

应用 cDNA 芯片分析 79 个新基因的人胚组织表达谱*

马淑华¹⁾ 王敦成²⁾ 邹宗亮¹⁾ 沈倍奋²⁾ 王升启^{1)**}

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; ²⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 大规模 cDNA 测序和生物信息技术相结合, 得到来自于商品化的人胚肾 cDNA 文库 79 个代表新基因的表达序列标签 (EST). 随后, 采用高速度机械手制备这些 cDNA 的基因芯片, 用于鉴定 79 个新基因的 ESTs 在 20 周、26 周两个胚胎时期 6 种组织中的基因表达状况, 以研究这些 EST 片段代表的新基因功能提供线索. 通过芯片杂交及结果分析, 得到同一个组织两个不同时相 8 个差异表达的基因, 随后的 RNA 印迹分析的结果与芯片杂交的结果相一致.

关键词 cDNA 芯片, 新基因, 表达序列标签 (EST), 差异表达 RNA 分析

学科分类号 Q754

cDNA 芯片技术是伴随人类基因组计划的发展而出现的新技术之一. 它通过微阵列技术, 将高密度 cDNA 阵列通过机器人以一定的顺序点到支持物表面, 将荧光标记的探针与其通过碱基互补配对原则杂合, 从而对基因的表达特征进行细微观察^[1,2]. 它可以同时研究组织、细胞在不同生理、病理条件下成千上万个基因结构、功能改变以及基因表达相互作用的关系, 有利于在短期内发现致病相关基因、发育相关基因. 这种方法具有高度并行性、自动化、微型化等特点, 目前已被用于研究植物、人类疾病、酵母代谢等方面基因表达^[3,4].

本研究应用 cDNA 芯片技术分析从人胚肾 cDNA 文库中筛选的新基因片段在 20 周、26 周两个胚胎时期正常胎心、胎脑、胎肝、胎脾组织中的表达状况, 以初步探索新基因的功能, 寻找参与胚胎组织正常发育的关键基因.

1 材料和方法

1.1 人胚肾 cDNA 文库

人胚肾 cDNA λ TriplEx 噬菌粒文库 (Clontech 公司) 感染大肠杆菌 BM25.8 (Clontech 公司), 在含羧苄青霉素 (50 mg/L, Sigma 公司) 的 LB 培养基上转化为质粒文库.

1.2 序列测定及同源性分析

PCR 扩增挑选阳性克隆进行序列分析. PCR 扩增引物设计如下: P₁: 5'-ATTACG CCAA GCTCCGAAATCTGG-3' (上游); P₂: 5'-GTCAC GA

CG TTGTAAACGACGGC-3' (下游). 测序引物设计如下: 5'-CAAGCT CC G AGATCTGGACGAGC-3' (上游); 5'-GTAA AAC GA CGG CCA GTGA AT TGT-3' (下游). 序列分析与引物合成由大连宝生物公司完成. 通过互联网和相关的生物信息学软件对测定的 192 条 EST 进行同源性分析 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, bioinf.bmi.ac.cn)^[4], 得到 79 个代表新基因的 EST 片段.

1.3 DNA 片段的制备

利用 PCR 方法扩增 79 个代表新基因的 ESTs、8 个看家基因片段及 1 个 pGEM-3Zf 质粒 DNA, 使用 ArrayIt™ 96 孔板纯化试剂盒进行纯化 (TeleChem 公司), 以 0.5 g/L 浓度溶于 1 × Micro Spotting solution (TeleChem 公司), 保存于 96 孔板中.

1.4 cDNA 芯片的制备

使用芯片点样仪 (Cartesian 公司) 将 96 孔板中的 PCR 产物点于氨基硅烷化的玻璃片表面 (Sigma 公司), 制备成 11 列 × 16 行 (同一基因纵向重复点 2 次) 和 11 列 × 8 行两种 cDNA 芯片. 看家基因作为阳性对照及定量分析的内标, pGEM-3Zf 质粒 DNA 作为阴性对照. cDNA 芯片中基因片段的定位见表 1.

