

文章编号: 1004-0374(2009)02-0241-05

· 技术与应用 ·

实时定量 PCR 芯片——功能基因组研究的有用工具

曲佳^{1,2}, 熊鸣², 赵晓航^{2,3*}

(1 军事医学科学院, 北京 100850; 2 海军总医院, 北京 100037; 3 中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要 结合实时定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和基因芯片技术,实时定量PCR芯片(qPCR array)为功能基因组研究提供了一种高度灵敏、可靠的方法。在基因功能分类基础上,结合qPCR准确定量的特性,qPCR array可同时定量分析上百个基因的mRNA表达水平,是研究一组特定功能基因表达的理想方法。

关键词: 实时定量PCR芯片; 信号通路分析; 基因表达

中图分类号: Q503; Q78 **文献标识码:** A

Quantitative PCR array: a useful tool for functional genomic studies

QU Jia^{1,2}, XIONG Ming², ZHAO Xiao-hang^{2,3*}

(1 Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2 Navy General Hospital, Beijing 100037, China; 3 Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Combined with two techniques of real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and gene chips, the qPCR array brings a highly sensitive and reliable method of gene expression profiling. It allows quantitatively monitoring expression levels of panel genes in a specific pathway or disease related genes simultaneously, and is a useful tool for functional genomic studies recently.

Key words: qPCR array; signal transduction analysis; gene expression

由30亿个碱基对、约3万个表达基因组成的人类基因组,蕴藏着人类生老病死的奥秘。1990年正式启动的国际人类基因组计划(human genome project, HGP)被誉为生命科学的“登月”计划,旨在全面解读人类基因组DNA序列,确定人类全部基因及其在染色体上的位置,以揭示人类全部遗传信息。2000年6月26日,由美、英、法、德、日、中六国科学家同时向世界宣布HGP工作草图和2002年2月“精细图”的完成是人类基因组研究的里程碑。此后,HGP的主要内容从大规模测序逐步转入功能基因研究。20世纪90年代建立起来的基因芯片技术是高通量研究基因表达的重要工具。然而,笼统的研究方法和大量的验证工作制约着其在功能基因组研究中的应用。如何根据研究者的需要,有针对性地研究某一组特异基因?怎样避免后续繁重的验证工作?2006年,SuperArray公司率先推出了实时定量PCR芯片(real-time quantitative poly-

merase chain reaction array, qPCR array),借助qPCR的精确定量和基因芯片的高通量检测技术与功能分类的设计理念,可同时对上百个基因的mRNA表达水平进行准确定量分析,为功能基因组研究提供了一种高度灵敏和可靠的分析方法,在功能基因组研究中具有广阔的应用前景。

1 概述

基因组测序是基因功能研究的核心。1975年,Fred Sanger和Walter Gilbert建立的Sanger双脱氧链末端终止法和Maxam-Gilbert化学修饰法,成为第一代测序技术的核心基础。1985年,借助于荧光检测和自动化技术的最新成果,Leroy Hood发明了

收稿日期: 2009-01-07; 修回日期: 2009-02-03

基金项目: 总后医药卫生科研计划(06MB022); 海后司令部科研计划(07-3309); “973”项目(2004CB518707)

*通讯作者: Zhaoxh@cicams.ac.cn

荧光色谱 DNA 测序法, 第一台自动化荧光 DNA 测序仪在 ABI 公司问世, 掀开了 DNA 自动化测序的新篇章。而 HGP 对于数据通量的要求, 使以集成化、自动化为特点的第二代测序技术蓬勃发展, 为大规模的 DNA 测序奠定了基础。从 20 世纪 90 年代毛细管自动测序仪的应用, 全基因组鸟枪法测序战略的实施, 到近年以罗氏公司的 454 测序仪、Illumina 公司的 Solexa 基因组分析仪和 ABI 的 SOLiD 测序仪为代表的通量测序平台的建立, 源源不断地产生日益庞大和复杂的基因组数据相继被载入公共数据库。

