

基于荧光微球液相基因表达阵列的建立*

邵雪君^{1, 2)} 陈子兴^{1)**} 缪美华²⁾ 岑建农¹⁾ 沈宏杰¹⁾

(¹⁾ 苏州大学附属第一人民医院, 江苏省血液研究所, 苏州 215006; ²⁾ 苏州大学附属儿童医院检验科, 苏州 215003)

摘要 建立基于荧光微球的液相基因表达阵列, 用于特定基因组合的表达谱分析。采用带有不同强度荧光鉴别信号的羧基化微球, 与氨基修饰的不同标签寡核苷酸序列化学偶联, 制成微球阵列。多重连接依赖的探针扩增技术(MLPA)用于扩增靶基因核苷酸序列, 即通过 RNA 标本六随机引物逆转成 cDNA, 与不同基因特异性的一对探针杂交, 耐高温的连接酶联接, 最后采用生物素标记的同一对引物扩增。PCR 产物与微球阵列液相杂交, 加入链亲和素标记的 PE 染料, 上流式细胞仪检测。应用这一系统检测骨髓增生异常综合征中难治性贫血(RA)、难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB)、难治性贫血伴转化中原始细胞增多(RAEBt)、急性髓细胞性白血病(AML)和其他组(包括再生障碍性贫血、血小板减少、巨幼贫、溶贫等)差异表达谱, 差异表达结果用实时荧光定量 PCR 验证。共建立了 5 个基因的微球阵列, 分别为 Rap1GAP、RAC2、SPA1、RhoBTB3 和内参 GAPDH, 每个基因检测的线性范围为 0.002 5~0.1 μmol , 液相表达阵列具有良好的特异性和重复性($P < 0.001$)。检测 RA、RAEB、RAEBt、AML 和其他组差异表达发现, RAC2、RhoBTB3、SPA-1 和 Rap1GAP 各组间有显著性差异性存在(分别为 $P < 0.0001$, $P = 0.0491$, $P = 0.0206$ 和 $P = 0.0046$), 其差异显著性与实时荧光定量 PCR 一致, 泊松相关系数分别为 0.930, 0.946, 0.945 和 0.921, 具显著性($P < 0.001$)。结果表明, 成功建立了基于荧光微球的液相基因表达阵列, 其敏感性高、特异性强、重复性好。

关键词 基因表达谱, 微球, 连接, 流式细胞, 杂交

学科分类号 R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00582

基因表达的改变在许多病理生理过程中发挥着重要作用, 基因表达谱能通过大规模的基因芯片一次获得, 也可以采用实时荧光定量 RT-PCR (RQ-PCR) 逐个分析, 如果我们想同时分析在某条调节通路中几个基因的表达, 或在某种疾病中几个有重要意义的基因表达谱, 目前的方法比较有限, 因此, 建立一个简便实用, 灵敏特异的基因表达阵列是非常有实用价值的。

最近报道的多重连接依赖的探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术是一个简单但功能强大的以 PCR 为基础的实验, 可允许多个 SNP 位点的鉴别, 基因分型及多重耐药突变分析^[1], 可在神经胶质瘤中鉴别不同的遗传标志^[2]等。重要的是, 实验证明它在分析基因表达谱时是有效的^[3-4], 因此, 我们希望基于 MLPA 建立一种新的基因表达谱检测技术。

MLPA 探针包括二条寡核苷酸链, 分别退火到

靶序列的邻近位置, 然后由耐热连接酶联接。每一个联接产物长度不一, 然后通过毛细管电泳分离。MLPA 允许只用一对引物同时扩增 45 种不同的序列, 但它必须要用插入序列去调节相应 PCR 产物的不同长度^[5], 这个过程相当复杂及耗时。因此, 这里我们报道一种改良的 MLPA 方法, 基于荧光微球的流式细胞检测的表达阵列 (bead-based flow-cytometric array, MLPA-BFA), 其具有较宽的线性范围。靶基因分别为 RAC2、RhoBTB3、SPA-1、Rap1GAP 和 GAPDH, 整个操作过程仅需一台基因扩增仪及一台流式细胞仪即可对扩增子相对定量。

* 国家自然科学基金资助项目(30470733)。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-67780871, E-mail: szchenzx@263.net

收稿日期: 2010-11-11, 接受日期: 2011-01-17

1 材料及方法

1.1 样本

经病人及伦理委员会同意,采集临床 111 例骨髓增生异常综合症,急性髓细胞白血病及其他血液病患者的骨髓标本,EDTA 抗凝,分成难治性贫血 RA(22)、难治性贫血伴原始细胞增多 RAEB(22)、难治性贫血伴转化中原始细胞增多 RAEBt(9)、急性骨髓细胞性白血病 AML(33)和其他组(包括再生障碍性贫血、血小板减少、巨幼贫、溶贫等)(22)共 5 组, Ficoll 密度梯度离心分离单个核细胞。

1.2 RNA 抽提及 cDNA 合成

采用 Trizol(Invitrogen 公司)裂解单个核细胞 (1.0×10^6), 根据操作说明分离纯化总 RNA. 为避免 DNA 干扰, 用 DNase 处理 RNA 样本. RNA 的浓度用 SmartSpec™ PLUS(BIO-RAD)测定, 200 ng 总 RNA 用于逆转成 cDNA, 50 μ l 反应体系包含: 10 μ l 5 $\times$ 缓冲液, 1 μ l 10 mmol/L dNTPs 混

