

Ray Blanchard, Ph.D., Sr. Scientist

SuperArray Bioscience Corp.

摘要

以通道为中心的 Oligo GEArrays 提供一种从 100 到 400 个基因中测量 mRNA 含量的快速的、经济的方法。从待测样品制备到在尼龙膜上固定 cRNA (基因) 特异性探针, 可通过标记目的 cRNA 杂交而实现。与 cRNA 探针相关联的化学发光反应中发出光线, cRNA 与探针杂交的数量通过该光线来测量。尽管该光线通过 X 射线胶片照射 GEArrays 来产生一张 X 射线照片 (灯光照片) 来测量这种光线, 但是射线照片受内在的窄动态范围 (限制从微阵列中获取定量数据的数量) 的影响。这种方法也要求把射线照片扫描成适合于计算处理数据提取的数字格式。这样的数据提取除增加额外工作之外, 还潜在地抑制了动态范围。测量 GEArray 信号强度的最好方法是使用像 Alpha Innotech 公司的 FluorChem[®] 系统一样的优质 CCD 相机系统。本文将回顾 CCD 相机系统特性, 这些特性使得它能够获得 GEArray 理想的图像, 以及采用 FluorChem 相机及 AlphaEase[®] FC 软件为数据提取制作优质 GEArray 图像的步骤。

引言

高质量的基因表达分析结果依赖于从微阵列上产生的一致的量化数据。这可通过组合处理微阵列样品, 使用高质量的检测系统而达到。我们特别针对化学发光图像采集而假设:

1. 从每个探针点发出的光线数量与探针杂交的生物素化基因数量成线性比例。
2. 所有介于不同微阵列相片间的摄影条件是相同的。
3. 阵列间适用一致的数据提取变量。

线性:

假设 #1 满足相片曝光强度的线性动态范围。全部动态范围绘成杂交 cRNA 数量对曝光元件强度的曲线, 为反曲形状, 在图 1 中部具有线性关系, 此线性区域的上下部分, 光线强度并不准确地反映 cRNA 数量。因此, 微阵列元件及信号在这些范围上也并不提供量化的有效数据以用于分析, 所以应该被排除在量化分析之外。

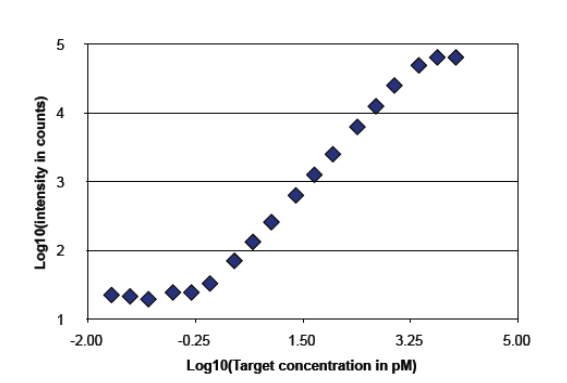


图 1: CCD 相机的全动态范围样品图, 以样品数量对曝光元件强度来绘制。图形为反曲形状, 在中间段且线性关系。

实际上, 当像素的信号强度最大时或处于饱和态, 可达到动态范围的上端。这直接成为相机的位深。一个 16 位的相机, 例如: FluorChem[®]HD2 系统允许在达到饱和之前, 捕捉 65535 位阶的光线, 而一个 8 位相机只有 256 位阶。因此, 16 位相机能够拥有一个更大的动态范围, 这种范围产生为分析结果产生更量化的数据。在 GEArrays 杂交的基因元件包括一些非常丰富的 mRNA 种类, 例如传统的“管家”(HK) 备选基因, 这些基因可以容易地达到饱和强度水平, 如在 GEArray 表达分析工具包 (GEAS) 观察到的平均信号强度大于 62000。当发生这样事情时, 使用这些基因元件为部分微阵列分析, 特别是不同阵列间的换算, 是不再有效的。饱和基因元件可以仍能提供指示非常高的量化基因表达的数据, 但这些数值不应该用于精确的数学比较。这种理想的 GEArray 图像在饱和水平之下信号强度下降最大。