20 世纪 90 年代建立的基因芯片或 DNA 微阵列 (DNA microarray) 技术, 是将大量已知序列探针以预先设计的排列方式固定在活化的固相载体表面, 形成密集的分子排列, 然后与标记的样品杂交。通过分析杂交信号强度, 获得基因表达信息, 具有高通量、微型化和自动化的特点, 满足了同时平行研究成千上万个基因的迫切需要^[1]。

随着研究的深入, 基于分子杂交的高通量方法尚不能满足功能基因组研究的需要。由于没有定量信息, 表达谱芯片的结果往往需要大量的后期验证; 另一方面, 广谱的筛选方法缺乏科学假设和针对性, 许多与研究对象无关基因所产生的数据常常提供无用或错误的信息, 干扰结果分析^[2]。因此, 相对于在毫无研究基础的前提下进行漫无目的地广谱筛选, 研究者更需要一种与自己研究相关的、能够对某一特定生物学通路或一组功能相关基因进行针对性分析的定量工具。

1996 年, 由 Heid 等建立的 qPCR 是一种新的核酸绝对定量技术。在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 过程, 是定量检测基因表达最灵敏、最可靠的方法^[3,4]。2002 年, Fakhari 首次将实时定量的概念引入基因芯片分析, 形成了一种新的芯片技术——qPCR 芯片^[5]。

与传统的表达谱芯片相比, qPCR 芯片除具有实时定量特点外, 仅选择与研究对象有关的几百个或更少的已知基因, 按照生物学通路或功能分类点制在芯片中, 同时定量分析上百个基因的 mRNA 表达水平, 大大增强了研究的针对性和结果的准确性, 是研究一组特定基因表达的理想方法。

2 qPCR 芯片

qPCR 芯片整合了功能分类和 qPCR 精确定量的优点, 通过简单的、经过优化的 qPCR 体系, 能同时准确定量检测上百个基因的 mRNA 水平, 避免后续繁琐的验证工作。

2.1 原理 与功能分类基因芯片相同, qPCR 芯片的设计中凝聚了生命科学各个研究领域的最新成果, 能够根据特定的生物学功能、信号通路或者应用范围对基因进行有目的地分类和筛选。然而, 与功能分类基因芯片基于杂交技术的检测方法不同, 借助于 qPCR 的检测技术, qPCR 芯片还具有实时定量的优越性, 实验结果无需后期验证。每张 qPCR 芯片如同上百个 qPCR 微反应池的集成, 每个微反应池都固定有基因特异性引物, 当加入含有模板和荧光基团的 qPCR 反应体系后, 在相同的反应条件下, 不同的基因都能同时进行特异性扩增, 每个微反应池的位置信息就代表了某个特定基因, 利用荧光信号的积累实时监测每个微反应池中 PCR 反应的过程, 最后通过标准曲线就能同时对上百个基因的 mRNA 水平进行准确定量分析。

2.2 qPCR 芯片的设计和质控 与传统的表达谱芯片不同, qPCR 芯片的设计是以科学假设为前提的。每张芯片都是根据特定的生物学功能、信号通路或特定的应用范围设计的。除含有基因特异性引物, 芯片中通常还设置了检测实验质量的对照, 如用于芯片数据标准化的管家基因、检测样品中是否存在 DNA 污染的基因组 DNA 参照 (genomic DNA control, GDC)、监测逆转录反应效率的逆转录参照 (reverse transcription control, RTC) 和检测 PCR 反应效率的阳性 PCR 参照 (positive PCR control, PPC) 等。两组重复的对照 RTC 和 PPC 还可以用于检测芯片间和芯片内的一致性。

通过采用 qPCR 的检测方式, 样本的逆转录、扩增和定量可在同一封闭管中进行, 因此无需复杂的产物后处理, 减少了实验室污染的可能。初始模板以 PCR 反应指数期获得的循环阈 (threshold cycle, Ct) 值来定量, 避免了 PCR 扩增平台效应。Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数, 相当于在 PCR 循环过程中荧光信号由本底开始进入指数增长阶段的拐点所对应得循环次数。研究表明, 在扩增效率一致的前提下, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小。通常用不同浓度的标准样品的 Ct 值来制备标准曲线, 然后计算相对方程式。方程式的斜率代表 PCR 的扩增效率 k ($0 < k < 1$), 最佳的标准曲线是建立在 PCR 的 k 为 $0.9 - 1$ 的基础上。所有标准曲线的线性回归分析需要存在一个较高的相关系数 ($R^2 \geq 0.99$), 这样才能认为实验的过程和数据是可信的。根据标准曲线,