合物, 2 μ l 10 μ mol/L 六随机引物, RNA 酶抑制剂(RNAaseOUT) 40 U 及 MMLV 逆转录酶 400 U (Invitrogen 公司). 样本 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 37 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.3 MLPA-BFA 探针及寡核苷酸设计

靶基因序列信息来源于公共数据库, 探针的设计采用 H-MAPD 在线软件及 Oligo 6 引物软件^[6]. 每一对 MLPA 探针包含左侧杂交序列(LPO)及右侧杂交序列(RPO). 用于后续 PCR 的正向引物位于 LPO 的 5'端, 反向引物位于 RPO 的 3'端, 与微球上的标签序列互补的寡核苷酸位于 RPO, 所有的探针序列均用于检测 cDNA, 序列信息见表 1. LPO 和 RPO 在靶 cDNA 序列的相邻位置退火杂交并由热稳定的连接酶联接. 连接位点尽可能跨越不同的外显子, 同时要顾及 mRNA 和 EST 数据库中的剪切变异体, 尽可能选用在编码序列内的剪接点.

Table 1 The oligonucleotides used for MLPA-BFA

Oligonucleotide	Sequence(5'~3')
GAPDH-LPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCA
GAPDH-RPO ¹⁾	TCAGCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTctttaatctcaatcaatacaaatcTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
GAPDH-TAG ²⁾	GATTGTATTGATTGAGATTAAAG
GAPDH-CONTROL ³⁾	ctttaatctcaatcaatacaaatc
RAC2-LPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGTGTGAGCTGCACTTACCTGTGAGAGTCTTCAA
RAC2-RPO ¹⁾	ACTTTTAAACCTTGCCAGTCAGGACTTTTGCctttatcaatacactacaatcaTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
RAC2-TAG ²⁾	TGATTGTAGTATGTATTGATAAAG
RAC2-CONTROL ³⁾	ctttatcaatacactacaatca
Rap1GAP-LPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAAATCACCAGCATCCCCGAGACAGAGCCAC
Rap1GAP-RPO ¹⁾	TGCAGTCGCCCACAACCAAGGTGAAGCTCtacactttatcaaatcttacaateTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
Rap1GAP-TAG ²⁾	GATTGTAAGATTTGATAAAGTGTA
Rap1GAP-CONTROL ³⁾	tacactttatcaaatcttacaate
SPA1-LPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGaactccatcagcaggatcatgtcggagcg
SPA1-RPO ¹⁾	GGCAGTGGGACCCTGGAGGACGAGTGTGtaccattaccaataatcttcaaatcTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
SPA1-TAG ²⁾	GATTGTAAGATTATTGGTAATGTA
SPA1-CONTROL ³⁾	tacattaccaataatcttcaaatc
RhoBTB3-LPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCCATGTGTCTCCTGATCTGTGCCGAGATGT
RhoBTB3-RPO ¹⁾	ACCAAGTGTCCAGACTGCAGCACATCTGTGAcaattcaaatcacaataatcaateTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
RhoBTB3-TAG ²⁾	GATTGATTATTGTGATTGAATTG
RhoBTB3-CONTROL ³⁾	caattcaaatcacaataatcaate
Forward primer for PCR ³⁾	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA
Reverse primer for PCR	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA

¹⁾ Represent 5' phosphorylation; ²⁾ Represent 5' aminolinker C12; ³⁾ Represent 5' biotin.

1.4 氨基修饰寡核苷酸包被羧基化微球

适用于 RAC2、RhoBTB3、SPA-1、Rap1GAP 和 GAPDH 的寡核苷酸标签 5'端标有氨基修饰的 12 碳连接子^[7](表 1), 可用碳化二亚胺偶联的方式共价连接到羧基化微球上^[8]. 约 3.0×10^6 个微球 (SPHERO TECH, Catalog NO CPAK-5067-5B, USA) 加于 200 μl 0.1 mol/L 的 MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, Sigma 公司, USA) 缓冲液中, 12 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 微球复悬于 62 μl 0.1 mol/L 的 MES 中, 然后加入含 300 pmol 寡核苷酸标签序列的 25 μl 0.1 mol/L MES, 含 30 μg EDC (N-(3-dimethylaminodipropyl)-N0-ethylcarbodiimide, Sigma 公司, USA) 新鲜配制的 25 μl 0.1 mol/L MES, pH 4.5. 混合物在旋涡振荡仪上 37℃ 暗处孵育 30 min (130 r/min). 重复上述 EDC 处理及孵育步骤 2 次, 最后一次的孵育时间延长至 80 min, 然后用 1 ml 的 0.1% SDS (Sigma 公司, USA)、1 ml 0.02% Tween 20 (Sigma 公司, USA) 和 1 ml TE 缓冲液 (0.01 mol/L Tris-EDTA, pH 8.0) 各洗涤 1 次, 最后悬浮于 200 μl 的 TE 缓冲液 (0.01 mol/L Tris-EDTA, pH 8.0) 中. 5 种不同的微球以相同体积混合, 混合物储存于 4℃ 暗处备用.