动态范围的低端受阵列图像的非特异性背景的影响最为显著, 基因信号必须充分地高于背景, 在动态范围的低端线性部分或量化极限之内 (LOQ)。尽管如此, 注意在量化极限 (LOQ) 和检测极限 (LOD) 之间存在差别, 这是重要的。因为不在动态范围之内, 低于量化极限, 但高于检测极限的可检测的基因元件存在信号强度, 所以, 它们不应用于数学分析。这些基因元件由微阵列分析软件识别或标识这些数值的非量化特征, 从而指定为“缺省”的点。对于 GEAS, 这些缺省的/存在的极限值被测定为一个高于背景信号强度的比率。非特异性背景越高,

标识为缺省的基因元件越多。因为这个道理，保持非特异性背景，更重要的是在 GEArray 图像中尽可能地使背景值低。

良好的微阵列处理技术是一个在 GEArray 上最小化非特异背景的最重要因素，但也是考虑辅助保持尽可能低的拍摄背景。这些包括使用冷却相机，减少化学发光微阵列所需要的长时间曝光而出现的 CCD “噪声”，另外，因为长时间曝光会产生较大的背景信号强度，除了更大的基因强度外，应尽可能地保持短的曝光时间。为了获得时间平衡，需要化学发光试剂来产生可量测的光线水平。所有 GEArray 应允许在开始曝光之前，以相同的时间间隔采用 CDP-Star 温育，推荐的曝光时间为 5 分钟。这将保证所有 GEArray 的全部信号强度水平在单个实验保持一致。良好的杂交和曝光的结合应达到不少于 1/10 全部动态范围或图像位深的非特异背景强度。

成像条件

当 GEArray 用户不十分了解他们的相机系统里的参数可以控制或修改时，可能出现这个问题。因此，避免这个问题的方法是熟悉你的特殊的相机系统和为每幅图像记录所有设置，以便它们在新的图像采集之前达至一致性。幸运的是，AlphaEase®软件在那些自动随每张图像贮存起来的 STP 文件中（图 2）自动记录这些设置。有一些设置，例如缩放、对焦和光圈，必须直接在相机镜头上调节。这些设置不被自动记录下来，所以不成为图像文件的一部份，因此必须手工记录它们。

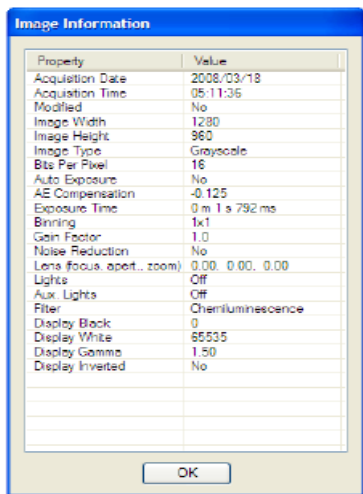


图 2 是 AlphaEase®软件记录的图像特性。这些特性可以通过选择“图像菜单”然后“图像特性”而查看。滤光片选择、曝光时间和 Binning 选择和机器号都能自动记录下来。

当拍摄 GEArrays 时，最经常被忽视的设置是使用“缩放”或可调视角镜头来调节的相机视角。视角的变化导致在图像的微阵列像素分辨率和在单点或单个基因元件内的像素数目发生

改变。GEArray 图像分辨率不一致能潜在地改变信号强度的测定，所获得的信号强度在微阵列分析中产生较大变异性。重要的是为了只显示物体的较小区域，电子缩放功能实际上减少相机视野。这减少了视野中的总像素数目，因此这些功能不应在拍摄 GEArray 时使用。GEArray 图像在中等强度的单点上的像素大于 18 时，显示效果最好。通过放大镜头或向镜头移动阵列，以便让阵列填补更多的拍摄视野，这样使每个阵列的像素数目物理上最大化。然后在同一个实验中使用这个位置和缩放设置去拍摄图像。

数据提取

拍摄的准备可以通过一或二种方法来完成。首先，对于在 HybPlate 中处理的 GEArray 先直接拍照；在 HybPlate 中，避免直接处理各个阵列。其次，对于在 HybTubes 或 HybPlates 中处理的 GEArray, 从杂交室中移出阵列，把它们放进相纸保护套中。在单个拍摄视野中可以包括的阵列数目受到 CCD 相机的数百万像素和所使用配置的限制。一般地，对于 100 万像素图像视野，通过调节，应包括不多于 8 GEArray (在 1 HybPlate 中)，并且这样相同的视野调节要应用于一个实验中的所有图像。