只要获得未知样品的Ct值, 即可计算出该样品的初始模板量。

2.3 qPCR芯片的工作流程 采用qPCR芯片进行实验大约历时2h。首先将RNA样品逆转录为cDNA第一链, 作为PCR模板。接着, 将模板加入到反应体系(如RT² Real-Time™ SYBR Green PCR Master Mix)中。在已经固定好基因特异性引物的微反应池(常用的如96、24孔板)中, 加入等量的PCR反应体系, 进行PCR反应。采用仪器配套的软件计算PCR芯片中的每个基因的Ct值。最后, 采用ΔΔCt方法比较对应的两个样本中同一基因的表达量变化(图1)。

2.4 qPCR芯片的特点 基于qPCR的检测技术, 使qPCR芯片相对于传统的基因芯片而言具有更高的特异性、灵敏度和可重复性。

(1) 特异性: 为了获得高特异性, 需要保证引物只扩增出特定的目的片段。在qPCR芯片的引物设计过程中, 通过计算机分析和实验验证, 筛选出的最佳引物需达到以下要求: 在相应物种全基因组

中的高度特异性, 避免引物二聚体和非特异性产物产生; 所使用的引物的CG含量、解链温度(T_m), 以及其他理化性质都相似, 以保证在相同的PCR条件下, 芯片中的不同基因都能扩增出特异性产物; 引物扩增的片段大小相似, 确保在相同的反应时间内, 不同的基因均能扩增出完整片段。

(2) 灵敏度: 传统的表达谱芯片通常都是基于溶液杂交的检测方式, 因此, 只能分辨各个靶基因的实质性差别, 并且需要较大的样本量[常规的杂交一般需要≥1 μg poly(A)mRNA 或 10⁷个细胞]。而研究显示, 用qPCR芯片每次扩增只需要0.5—1ng的poly(A)mRNA 或 10³个细胞, 并且其动态线性范围至少能达到10⁵, 而扩增效率约为100%。

(3) 可重复性: qPCR的定量特性使qPCR芯片在技术上具备很高的重复性, 误差范围小。在确保RNA样品制备良好, 芯片操作正确的情况下, 所观察到的基因表达水平的差异都是所研究的样本本身的生物学特征所引起的, 而不是由于实验技术所造成的误差。同一实验室重复实验, 实验Ct值相关系数≥0.99。目前, 一些商品化qPCR芯片通过实验体系的优化, 使得不同批次的芯片, 不同时间进行实验, 不同的重复设计, 在原始值水平上都能获得很高的重复性。

3 qPCR芯片的应用

统计PubMed自2002至2007年间应用qPCR芯片开展功能基因组研究的文献, 可以看出随着功能基因组研究的逐步深入, qPCR芯片越来越受到重视, 使用量逐年上升, 成为了功能基因组研究的重要工具(图2)。