1.5 MLPA 反应

MLPA 反应根据荷兰 MRC 公司的说明操作^[3], 只作略微改动. 6 μl cDNAs, 1.5 μl 探针混合物 (各为 5 nmol/L), 1.5 μl MLPA 缓冲液 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) 混合后于 95℃ 5 min, 然后在 PCR 仪上 60℃ 放置 16 h 或过夜. 退火的寡核苷酸加入 3 μl ligase-65 buffer A, 3 μl ligase-65 buffer B, 25 μl 重蒸水, 1 μl ligase-65 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), 于 54℃ 联接反应 15 min. 连接酶通过 98℃ 加热 5 min 灭活, 产物即可用于后续 PCR 反应. PCR 反应体系为: 10 μl 联接产物, 5 μl 10×PCR 缓冲液, 6 μl 25 mmol/L MgCl_2 , 1 μl 10 mmol/L dNTP 混合物, 2.5U Taq 酶, 1 μl 混合引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 26.5 μl 重蒸水, PCR 进行 30 个循环 (95℃ 20 s; 60℃ 30 s 及 72℃ 30 s), 最后 72℃ 延伸 5 min.

1.6 核酸外切酶 I 介导的单链 PCR

上述 MPLA PCR 产物用核酸外切酶 I (Exonuclease I) 处理除去所有引物, 然后加入单链引物重启 PCR (只加生物素化的引物, 引导合成与微球上标签序列互补的 PCR 链). 操作如下: 16 μl 重蒸水, 2 μl 10× PCR 缓冲液, 2 μl 20 U/ μl

Exonuclease I 混合, 加 1 μl 混合物至 20 μl PCR 产物中, 37℃ 孵育 30 min, 80℃ 孵育 20 min. 21 μl 产物中加入 4 μl 单链 PCR 引物混合物, 2.35 μl 重蒸水, 1 μl 生物素化上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μl 10×PCR 混合物, 0.25 μl Taq 酶 (5U/ μl), 在 PCR 仪上 (PE9600) 行单链 PCR, 程序如下: 95℃ 5 min, PCR 12 个循环 (95℃ 30 s; 60℃ 40 s 及 72℃ 40 s), 最后 72℃ 延伸 10 min.

1.7 微球与 PCR 产物杂交

作杂交反应时, 5 μl 的微球混合物, 25 μl 的 2×TMAC 缓冲液 (3 mol/L 氯化四甲铵, 75 mmol/L Tris, 6 mmol/L EDTA 和 0.15% 月桂酰肌氨酸钠 (sarkosyl), pH 8.0) (Sigma 公司, USA), 10 μl 重蒸水加入 10 μl 单链 PCR 扩增产物, PCR 仪上 94℃ 5 min 变性 DNA 及探针, 然后 52℃ 杂交 30 min.

1.8 杂交产物的检测

上述杂交的微球 12 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 以 PBS 洗涤 1 次, 然后悬浮于 50 μl PBS 中, 加入 5 μl Streptavidin PE (20 g/ml) (BD Biosciences 公司, USA), 室温暗处放置 15 min, 加入 200 μl PBS, 上流式细胞仪检测 (BD FACS, USA). 每样本检测 5 000 个微球, 重复 1 次, 阳性及阴性质控同样操作. 试验所用的微球 (Spherotech) 采用 488 nm 或 635 nm 激发光时, 在 PE-Cy5 通道中显现荧光, 而在 PE 通道中基本无荧光, 因此能用 PE 标记物来检测. 每一种微球采用 2 个激发光来检测: 635 nm 的激发光用来区分各种微球, 532 nm 的激发光用来测定连接到杂交 PCR 产物上的 PE 荧光报告基团 (图 1). 每种微球的平均荧光强度 (MFI) 由仪器自动生成. 阳性信号定义为 MFI 高于背景荧光强度 (BFI) 的 2 倍, 而 BFI 由 5 次各种微球和水杂交所产生的 MFI 均值所获得. 每个样本做 3 个复管, 检测 5 种微球的 MFI, 取均值, RAC2、RhoBTB3、SPA-1 和 Rap1GAP 对 GAPDH 的相对表达由两者的比值获得.

1.9 测定 MLPA-BFA 的线性、灵敏度、特异性和重复性

为检测实验的灵敏度, 对已知浓度的质控寡核苷酸 (与微球标签序列互补, 表 1) 倍比稀释, 包括 RAC2、RhoBTB3、SPA-1、Rap1GAP 和 GAPDH, 分别为 0.001、0.001 25、0.002 5、0.005、0.01、0.0125、0.025、0.05、0.1 和 1 μmol , DNA 浓度由 SmartSpecTMPLUS (BIO-RAD) 测定. 特异性通过在某一微球中加入其他非互补的 4 种质控寡核苷酸