随着 FluorChem®系统打开和 AlphaEase 软件启动，点击“Acquire”按钮进入图像采集控制面板。

用 CDP-Star 处理后，把 GEArray 放进相机系统。为了使从 GEArray 中捕捉的光线数量最大化，它们应尽可能地靠近相机布置。利用 FluorChem®外罩，这可以通过把一个辅助搁板滑进白光照射单元的顶部狭缝中，并把阵列放置其上来完成。(把 GEArray 直接放在一个较低的透射照明器的架上，要求曝光时间较长，从而产生可比较的图像)。

随着反射白光灯打开，相机镜头首先聚集，GEArray 定位于视野中心，调节缩放，尽可能多地填补阵列视野。

当对 GEArray 成像时（图 3），分辨率和 Binning 特性是重要的考虑因素。没有 Binning 功能的 100 万像素 CCD 相机在单张图像上提供足够采集 8 张 GEArray 阵列的清晰度。然后剪裁每个阵列，从较大的相片中缩减为一个较小图像，以便在 GEAS 中进行图像处理。一个 400 万像素相机，像 FluorChem®系统可以与 2×2 Binning 功能一起使用，获得相同的分辨率，但曝光时间缩短。同样地，一个 400 万像素相机可以在单一视野中用来拍摄最多 32 GEArray 阵列，但它要求更长的曝光时间，因为这种设置的光敏感度要低。

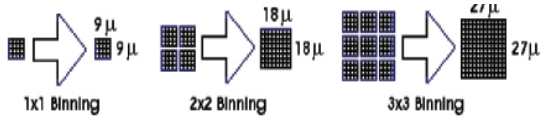


图 3. Binning 功能结合多个相邻像素，形成一个“超级像素”。这种超级像素代表所有对电荷有贡献的像素的面积。Binning 1*1 表示使用单个单独像素，Binning 2*2 表示 4 个相邻像素的面积已结合成一个更大的像素，如此类推。在本例中，光敏感度已增加大了 4 倍（4 个像素），但是本图像的分辨率减少一半。本图说明了这种效果。Binning 功能有效地增大像素尺寸，同时也增加了敏感度。

逐步化学发光图像采集：

1. 应用并倒掉 CDP-Star 试剂，然后温育 5 分钟；
2. 把 GEMatrix 转移和定位在相纸保护套中（对于 HybPlate 不作要求）；
3. 使用白光照明，把阵列定位在 FluorChem®系统暗箱中的视野中心，保持相机镜头。把阵列重定位在相机视野中央。
4. 按实验规范，调节系统设置：
 - a. 缩放（镜头）
 - b. f/s（镜头）
 - c. 曝光时间
 - d. Binning
 - e. 滤波片轮
 - f. 如需要，采用其他图像设置和显示设置。
5. 关闭暗箱和照明。
6. 开始曝光。
7. 完成曝光后，把图像存为原始的未改动的图像。
8. 开始原始图像复制、修剪并把每个 GEMatrix 存为独立图像文件。
 - a. 点击编辑/编辑激活和选择个别边宽适当的 GEMatrix

- b. 点击编辑/修剪
- c. 点击文件/另存为，把各个阵列图像存起来
- d. 所有阵列图像重复步骤 8 至 10

9. 注册进入 GEAS， 上载各个阵列文件到项目中 (http://suerarray.com/support_software.php)

FluorChem®系统的良好 Oligo GEMatrix 成像实例见于图 4 中：

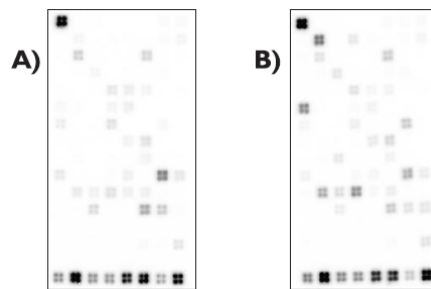


图 4 采用相机系统获得的优质 Oligo GEMatrix 图像实例。使用本技术说明中的步骤捕获 2 个 OMM-52（先天和自适应免疫反应）Oligo GEMatrix 图像。左（A）图像为对照样品，而右（B）侧图像为实验处理样品，在这些图像中可明显看见可区别的表达式差异。注意 HKG 元件是饱和的，完全变黑（左上元件和 3 个底部元件），这些基因元件强度在视觉上等效于在 2 个阵列上达到饱和的元件。另外，非特异性背景和噪音很低，在阵列元件之间几乎看不出灰度水平。重要的是这种鉴定方法对于没有经过对比度调整的图像处理时是有意义的。