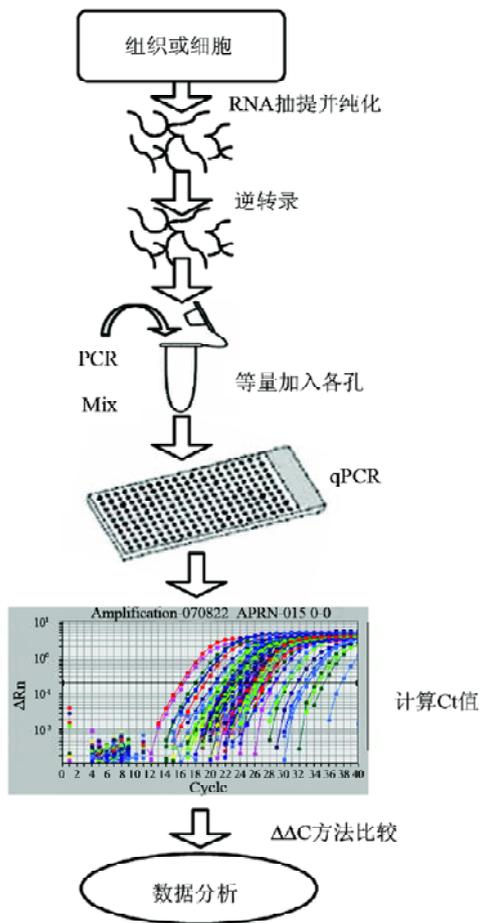


图1 qPCR芯片的工作流程

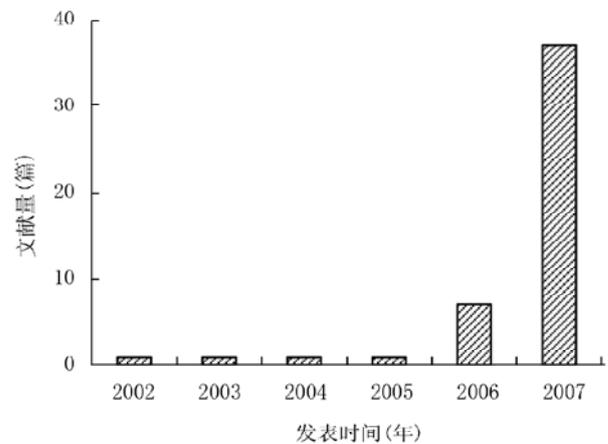


图2 应用qPCR芯片在2002—2007年12月间发表文献统计

3.1 肿瘤耐药性研究 肿瘤细胞的多重耐药性是肿瘤化疗的主要问题, 寻求有效的联合用药成为肿瘤化疗的重要策略。雌激素天然衍生物 2- 甲基雌二醇 (2-methoxyestradiol, 2ME) 能增加具有阿霉素 (doxorubicin, Dox) 耐药性乳腺癌细胞 (MCF-7/Dox) 对 Dox 细胞毒性的敏感性, 两者具有协同治疗作用。最近, Azab 等^[6]通过 qPCR 芯片技术比较分析了 Dox 单独处理和协同 2ME 处理后 MCF-7/Dox 细胞的基因表达差异。在检测的 84 个人类癌症耐药性和代谢基因中, 确定了包括 Bcl2 在内的 4 个显著差异基因, 分别在药物排出系统、凋亡信号转导和细胞周期调节中发挥作用, 揭示了 Dox 联合 2ME 治疗耐药性乳腺癌的作用机理。

3.2 病原微生物检测 病原微生物的卡波希肉瘤 (Kaposi's Sarcoma, KS) 是 AIDS 患者最常见的肿瘤。流行病学资料及活组织病理检查均显示, KSHV 与 KS 密切相关, 该病毒 DNA 存在于 KS 的各种病理组织以及浸润性淋巴细胞以外的所有肿瘤细胞中。KSHV 的基因表达受严格调控, KS 组织中 KSHV 主要以潜伏状态存在, 仅有很少一部分细胞出现病毒的溶解性周期复制, 因此, 识别潜伏感染状态下 KSHV 有利于 KS 的早期诊断。由于基于杂交的表达谱芯片的灵敏度不高, 检测需要大量的样本, 因此不适于来源稀少的 KS 组织样本的检测。为解决这个问题, Fakhari 等^[5]建立了一种具有高灵敏度的 qPCR 芯片技术, 并以此技术在细胞水平上检测了 KSHV 几乎所有 ORF 的表达水平。利用佛波酯激活病毒的溶解性周期复制, 根据 ORF 动力学改变进行分类, 确定了一组 KSHV 感染细胞稳定表达的 I 型潜伏基因, 这些基因能够作为临床 KSHV 检测和 KS 诊断的重要标志^[5]。Dittmer^[7]进一步用该 qPCR 芯片检测了 21 例原发性 KS 组织中 KSHV 全基因组水平的转录谱, 其结果不仅确认了应用 qPCR 芯片检测临床标本的可行性, 而且确定了 I 型潜伏基因、I-B 型潜伏基因、II 型潜伏基因、III 型裂解性基因在整个 KSHV 基因组中的表达谱, 明确了 I 型潜伏基因是 KS 药物治疗的肿瘤特异性靶点。