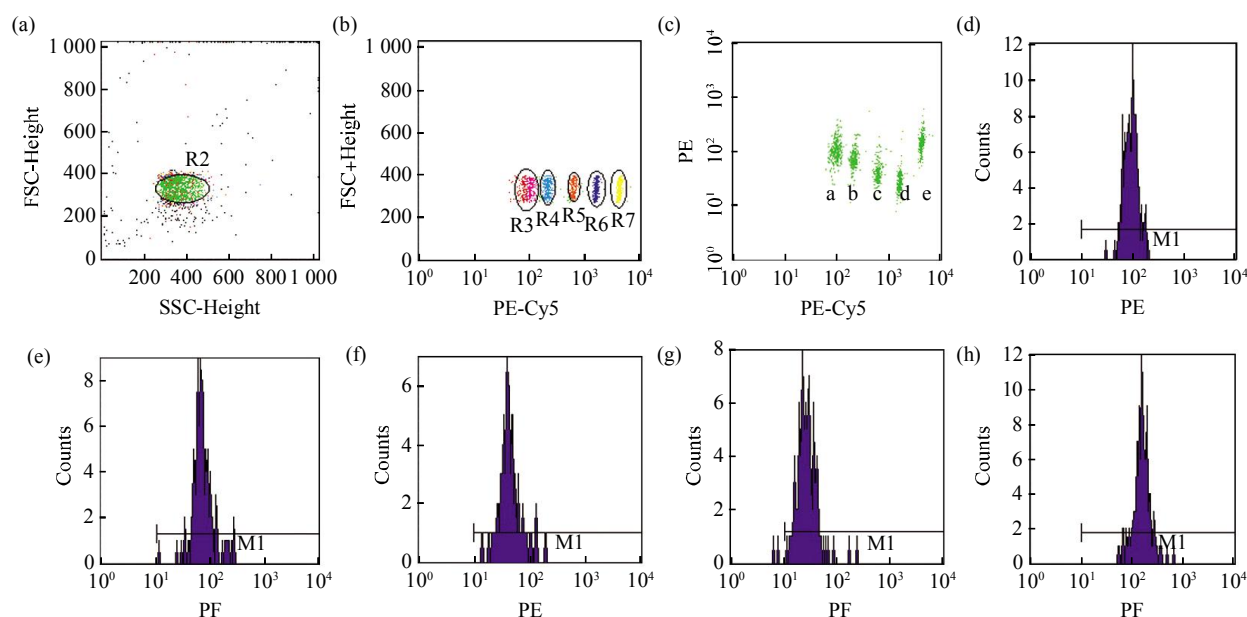


Fig. 1 The liquid beads array pattern of the expression profiles of RhoBTB3, SPA1, RAC2, Rap1GAP and GAPDH using flow cytometer

(a) The blue fluorescent beads were confirmed first by FSC and SSC about 5.1 μm by R2 gate. (b) The beads consists different intensities of PE-Cy5 which labeled different oligo tag corresponding to different gene were differentiated in PE-Cy5 and FSC channel. From R3 to R7 gate, the labeled gene was RhoBTB3, SPA1, RAC2, Rap1GAP and GAPDH separately. (c) The positive hybridizing signals of PE were observed in PE-Cy5 and PE channel. From (a) to (e), the signals represented the RhoBTB3, SPA1, RAC2, Rap1GAP and GAPDH separately. (d)~(e) The frequency paragraph of PE signal of RhoBTB3, SPA1, RAC2, Rap1GAP and GAPDH accordingly, MFI could be got by them.

进行。重复性试验分别由 3 个浓度的单一样本 (200 ng, 20 ng 和 2 ng 的总 RNA) 和单一浓度 (200 ng) 的 5 个样本按上述方法检测来完成。

1.10 实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)

引物及 Taqman 探针由 Primer Express 3.0 和 Beacon Designer 7.0 软件设计, 详见表 2。RQ-PCR 在 BIO-RAD iCycler (BIO-RAD, USA) PCR 仪上完成, 反应体系为: 2.5 μl cDNA, 13.5 μl 重蒸水,

1 μl dNTP 混合物 (10 mmol/L), 2.5 μl 10 $\times$ PCR 缓冲液, 4 μl MgCl_2 (25 mmol/L), 0.5 μl 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μl 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.25 μl Taqman 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μl Taq 酶 (5U/ μl , Promega 公司, USA)。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 随后 40 个 PCR 循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 变性阶段收集荧光, 灭菌重蒸水作无模板质控, 各基因的相对表达通过 $\Delta\Delta C_t$ 方式计算。

Table 2 The primers and Taqman probes for RQ-PCR

	Forward(5'~3')	Reverse(5'~3')	Probe(5' FAM~3' TAMRA)
RhoBTB3	AGTATCAGGCCAGTG CGTTTG	TCGAGAAGTGTACCAATCACTGTC	AGCTGGTGGTCCACGACTGTCCCG
SPA1	GCAGCTCTCTGTCGGATGAG	TGTCTCACTGTCAGCACTGG	CCCAGTCTGCCCCAACACCACC
RAC2	GAAGCATCTACCCGTTCACTCC	CAAGTTGTGGCAGCAACCATC	CCACCCACGCCTGACTCCCCTC
Rap1GAP	CAAGGTGGGAGAGAGAGTTTGAG	CCCCACATATCACATCCTCTTG	CCAGGGGCTAAGCTCTCCACACGG
GAPDH	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTAT	GGCCATCCACAGTCTTCTGG	CAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCC

