过标准化处理, 使芯片内部的信号更加一致, 更具有线性趋势, 从而使处理后的数据具有可比性和可靠性。目前已报道的标准化方法较多, 如: 看家基因标准化法、总强度标准化法、中值标准化法、参照点和参照阵列标准化法等, 其中

总强度标准化法是现今商业软件中采用较为广泛的一种^[5,6]。但有研究者认为^[3], 杂交点的表达比值与其信号强度存在一定联系, 随着信号强度分布范围的变化, 表达比也出现一定的变化; 同时有的芯片上杂交点的信号强度差异很大, 分布也不均匀, 对此类芯片简单使用总强度标准化处理显然会带来较大偏差, 因而提出了一种局部均值化标准化方法, 其原理与总强度标准化法相同, 但首先需要按照杂交点信号强度的大小排序、分组, 然后在局部范围内求标准化因子, 这种方法一定程度上结合了其他标准化方法的特点, 同时能更好地反映芯片上的局部信号。我们分析芯片杂交图像后采用了局部均值化标准化方法, 结果显示, 标准化后数据的线性分布趋势明显增强, 因此该方法能有效纠正由于杂交点信号强度差异太大带来的偏差, 使处理后的数据更真实可靠, 为下一步利用芯片数据进行差异表达基因筛选和聚类分析创造了条件。

本芯片中设计有数个参照点, 用以衡量单张芯片杂交实验的可靠性。表达谱芯片一般设计有阴性对照点以验证是否存在非特异性杂交^[7], 可采用空白对照或其他物种基因, 如水稻 *URNA* 基因、*HCV* 外壳蛋白基因、酵母基因等, 本研究中芯片未出现非特异性杂交, 数据的可靠性较好。此外, 重复性是保证芯片数据可靠性的条件之一, 本研究设计的毒理芯片由于芯片容量等原因并未对每个基因进行重复点样, 但对每个看家基因重复点样 4 次, 统计显示芯片内同一看家基因表达比值的变异系数小、重复性高, 从一个侧面反映了数据的重复性情况。

自身比较实验是目前普遍应用于评估芯片数据的可靠性、评判芯片质量和实验系统优劣的方法^[8], 我们对制作的每个批次芯片抽样进行了自身比较实验。结果显示, 当差异表达基因的筛选标准为 2.0/0.5 时, 芯片的假阳性率均在 1% 以下, 这与国际上较好的水平 (< 3%) 一致^[9], 由于一次实验的假阳性率小于 1%, 理论上重复 2 次实验后假阳性基因的发生率应该很低 ($1\% \times 1\% = 0.01\%$)。此外, 筛选条件不同也会影响假阳性基因数, 目前国际上还没有一个公认的差异表达基因筛选标准, 比较常用的筛选数值有 3.0/0.3、2.0/0.5 和 1.75/0.67 等^[10]。从结果看, 随着筛选标准的降低, 假阳性基因也随之增多, 因此我们认为, 本实验条件下采用 2.0/0.5 的差异基因筛选标准, 进行 2 次重复实验,

能够获得比较真实可靠的数据,这种筛选标准也与目前比较通用的标准一致^[11]。

本研究发现,荧光交换重复实验中数据的重复性有所下降,并且有表达相反的基因出现,这种现象提示在杂交实验中存在一定的染色误差,其原因涉及两种染料的物理性差异(相对半衰期,光、热敏感性)、标记效率以及杂交效率差异等因素^[1]。此外双荧光标记方法也可能造成所谓的基因-标记间相互作用,例如可能存在某种特殊的基因片段,某种荧光对其具有特别的亲合及掺入能力,在此情况下,这种基因无论其真实表达水平如何,检测时在该荧光信道上总是呈现更高的表达水平^[11,12]。数据的标准化处理和普通的重复性实验都不能消除这种误差,目前看来荧光交换重复实验是校正这种误差最有效的方法^[6,12],只有在荧光交换重复实验中获得一致结果的基因才可能是真正的差异表达基因。由此可见,虽然采用荧光交换方法在一定程度上降低了检测的重复性,减少了获得的差异表达基因数量,但从另一个角度证明该方法是有效的,能排除由于基因特异性标记所造成的假阳性。因此,芯片检测不能单纯追求数据的重复性,只有在全面校正芯片误差基础上获得的重复性结果才是真实可信的。

基因芯片研制和检测体系涉及大量技术环节,目前的可靠性检验仅仅是其中的极少部分,还需今后大量的补充性实验去加以完善。Brazma等^[13]提出的MIAME方案近年来已获得了国际上的广泛认同,这既是描述和交流基因芯片数据的统一标准,同时也是建立规范的基因芯片技术平台的指导策略,这提示我们将MIAME等国际标准应用于今后毒理基因芯片的研发中,使基于此技术平台进行的毒理学研究更加真实可靠。

参考文献:

[1] Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, *et al.* Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(12): 2 549-2 557.

[2] 敖琳,曾志雄,方志俊,等.小鼠毒理基因芯片的设计和制作[J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18(2): 135-138.

[3] 伍亚舟,张彦琦,黄明辉,等.基因芯片表达数据的标准化策略研究[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(7): 594-597.

[4] 范保星,孙敬芬,刘庆峰,等.总RNA和MRNA来源的探针与CDNA芯片杂交的差异研究[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(1): 20-22.

[5] 伍亚舟,易东,李辉智.基因表达芯片标准化研究进展[J]. *数理医药杂志*, 2005, 18(1): 60-63.

[6] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation[J]. *Nature Genetics Suppl*, 2002, 32: 496-501.

[7] 顾永清,杨磊,王国荃,等.急性砷染毒的L-02细胞的基因芯片分析[J]. *西安交通大学学报*, 2003, 24(6): 558-560.

[8] Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, *et al.* Array-Based Comparative Genomic Hybridization for the Genomewide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(6): 1 261-1 270.

[9] Yue H, Eastman PS, Wang BB, *et al.* An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(8): E41-1.

[10] Ueno Y, Alpini G, Yahagi K, *et al.* Evaluation of differential gene expression by microarray analysis in small and large cholangiocytes isolated from normal mice[J]. *Liver Int*, 2003, 23(6): 449-459.

[11] Arai M, Yokosuka O, Chiba T, *et al.* Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 29 813-29 818.

[12] Zhou Y, Gwadry FG, Reinhold WC, *et al.* Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 1 688-1 695.

[13] Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, *et al.* Minimum information about a microarray experiment (MIAME) -toward standards for microarray data[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(4): 365-371.