* 国家自然科学基金重点项目 (39889001).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-10-08, 接受日期: 2000-12-12

Table 1 Array arrangement lists of the novel gene fragments

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	802	827	916	945	9172	9239	939	968	9116	+ 1	9197
B	803	829	921	946	9176	9528	944	970	9129	+ 2	9205
C	805	832	925	951	9193	816	947	975	9136	+ 3	9206
D	806	877	927	960	9201	824	948	9104	9138	+ 4	9208
E	809	901	930	-	9202	825	952	9107	9144	+ 5	9212
F	810	902	933	983	9209	908	953	9109	9145	+ 6	9221
G	815	903	934	9105	9218	910	963	9110	9161	+ 7	9230
H	820	915	937	9170	9233	912	967	9114	9190	+ 8	975

Mark: 8 represents clone number 981112, and 9 represents clone number 990318. "-" represents negative control of pGEM-3Zf.

+ 1 to + 8 represents positive control. + 1: HPRT; + 2: human β -Actin; + 3: human 23-kDa highly basic protein; + 4: human

G3PDH; + 5: human ribosomal protein S9; + 6: G3PDH; + 7: human α -tubulin; + 8: human MHC class I.

1.5 cDNA 芯片的预处理

将玻片悬在热的超纯水 (Milli-Q) 上再水化, 置于 100℃ 热铁板上快干 3 s, 用 TL-2000 Translinker 以 125 mJ/cm² 进行紫外交联^[5] (UVP, INC). 将 1×UniHyb 杂交液 (TeleChem 公司) 以 2 μ l/cm² 的用量加在阵列上, 覆以盖玻片, 预杂交 1 h, 0.2% SDS 洗 5 min, H₂O 洗 5 min, 空气干燥后备用.

1.6 组织总 RNA 的提取

使用 Trizol 试剂 (Gibco 公司) 分别提取 20 周胎儿的正常胎心、胎脑及 26 周胎儿的正常胎心、胎脑、胎脾、胎肝的组织总 RNA, 溶于无 RNA 酶的 DEPC 水中, 用电泳证明总 RNA 较完整, 测定 A 值后于 -70℃ 保存.

1.7 荧光标记探针的制备

反转录 cDNA 第一链时掺入荧光素 Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 制备荧光标记探针. 反转录反应为: 总 RNA (10 g/L) 10 μ l, RNasin (40 U/ μ l) 0.5 μ l, 70℃ 10 min, 加 5× 第一链缓冲液 5 μ l, Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP (25 nmol/L, Sigma 公司) 1 μ l, Oligo (dT)₁₅ (0.5 g/L) 4 μ l (大连宝生物公司), 4 μ l 10× 低 dTTP 的 dNTPs (dGTP、dATP、dCTP, 各 25 μ mol/L, 10 μ mol/L dTTP), DTT (0.1 mol/L) 1 μ l 42℃ 孵育 2 min, Superscript II reverse RNase H⁻ reverse transcriptase (200 U/ μ l, GIBCO) 1.5 μ l, 42℃ 孵育 2 h. 反应结束后加 1 mol/L NaOH 5 μ l, 65℃ 孵育 1 h 以消化 RNA. 最后乙醇沉淀荧光标记探针, 并进行紫外分光光度分析以确定合成的 cDNA 的量及掺入的荧

光核苷酸的百分比^[6].

1.8 杂交

将荧光标记探针溶于 8 μ l 1×UniHybTM 杂交液 (TeleChem 公司), 96℃ 4 min 变性, 与预处理的 cDNA 芯片在杂交盒 (TeleChem 公司) 中 65℃ 杂交 16 h. 6 种组织的荧光标记探针分别与 cDNA 芯片进行了杂交, 其中 20 周、26 周的同一种组织的探针分别用 Cy3-dUTP、Cy5-dUTP 标记, 等量混合后与同一阵列同时杂交. 杂交后用 1×SSC-0.2% SDS 洗 5 min, 0.1×SSC-0.2% SDS 洗 5 min, 0.1×SSC 漂洗, 空气中干燥.

1.9 杂交结果的检测及图象分析

使用 ScanArray3000 扫描仪 (GSI Lumonics) 检测杂交结果. 用 ImaGene3.0 软件 (GSI Lumonics) 分析图象, 根据看家基因的表达丰度将杂交结果进行标准化, 获得阵列中基因在两个不同时期同一组织中表达强度的 Ratio 值, 找出差异表达基因.