1.11 数据分析

RAC2、RhoBTB3、SPA-1 和 Rap1GAP 相对 GAPDH 的表达差异通过 wilcoxon 非参统计及 SNK 法计算, 线性由线性回归分析, 重复性通过双变量相关及散点图等评价。

2 结 果

2.1 MLPA-BFA 的敏感性及线性

MLPA-BFA 倍比稀释实验在 0.001 25 到 1 μmol

范围内均可得到阳性荧光信号, 可当采用 1 μmol 浓度时, 除测定微球外的其他微球的 BFI 在一定程度上均会升高, 5 个微球所对应的靶基因线性范围为 0.002 5~0.1 μmol (Pearson's r , $P < 0.001$). 以 RAC2 为代表的结果见图 2a, 可见 MLPA-BFA 具有相当好的灵敏度, 线性范围宽。

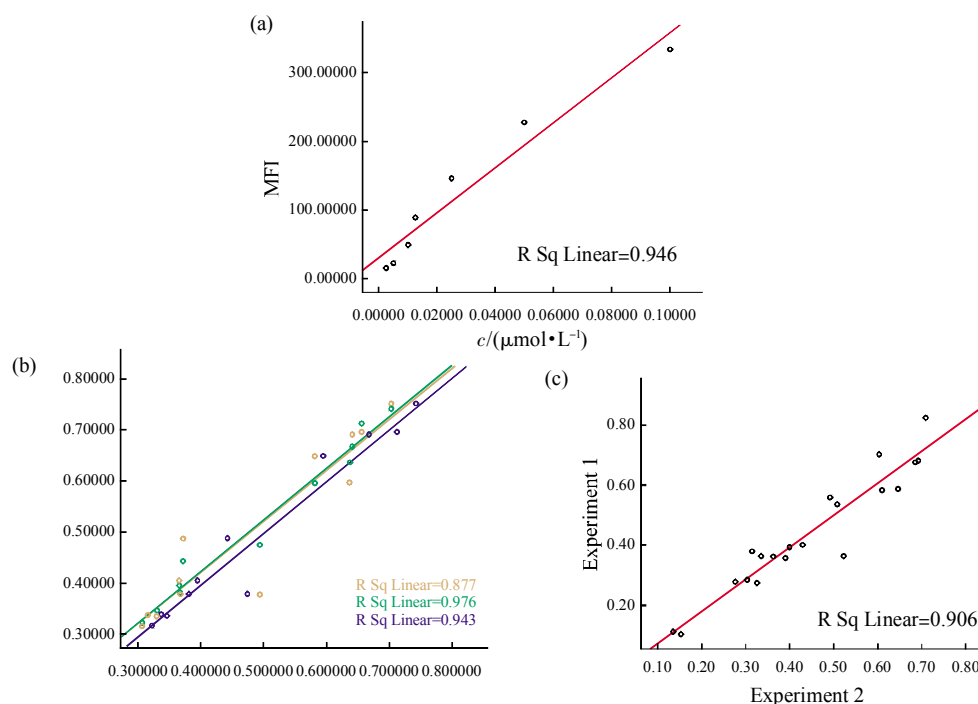


Fig. 2 The linearity assay and the reproducibility assay of MLPA-BFA

(a) The linearity correlation existed between the concentration of oligonucleotide complemented with the tag of RAC2 and MFI, $r=0.9973$, the linearity range was from 0.002 5 $\mu\text{mol/L}$ to 0.1 $\mu\text{mol/L}$, the correlation was analyzed by ANOVA, $F = 88.341$, $P < 0.001$. (b) Series dilution of origin RNA (200, 20, 2 ng) were used to detect the expression of RhoBTB3, SPA1, RAC2 and Rap1GAP relative to GAPDH, there had good correlation among the three different concentration specimens, and no difference were found between each ($P < 0.001$). $\circ$: Undiluted, 1:10 diluted; $\circ$: 1:10 diluted, 1:100 diluted; $\circ$: Undiluted, 1:100 diluted. —: Fit line for undiluted, 1:10 diluted; —: Fit line for 1:10 diluted, 1:100 diluted; —: Fit line for undiluted, 1:100 diluted. (c) An interassay was performed with 5 different samples, and the two assay also had good correlation and no difference ($P < 0.001$).

2.2 MLPA-BFA 的特异性和重复性

MLPA-BFA 证实在不同的微球中未发现交叉杂交信号, 采用线性范围内最高浓度 0.1 μmol 时, 每种微球的阳性信号显著高于 BFI, 而同时其他微球荧光信号为阴性。通过不同起始 RNA 浓度及单样本的重复性试验证实, MLPA-BFA 具有较佳的重复性 ($P < 0.001$, 图 2b, c)。

2.3 MLPA-BFA 检测靶基因表达谱

采用 MLPA-BFA 检测靶基因的表达谱, 发现

RAC2、RhoBTB3、SPA-1 和 Rap1GAP 对 GAPDH 的相对表达在 5 个检测组中均存在显著性差异 (分别为 $P < 0.0001$, $P = 0.0491$, $P = 0.0206$ 及 $P = 0.0046$, 图 3)。