3.3 细胞和发育生物学研究 Airolidi 等^[8]在关于黑色素瘤细胞内源性 IL12 触发对血管生成作用的研究中, 发现内源性 IL12 能降低表达 IL12 受体的 B16 黑色素瘤细胞的致瘤性, 这些肿瘤表现为细胞增生减少, 凋亡增加, 微血管生成缺陷。为进一步研究作用机制, 利用大鼠血管生成 qPCR 芯片, 分别

检测了表达有内源性 IL-12 的 IL-12 受体基因正常和敲除大鼠形成的肿瘤组织中与血管生成有关的基因表达水平, 结果发现, 相对于 IL-12 受体基因敲除大鼠, IL-12 受体基因正常大鼠中多种不同的促血管生成基因都显著下调, 有极少的抗血管生成基因表达明显下调, 说明内源性 IL-12 能通过抑制血管生成来降低表达 IL-12 受体的 B16 黑色素瘤细胞的致瘤性。

在高渗盐水浸泡对血管内皮细胞功能影响及其机制的研究中, 利用大鼠血管内皮细胞功能实时定量 PCR 芯片, 分别检测正常组和高渗盐水浸泡组大鼠肠系膜血管组织中相关基因的表达水平。结果发现, 高渗盐水浸泡后, 有多种与血管内皮细胞功能相关的基因发生不同程度的表达改变, 其中涉及血管到血管壁的渗透性、血管生成、内皮细胞激活和内皮细胞损伤四个方面。进一步对筛选出的部分差异表达基因进行了 qPCR 验证, 其结果与芯片结果完全相符, 也说明了 qPCR 芯片结果的可信^[9]。

3.4 细胞因子与炎症反应研究 Gude 等^[10]在研究中发现, 核定向 Akt 转基因小鼠的心脏具有超常增生的表型特征, 提示如同 Akt 能促进许多非肌细胞类型细胞的增殖一样, 核定向 Akt 也能促进出生后心肌细胞的增殖, 使其具有与新生心肌细胞相似的生物学特性。初步的研究结果表明, 该作用主要与促进心肌细胞分裂周期和增加心肌细胞谱系祖细胞的分化有关。为了进一步探讨 Akt 的作用机制, 通过小鼠细胞因子 qPCR 芯片, 对 Akt 下游的 84 个细胞因子进行基因表达分析, 结果表明相对于正常出生后小鼠的心肌组织, 新生小鼠的心肌组织中有 43 个细胞因子 mRNA 表达增高 ≥ 2 倍, 而其中有 17 个细胞因子的变化与核定向 Akt 转基因小鼠心肌组织相似。同时, 有两个基因 (Tnfsf8、IL-17e) 在新生小鼠的心肌组织和核定向 Akt 转基因小鼠心肌组织中的表达显著性增加, 而这两个基因都具有促进细胞增殖的功能。该结果说明, 核定向 Akt 能够影响心肌组织细胞因子表达的转录程序重排, 使其具有与新生心肌组织相似的基因表达特性, 从而呈现出与新生心肌组织相似的增生能力。

Rangel-Moreno 等^[11]在诱导性支气管相关淋巴样组织 (inducible bronchus-associated lymphoid tissue, iBALT) 存在肺部并发症的类风湿性关节炎 (RA) 作用的研究中, 发现存在肺部并发症的 RA 患者中有不同生长程度的 iBALT。为了进一步了解, 是哪些趋

化因子和细胞因子在 iBALT 呈进行性生长的组织中表达,他们利用了人炎症细胞因子与受体和人血管生成 qPCR 芯片,发现淋巴结形成相关趋化因子(如 CXCL13 和 CCL21)以及 RA 免疫病理学涉及的分子(如肿瘤坏死因子家族的 B 细胞激活因子 BAFF、ICOS 配体和淋巴细胞毒素)表达升高与 iBALT 生长程度呈正相关,说明 iBALT 的形成与 RA 患者的肺部组织损伤有关,提示 iBALT 参与了 RA 的局部病理过程。