1.10 RNA 印迹验证芯片杂交结果

为了验证 cDNA 芯片结果的可靠性, 选取表达差异较明显、可能具有重要功能的基因片段 98111220、98111232 用 ³²P-同位素标记作为探针, 分别与 20 周、26 周胎儿的正常胎脑、胎心进行 RNA 印迹实验. 用 Trizol (Life Technologies) 提取胚胎组织总 RNA, 约 50 μ g 的总 RNA 样品在 0.8% 琼脂糖变性甲醛凝胶电泳, 缓冲液为 1×MOPS (20 mmol/L MOPS, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 乙酸钠). 总 RNA 用常规虹吸法转移至 NC 膜 (Hybond, Amersham), 80℃ 真空干烤 2 h,

6× SSC 稍时漂洗, 68℃ 预杂交 1 h, 加入³²P-随机引物标记 (Gibco) 的探针, 68℃ 杂交过夜. 杂交结束后, 杂交膜于 50℃ 恒温漂洗 (洗液为 1× SSC, 0.5% SDS) 约 40 min, -70℃ 压片显影 (Fuji Film), 显影后的 X 片用 ImageScanner (Amersham Pharmacia Biotech) 扫描仪扫描图象, 应用软件为 LabScan (Amersham Pharmacia, version 3.0).

2 结 果

2.1 同源性分析结果

同源性分析表达序列标签 (ESTs) 片段后,

发现 79 个 ESTs 代表新基因, 其中 36 个属于已知 EST, 43 个属于全新基因序列 (同源性比较中, nr 库中 score< 100, Identity< 90%, 且 dbEST 库中 score< 100 且 Identity< 90% 为全新基因序列). 已知 EST 一部分代表重要的已知基因家族, 一部分只知其基因定位而不知其对应的基因及功能. 全新基因由于与已知基因序列不具备较高的同源性, 无明确的功能线索, 只能找到与全新基因同源性最高的基因.

2.2 79 个新基因片段与 6 种组织的杂交图谱

4 种组织的荧光标记探针与阵列的杂交结果见图 1.

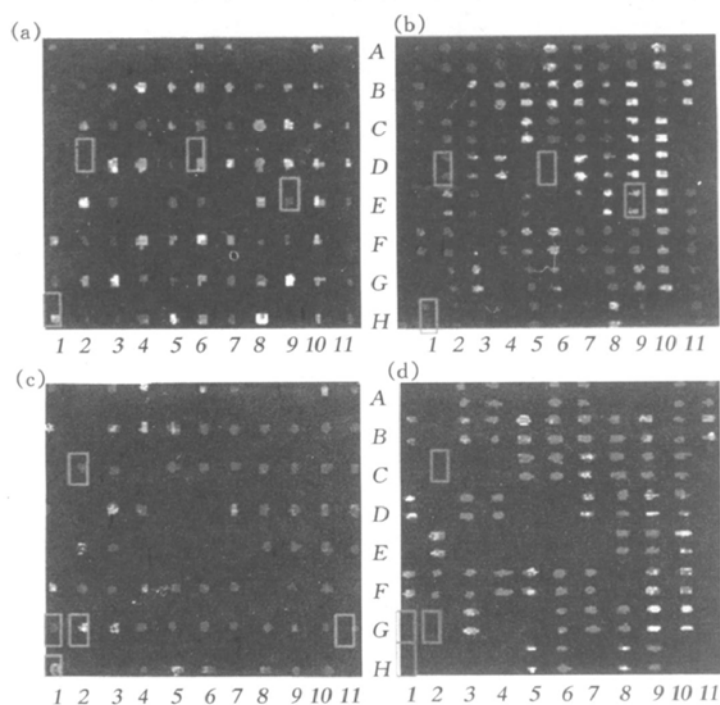


Fig. 1 Expression pattern of 79 novel genes fragments in 4 kinds of human fetal tissues

8 house-keeping genes were arrayed as inner control. gene expression patterns in: (a) 20-week fetal brain; (b) 26-week fetal brain; (c) 20-week fetal heart; (d) 26-week fetal heart.