2.4 MLPA-BFA 与 RQ-PCR 的一致性

上述结果通过 RQ-PCR 来验证, 2 个实验方法所获结果显著相关, RAC2、RhoBTB3、SPA-1 和 Rap1GAP 泊松相关系数分别为 0.930、0.946、0.945 及 0.921 ($P < 0.001$, 图 4)。

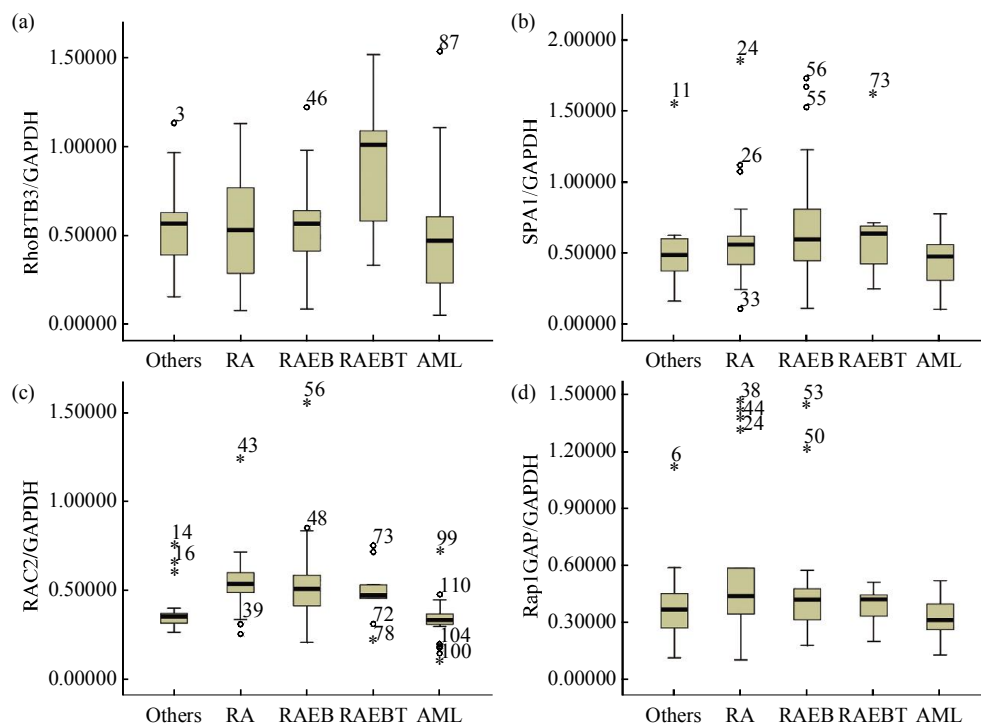


Fig. 3 The expression pattern of RhoBTB3, SPA1, RAC2 and Rap1GAP relative to GAPDH detected by MLPA-BFA in different testing groups

From (a) to (d), there had a significant difference among five groups in total of the relative expression of RhoBTB3, SPA1, RAC2 and Rap1GAP to GAPDH ($P = 0.0491$, $P = 0.0206$, $P < 0.0001$ and $P = 0.0046$).

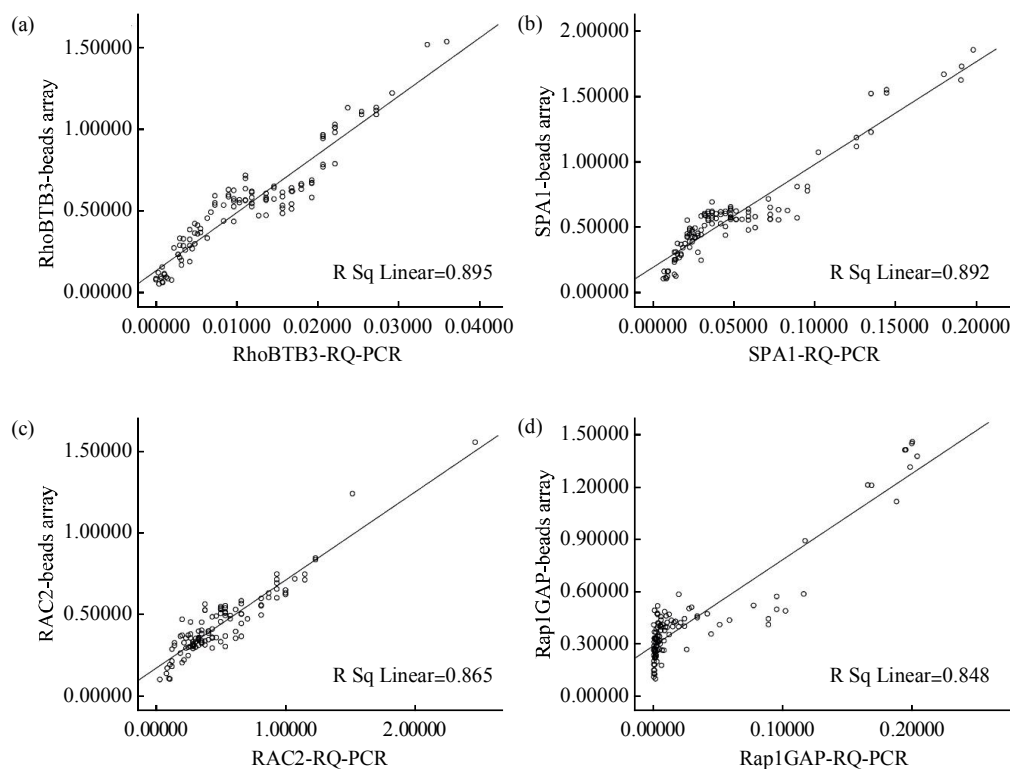


Fig. 4 The scatter plots were analyzed between the results of MLPA-BFA and RQ-PCR