3.5 其他 qPCR 芯片还可以用于研究特定生物学通路。Hansel 等^[12]为了研究引起变态反应的 CD4⁺T 细胞活化时的基因表达改变,先采用了寡核苷酸基因芯片进行 CD4⁺T 细胞的基因表达谱分析,结果发现表达谱结果不均一,即不能明确表示变态反应下 CD4⁺T 细胞的差异表达基因。他们进一步采用了人 Th1-Th2-Th3 相关目的通路 qPCR 基因芯片,分析结果稳定,基因表达谱特征性强,能定量确定出 Th2 样信号表达增强。

此外,在生物医学工程中将 qPCR 芯片用于基因表达的分析。Gelain 等^[13]设计了一个用于成年大鼠神经干细胞三维培养的多肽纳米纤维支架系统,为进一步改进,附加了几个具有细胞黏附、细胞分化和骨髓归巢的功能型模序到一个自组装多肽 RADA16,然后将这些功能性多肽自组装到一个类似于基质胶的纳米纤维结构上,形成了功能性的 3D 培养环境。为了验证这种自组装的多肽纳米纤维支架是否能具有以上功能,他们用 qPCR 芯片技术分别检测了在 3D 系统中培养和基质胶中培养的大鼠神经干细胞中相关基因的表达水平,结果显示相对于基质胶中培养的细胞,这种改进后的 3D 培养系统中培养的大鼠神经干细胞中,黏附和分化相关的基因存在不同程度的选择性表达,从而提示所涉及的 3D 培养系统能实现模拟人体环境中的细胞迁移和扩散。

4 展望

借助于 qPCR 的检测技术和基因功能分类的设计理念,qPCR array 为功能基因组研究提供了一种高效和可靠的方法。通过简单的、经过优化的 qPCR 体系,能够一次性准确检测上百个基因的 mRNA 水平,实现了基因表达水平的定量检测,避免后续大量的验证工作,是集中研究一组特异性基因表达水平的理想方法;但是,作为一种新的技

术,如何提高芯片的集成化和自动化程度,增加检测的灵敏度,降低检测成本将是未来 qPCR 芯片发展过程中有待解决的问题。虽然目前一些高通量测序技术(如 Solexa)在转录组研究上取得了重大进展,能够对测得的每条序列进行计数获得每个特定转录本的表达量,但是昂贵的科研花费表明大规模基因测序大多只能局限于专业测序中心完成,供大型、昂贵的研究项目之用。随着研究的不断深入和技术的更加完善,相信 qPCR 芯片一定会在生命科学研究领域得到越来越广泛的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Sevenet N, Cussenot O. DNA microarrays in clinical practice: past, present, and future. *Clin Exp Med*, 2003, 3(1): 1-3
- [2] Smith L, Greenfield A. DNA microarrays and development. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(1): R1-8
- [3] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-94
- [4] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 995-1001
- [5] Fakhari FD, Dittmer DP. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR. *J Virol*, 2002, 76(12): 6213-23
- [6] Azab SS, Salama SA, Abdel-Naim AB, et al. 2-Methoxyestradiol and multidrug resistance: can 2-methoxyestradiol chemosensitize resistant breast cancer cells? *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 113(1): 9-19
- [7] Dittmer DP. Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2010-5
- [8] Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, et al. Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(10): 3996-4001
- [9] 张达矜, 曲佳, 熊鸣, 等. 海水浸泡对血管内皮功能基因的影响. *解放军医学杂志*, 2009, 34(1): 102-6
- [10] Gude N, Muraski, J Rubio M, et al. Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ Res*, 2006, 99(4): 381-8
- [11] Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, et al. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 2006, 116(12): 3183-94
- [12] Hansel NN, Cheadle C, Diette GB, et al. Analysis of CD4⁺T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms. *Allergy*, 2008, 63(3): 366-9
- [13] Gelain F, Bottai D, Vescovi A, et al. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PLoS ONE*, 2006, 27(1): e119