2.3 筛选表达差异明显的基因片段

79 个新基因片段在不同组织间以及同一组织 20 周与 26 周两个时期基因表达状况基本相似, 只是个别基因表达差异较明显. 比较同一组织在 20 周、26 周胎龄两个时期的基因表达状况, 挑选 8 个表达差异较大、Ratio 值在 0.5~2 范围之外的

基因片段, 胎心中有 4 个、胎脑中有 4 个, 在阵列中的位置显示于图 1, 具体的新基因片段列于表 2.

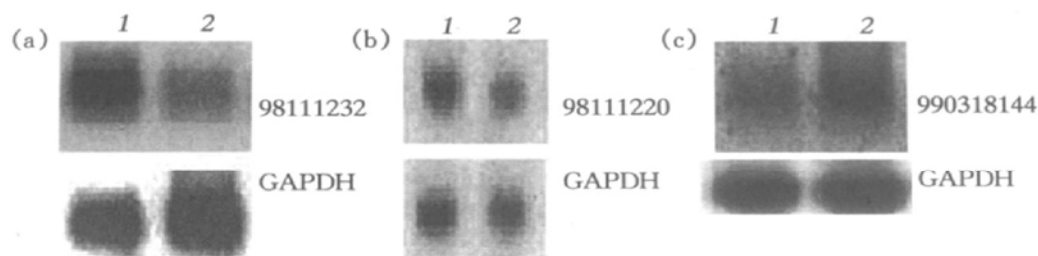
2.4 差异表达基因的 RNA 印迹结果

RNA 印迹结果 (图 2) 与 cDNA 芯片结果吻合, 进一步验证了 cDNA 芯片的结果.

Table 2 Differentially expressed genes and their homologous proteins were listed

Clone	Expression level	Accession No.	Ratio value	BLAST identity ^[7]
981112020	brain 20w(+ + +) 26w(+)	AW461299	2.5	Ubiquitin; - cytochrome C
981112024	brain20w(+ + +) 26w(-)		2.6	Chromosome 16
990318144	brain20w(+) 26w(+ + +)	AW455779	0.4	Oryctolagus cuniculus kidney bumetanide
981112077	brain20w(-) 26w(+ + +)	AW461302	0.3	Chromosome 5q
981112015	brain20w(+ + +) 26w(-)	AW461298	2.7	Chromosome X
981112020	heart20w(+ + +) 26w(-)	AW461299	2.6	Ubiquitin; cytochrome C
981112032	heart20w(+ + +) 26w(-)	AW461301	2.4	Zea mays leucine rich repeat transmembrane protein kinase2(Itk2)
990318003	heart20w(+ + +) 26w(-)	AW461305	2.5	Chimpanzee fetal A- gamma globin gene

Marks: (-) expressed at very low level; (+) expressed at low level; (+ +) expressed medium level; (+ + +) expressed high level.

**Fig. 2 Northern analysis of differential expression**

(a) Fetal heart; (b) Fetal brain; (c) Fetal brain. 1: 20-week; 2: 26-week. Northern analysis of 981112032, 981112020 and 990318144 cDNA clones were expressed differentially in human fetal heart and brain respectively, according with the expression characteristics showed by gene chip hybridization. The proteins encoded by the 3 genes probably are involved in human fetal tissue development.

3 讨 论

cDNA 芯片技术是较新发展起来的技术, 主要应用于寻找新基因、疾病诊断、药物筛选、毒理基因组学等^[7], cDNA 芯片技术可以同时监测大量基因在机体不同健康状况、生理与病理状况下的活性^[8], 杂交结果可以通过有关软件分析进行精确定量. cDNA 芯片使核酸杂交实验在一张玻璃片上完成, 其高效、快捷的特点是传统的研究单基因的技术无法比拟的, 此技术为快速筛选大量致病相关基因、发育相关基因提供了便利工具. 本文利用基因芯片技术检测基因的表达水平, 筛选差异表达的功能基因.