From (a) to (d), the panel was corresponding to RhoBTB3, SPA1, RAC2 and Rap1GAP respectively, and the correlation coefficient was 0.946, 0.945, 0.930 and 0.921 respectively. The RQ-PCR results were coincident with MLPA-BFA perfectly.

3 讨 论

自从 ONE LAMBDA 和 LIFE CODES 在 2000 年开创了荧光微球编码的流式细胞测定技术以来^[9-10], 这一技术在分子诊断, 组织相容性抗原的基因配型等方面已得到广泛应用. 这是一种全新的结合流式细胞术和微球标记技术的方法, 它把荧光微球、激光工程、流控技术及高速数字处理器等整合为一体. SpheroTEC 等公司研制的蓝色荧光微球系列含有不同的 PE-Cy5 荧光强度, 不同的标签序列可对应于不同荧光强度的微球, 因此, 在同一个反应管中可同时进行许多不同的生物反应, 据 Luminex 报道, 最多可同时做 100 个不同反应. 这种通过不同的微球来区分不同的靶基因, 通过报告分子来获得定量结果的方法具有准确、敏感、特异、高重复性及省时的优点.

令人遗憾的是, 至今这一技术还未应用于基因表达谱的研究, 主要是因为靶基因必须要采用体外扩增放大, 且不能改变原 mRNA 的表达谱. 因此, 首先要建立一个不改变原始基因表达谱的靶基因扩增技术, 而 MLPA 技术可满足此要求, 据报道它可检测在凋亡及炎症信号通路中相关基因的表达谱^[3].

MLPA 的特异性通过起始的联接步骤来保证, 而敏感性由后续的 PCR 扩增来获得, 在同一个反应管中可同时检测许多不同的靶基因. MLPA 为避免在探针、微球上的序列标签、模板序列间的交叉杂交, 所有的探针及序列标签均要通过仔细的设计^[11-12]. 我们采用了一个基于 Web 的工具软件, H-MAPD, 它能自动产生和选择适用于基因组 DNA 的 MLPA 探针^[6], 但它不太适合 mRNA, 因此, 所得结果必须用 Oligo 6 软件重新评估选择, 如有可能, 尽量跨越二个外显子. 通常, MLPA 产物可通过毛细管电泳鉴别, 但这一设备可能不为每个实验室所配备, 重要的是, 对高表达的靶基因, 它必须引入一个竞争探针来调节其表达水平至线性范围内, 而这个过程相当复杂且耗时. 这里我们采用了一种新的 MLPA 检测模式, MLPA-BFA, 可在 0.002 5 $\mu\text{mol/L}$ 到 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的线性范围内定量基因表达, 所有 PCR 产物均在其线性范围内, 不需要引入竞争探针, 且重复性好、特异性佳. 另外, 引入核酸外切酶 I 介导的单链 PCR, 进一步

增加了其敏感性, 并缩短了 PCR 产物与微球的杂交时间^[13].

实验室常规测定基因表达的方法有基因芯片、Northern 杂交和 RQ-PCR 等. RQ-PCR 敏感性高、可检测单拷贝基因, 在有标准品的条件下, 可对基因表达绝对定量, 但往往也需加入内参基因调整初始 RNA 量, 另外, 由于同时检测几个基因的表达在实验设计上存在较大难度, 目前 RQ-PCR 绝大多数只能一次检测一个基因的表达, 若要检测多个基因, 必须分批操作, 这给最终多个基因表达谱分析时带来了额外的误差, 且增加了成本. 而 MLPA-BFA 一旦制成, 即可用于大样本及多基因的同时检测, 极大地降低了单个样本的成本. MLPA-BFA 与 Northern 杂交技术相比, 具操作相对简便、敏感性高、可同时检测的基因谱宽等特点. 基因芯片技术虽然能一次检测整个基因组表达谱, 但往往有成千上万个基因差异表达, 其范围可能覆盖细胞生物功能的每个方面, 这在实际的功能解释时往往受限, 另外, 设计及制造大规模芯片相当耗时, 如果要再整入一个新的靶基因往往不太现实. 而 MLPA-BFA 技术, 只要设计合理, 新的探针能很快、很容易地加入到原来的探针混合物中. 一旦探针混合物制备好, 仅需较少的实验步骤可用于大量样本的常规检测, 而所需的实验设备为大多数实验室所配备. 在这里我们用建立的 5 个基因微球阵列获得了 5 组血液病病人的 4 个基因的差异表达谱, 经 RQ-PCR 验证, 两者结果高度一致.

总之, 我们成功建立了基于荧光微球、流式细胞仪检测的液相基因表达阵列, 能快速简便地同时进行检测若干个基因组合的表达谱, 据我们所知, 这是首次报道结合 MLPA 及液相微球杂交技术来检测基因表达谱.