结论：

总之，Oligo GEMatrix 提供一种测量基因的经济方法，这些基因组成以通道为基础的基因组。进一步看，当结合了像 FluorChem®相机系统一样的高质量 CCD 成像系统，可以把从系统中获得的数据进行最大化。小心一贯地使用优化设置使数据精确度提高，可再现数据，从而为基因表达分析实验产生高质量的结果。

术语库：

像素： 图像元素，其值在可视化显示时最小。

位深： 系统 A/D 转换器数字化的位数（采用二进制符号信

息的最小单位)。

饱和度: 在像素小孔上采集的高于像素的线性范围的光线点。

量化极限: 与杂交探针成一致线性比例的最低信号水平。

检测极限: 可以在背景噪音上分辨的最低信号。

Binning: 在 CCD 成像技术中, 结合从邻近像素释放电荷的技术, 以便全部电荷可以以空间分辨率代价读出为图像, Binning 因子告诉你在 Binning 期间结合到 CCD 上的像素数目。Binning 2×2 因子指示 2 栏 \times 2 排像素 (总共为 4 像素) 结合在 CCD 读出图像中。

参考资料

SuperArray and Alpha Innotech co-citations on GEArrays

1. Yan Leng and De-Maw Chuang. Endogenous γ -Synuclein 1. Is Induced by Valproic Acid through Histone Deacetylase Inhibition and Participates in Neuroprotection against Glutamate-Induced Excitotoxicity. *J. Neurosci.*, Jul 2006; 26: 7502-7512.
2. Yongquan Luo, Catherine Schwartz, Soojung Shin, 2. Xianmin Zeng, Nong Chen, Yue Wang, Xiang Yu, and Mahendra S. Rao. A Focused Microarray to Assess

Dopaminergic and Glial Cell Differentiation from Fetal Tissue or Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, Apr 2006; 24: 865-875.

3. Xiangle Sun, Harlan P. Jones, Lisa M. Hodge, and Jerry 3. W. Simecka. Cytokine and Chemokine Transcription Profile during *Mycoplasma pulmonis* Infection in Susceptible and Resistant Strains of Mice: Macrophage Inflammatory Protein 1 β (CCL4) and Monocyte Chemoattractant Protein 2 (CCL8) and Accumulation of CCR5+ Th Cells. *Infect. Immun.*, Oct 2006; 74: 5943-5954.
4. John F. Kummerle, Huiping Zhou, and Jennifer G. 4. Bowers. IGF-I stimulates human intestinal smooth muscle cell growth by regulation of G1 phase cell cycle proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Mar 2004; 286: 412.
5. Mohammed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Danielle 5. Wroblewski, Muhammad Naveed Akhtar, Raina A. Patel, Wendy Lavezzi, Sophie C. Gangloff, Sanna M. Goyert, Melissa J. Caimano, Justin D. Radolf, and Timothy J. Sellati. Signaling through CD14 Attenuates the Inflammatory Response to *Borrelia burgdorferi*, the Agent of Lyme Disease. *J. Immunol.*, Feb 2005; 174: 1539-1548.

该FluorChem®生物成像系统家族为适用于化学发光、荧光、可见光成像而设计。该FluorChem®系列产品结合灵敏度、分辨率和动态范围为客户提供一流的凝胶、膜和微孔板检测成像能力。

更多信息, 请登陆: <http://www.alphainnotech.com>。

SuperArray®生命科学提供基于通道的基因表达分析产品和服务, 包括实时RT2 Profiler™ PCR阵列和杂交的Oligo GEArray® DNA微阵列。更多信息, 请登陆: <http://www.superarray.com>



**Alpha
Innotech**