目前, 肾脏及其他几种胎儿组织的分子水平研究引起了人们广泛重视, 其发育与分化异常及其他临床病变常引起高血压、贫血、尿毒症等严重症状^[9, 10], 鉴于目前并无良好的根治肾脏疾病的方法, 研究肾脏发育与分化及发病的分子机制已势在必行, 鉴定出肾脏发育相关基因对治疗肾脏疾病具有实用价值.

本研究通过直接测序从人胚肾文库中筛选到 79 个新基因 ESTs, 并对其进行多组织表达谱分析, 为研究新基因功能奠定了基础, 而进一步研究其功能有待于基因全长的获得及更多时相、更多种类组织表达谱的建立, 目前无法推测它们与肾脏发挥功能是否具有特定关系. 20 周和 26 周胎龄是器官发育的两个代表性时期, 器官组织在 20 周和 26 周胎龄代谢旺盛, 重要的功能蛋白处于表达的上升阶段, 它们之间的差别反映了组织分化发育的基因细微调控^[11]. 本文在各组织中共筛到 8 个差异表达较明显的基因片段, 这些基因在器官发育的过程中差异表达, 可能调节器官向不同方向进行分化. 细胞色素 c 基因在组织中广泛地较保守表达, 前述的 Itk2 也参与了多种细胞的增殖和分化, 苯丙氨酸代谢酶很可能参与了器官的发生和组织分化成熟, 本文筛到的差异表达基因片段与上述两种基因片段具有一定的相似性. 具体这些基因在器官分化发育中扮演什么角色, 是否和系统发生疾病有关系, 还有待进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 David D L B. Option available from start to finish for obtaining expression data by microarray. *Nature Genetics*, 1999, **25** (1): 145~ 146
- 2 Geiss G K, Bumgarner R E, An M C. Large scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology*, 2000, **266** (1): 8~ 16
- 3 Holger M, Peter S, Lukas B, *et al.* High throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 1999, **154** (4): 981~ 986
- 4 Stephen F A, Thomas L M, Alejandro A S, *et al.* BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (17): 3389~ 3402
- 5 Xiang C S, Chen Y D, Yuan J. cDNA microarray and expression in virus infected cells. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44** (5): 449~ 452
- 6 Sgroi D C, Teng S, Robinson G. *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res*, 1999, **59** (22): 5656~ 5661
- 7 Loftus S K, Chen Y, Gooden G. Informatic selection of a neural crest-melanocyte cDNA set for microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (16): 9277~ 9280
- 8 Mark S. Genome analysis with gene expression. *Bioessays*, 1996, **18** (5): 427~ 436
- 9 Lipschutz J H. Molecular development of the kidney, a review of the results of gene disruption structures. *Am J Kidney Dis*, 1998, **31** (3): 383~ 397
- 10 Orellana S A, Avner E D. Cell and molecular biology kidney development. *Semin Nephrol*, 1998, **18** (3): 233~ 243
- 11 Keith L, Moore H. *The Development Human Clinically Oriented Embryology*. 4th. New York: Saunders Company, 1998. 129

The 79 Novel Genes Expression Pattern in Human Fetal Tissues was Monitored by Using cDNA Microarray^{*}

MA Shu-Hua¹⁾, WANG Dun-Cheng²⁾, ZOU Zong-Liang¹⁾, SHEN Bei-Fen²⁾, WANG Sheng-Qi¹⁾**

¹⁾ *Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;*

²⁾ *Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China)*

Abstract 79 EST fragments which represents corresponding novel genes were obtained by sequencing and bioinformatics analysis of human fetal kidney cDNA library. Microarray was prepared by using these novel EST fragments by automatic spotting. Expression patterns of 79 ESTs of novel genes from human fetal kidney were analyzed in fetal brain and fetal heart tissues of 20-week-age and 26-week-age fetus by performing of cDNA chip hybridization. This provides clues for studying exact functions of the novel genes. 8 genes were obtained which were expressed differentially in the fetal brain and heart of 20-week- and 26-week-age respectively. Then differentially expressed genes were identified by Northern analysis. The more exact function of the novel genes are under study.

Key words cDNA chip, novel genes, expressed sequence tag (EST), differential expression, Northern analysis

^{*} This work was supported by a grant from National Nature Science Foundation of China for Key Program (39889001).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: October 8, 2000 Accepted: December 12, 2000