参 考 文 献

- [1] Bergval I L, Vijzelaar R N, Dalla Costa E R, *et al.* Development of multiplex assay for rapid characterization of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 689-699
- [2] Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. J Mol Diagn, 2006, 8(4): 433-443
- [3] Eldering E, Spek C A, Aberson H L, *et al.* Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in

- defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (23): e153
- [4] Blenkiron C, Goldstein L D, Thorne N P, *et al*. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*, 2007, **8**(10): R214
- [5] Schouten J P, McElgunn C J, Waaijer R, *et al*. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(12): e57
- [6] Zhi J, Hatchwell E. Human MLPA Probe Design (H-MAPD): a probe design tool for both electrophoresis-based and bead-coupled human multiplex ligation-dependent probe amplification assays. *BMC Genomics*, 2008, **9**(9): 407
- [7] Diaz M R, Fell J W. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. *J Clin Microbiol*, 2004, **42** (8): 3696–3706
- [8] Dunbar S A, Vander Zee C A, Oliver K G, *et al*. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods*, 2003, **53**(2): 245–252
- [9] Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, *et al*. Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2004, **62**(1): 93–98
- [10] Casamitjana N, Faner R, Santamaria A, *et al*. Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method. *Hum Immunol*, 2005, **66**(1): 85–91
- [11] Kaderali L, Deshpande A, Nolan J P, *et al*. Primer-design for multiplexed genotyping. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (6): 1796–1802
- [12] Kaderali L. Primer design for multiplexed genotyping. *Methods Mol Biol*, 2007, **402**(8): 269–286
- [13] Pihan G. Detection of gene fusions in acute leukemia using bead microarrays//J. Paul Robinson. *Current Protocols in Cytometry*. International Society for Advancement of Cytometry, United States, 2006: Unit13. 7

Development of a Bead-based Liquid Array for Analysis of Gene Expression Profiling*

SHAO Xue-Jun^{1,2)}, CHEN Zi-Xing^{1)**}, MIAO Mei-Hua²⁾, CEN Jian-Nong¹⁾, SHEN Hong-Jie¹⁾

¹⁾ 1st Affiliated Hospital, Jiangsu Institute of Hematology, Soochow University, Suzhou 215006, China;

²⁾ Clinical Laboratory, The Children's Hospital, Soochow University, Suzhou 215003, China)

Abstract It is well known that the gene expression profiling can be detected by RT-PCR singly, or which can be detected by cDNA array in large numbers, however, to evaluate the expression of several targeted genes in a special regulation pathway, or some interested genes in a certain disease simultaneously, the methods were limited. So, development of a simple, robust, sensitive, specific and economic assay satisfied the need mentioned above was very useful, and a bead-based flow-cytometric multiplex assay was aimed to establish. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was employed to amplify several targeted cDNAs using only one pair identical primers, each MLPA probe consisted of two short synthetic oligonucleotides, and the tag which was coupled chemically to the fluorescent beads was complementary to one probe. Five beads with different fluorescence intensity coupled to RAC2, RhoBTB3, SPA-1, Rap1GAP and GAPDH were established. Biotinylated PCR amplicons were then hybridized to the complementary tag on each bead set. Bound amplicons were detected by flow cytometry using a streptavidin-linked reporter dye, PE. 111 BM specimens were analyzed in total, include RA(22), RAEB(22), RAEBt(9), AML(33), and control group (22, including hyperplastic anemia, iron deficiency anemia, aplastic anemia *et al*), and the difference of the transcriptional level of RAC2, RhoBTB3, SPA-1 and Rap1GAP relative to GAPDH were analyzed using wilcoxon non-parametric test and SNK method among different groups. The results were confirmed by RQ-PCR. The bead-based flow-cytometric array had an excellent sensitivity and a wide linear range, could get a positive signal for PCR product from 0.002 5 to 0.1 μ mol, the fine specificity was proved by no cross-hybridization signals presented among different bead set, and the reproducibility were also good enough ($P < 0.001$). The expression profiling of RAC2, RhoBTB3, SPA-1, Rap1GAP and GAPDH detected by this liquid bead-based flow-cytometric array were obtained, and there existed significant difference among 5 groups (MDS-RA, -RAEB, -RAEBt, AML, and control group) for the relative expression to GAPDH of RAC2, RhoBTB3, SPA-1 and Rap1GAP ($P < 0.0001$, $P = 0.049$ 1, $P = 0.020$ 6 and $P = 0.004$ 6 respectively). These results were validated by RQ-PCR, and the data obtained by each method had close linear correlation, the Pearson correlation coefficient was 0.930, 0.946, 0.945 and 0.921 for RAC2, RhoBTB3, SPA-1 and Rap1GAP respectively ($P < 0.001$ for all four). A bead-based flow-cytometric multiplex assay for rapid assessment of gene expression profiling has been built successfully, and it was validated by RQ-PCR.

Key words gene expression profiling, beads, ligation, flow cytometer, hybridization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00582

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470733).

**Corresponding author.

Tel: 86-512-67780871, E-mail: szchenzx@263.net

Received: November 11, 2010 Accepted: January 17, 2011