

检测黄曲霉毒素生物合成相关基因芯片的研制

胡娜¹, 许杨^{2,*}, 涂追²

(1. 江西科技师范学院生命科学学院, 江西 南昌 330013; 2. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 研究比较成熟的可用于分析黄曲霉毒素生物合成相关基因的芯片分析技术。芯片点阵后依次通过温浴 2h, 650mJ/cm² 紫外交联 30s、80℃ 烘烤 2h、预杂交 45min、清洗、干燥等步骤, 最后与待测样品在 42℃ 杂交 16h, 可获得低背景高质量的芯片。本实验所用探针来源于寄生曲霉, 而待测样品选择了黄曲霉菌株, 芯片扫描结果显示荧光信号稳定, 与反转录 PCR 扩增结果一致, 并且无背景干扰。证明探针设计合理, 实验方法可靠。初步建立了用芯片检测与黄曲霉毒素生物合成相关基因的技术平台。

关键词: 寄生曲霉; 黄曲霉; 黄曲霉毒素; 基因芯片

Development of Gene Chip for Aflatoxin Detection

HU Na¹, XU Yang^{2,*}, TU Zhui²

(1. College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China ;

2. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract : In order to detect genes related to aflatoxin biosynthesis, a high quality gene chip was successfully developed here. The preparation of this gene chip was involved in a series of processes: array on the slide, heating in 42℃ water bath for 2 h, UV-induced crosslink at 650 mJ/cm² for 30 seconds, baking in oven at 80℃ for 2 h, pre-hybridization for 45 min, then washing and drying, and final hybridization with fluor-derivatized samples at 42℃ for 16 h. The probe originated from *Aspergillus parasiticus* could be used to analyze aflatoxin gene expression in *Aspergillus flavus*. Therefore, this probe can provide stable fluorescence signal without background inference and results consistent with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Key words : *Aspergillus parasiticus* ; *Aspergillus flavus* ; aflatoxin ; gene chip

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0185-05

基因芯片是指将大量核酸片段(寡核苷酸、cDNA、基因组 DNA、cRNA 或 PNA)有序地固定于支持物(如玻片、硅片或膜等载体)的表面, 组成密集二维分子排列, 然后与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交, 通过特定的仪器(如荧光共聚焦扫描仪或电荷耦联摄影机等)对杂交信号的强度进行快速、并行、高效的检测分析, 从而判断样品中靶分子的数量^[1-3]。基因芯片制备的基本流程包括芯片的制备、靶样品的准备和标记、杂交、杂交信号的获取和数据分析等。

基因芯片技术用于黄曲霉毒素生物合成相关基因的研究目前尚未见相关报道。本实验拟通过设计探针(与黄曲霉毒素生物合成相关的基因片段)点阵芯片, 再经过温浴、紫外交联、烘烤等步骤, 最后与标记好的样

品(寄生曲霉和黄曲霉的 RNA)进行杂交, 以期初步建立检测黄曲霉毒素生物合成相关基因的生物芯片。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纯化后的黄曲霉毒素生物合成相关基因的 PCR 产物, 经过 DNase 消化处理过的黄曲霉 AS3.4409 的 RNA。

柠檬酸钠、NaCl、Salmon DNA、SDS、甲酰胺、BSA、无水乙醇、EDTA、NaOH、乙酸均为分析纯。

本实验以 Genebank 中的序列信息为背景(表 1), 设计 27 对 5'CY5 荧光标记的引物, 并由上海 Sangon 公司合成。

收稿日期: 2008-09-19

基金项目: 江西科技师范学院青年创新基金项目

作者简介: 胡娜(1980 -), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品质量与安全控制。E-mail: na9728067@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 许杨(1951 -), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品质量与安全控制。E-mail: yuyang51@yahoo.com.cn

表1 引物序列表
Table 1 Sequence list of primers used in this study

基因名称	片段长度(bp)	引物序列
<i>aflA/fas-2</i> ; <i>hexA</i>	400	FP ^a :5'-CY5-TTA CCG TAT AAT TGC GCT CAA C-3' SP ^b :5'-GAG GGC TAC TAT CGC AAG GTG-3'
<i>aflB/fas-1</i> ; <i>hexB</i> ; <i>uvm8</i> ; <i>fas-1A</i>	400	FP:5'-CY5-CGC GTC TCC CTC GAT CAT AAT-3' SP:5'-CCT CCG GAC AGT TGA CGT ACA AG-3'
<i>aflC/pksA</i> ; <i>pksL1</i>	400	FP:5'-CY5-GCT TCA GAT CAA GTG CAG G-3' SP:5'-AAG TTA GAT GCT GTA ATG CGA GT-3'
<i>aflD/nor-1</i>	400	FP:5'-CY5-TTG AAG CTT TTC TCC AAC G-3' SP:5'-ATG TTG GTG ATG GTG CTG-3'
<i>aflE/norA</i> ; <i>aad</i>	400	FP:5'-CY5-GTA ATG GGT GAG TGT GAC CAG-3' SP:5'-CCC CCA GAT ACA GAA CCT TG-3'
<i>aflF/norB</i>	400	FP:5'-CY5-TCT CGA TTG CGT TCA CCT CT-3' SP:5'-TTT GTT GTC TAT CAG GGG CTG TG-3'
<i>aflG/avnA</i>	400	FP:5'-CY5-GCG CAG AAG ACC ATC CAG T-3' SP:5'-TAA TCC GGA GTT TCC CAA GG-3'
<i>aflH/adhA</i>	400	FP:5'-CY5-GGG ACT CTA CAG GGG AAA AG-3' SP:5'-TGT AGT AGA CGC CGA TCA AG-3'
<i>aflI/avfA</i>	400	FP:5'-CY5-AGT CTG TAG CCC GTT GGA TG-3' SP:5'-CTA CAG ACT CTG ATG CTT TGA GTG-3'
<i>aflJ/estA</i>	400	FP:5'-CY5-TGA GAA CCA ACC ACT CGT CC-3' SP:5'-CAT AAC CGG CAC CTT AGC AG-3'
<i>aflK/vbs</i>	400	FP:5'-CY5-ATC ATG TTG GCG ACG ATA GT-3' SP:5'-AAG AGT ACC CGT TTA ACA AGA GTG-3'
<i>aflL/verB</i>	400	FP:5'-CY5-CGT CGA TGA CGG CAG TAA G-3' SP:5'-CGC AGT ATG GGA ATC GAG TT-3'
<i>aflM/ver-1</i>	400	FP:5'-CY5-GTG CGC CAT TTT GGC TAC-3' SP:5'-CCT GCT CAT CGG TGA AAG TC-3'
<i>aflN/verA</i>	400	FP:5'-CY5-ATT AGG CCG TTG GTG CTA TG-3' SP:5'-CTG TTG TGT AGG GAA GCT TGT TT-3'
<i>aflO/omtB</i> ; <i>dmtA</i>	400	FP:5'-CY5-TGG CCT GCT CTT TAC TGT C-3' SP:5'-CTT CCT GGT CGC CTT ATA GT-3'
<i>aflP/omtA</i> ; <i>omt-1</i>	400	FP:5'-CY5-GGA GGT TTG CCT TTC GTC TG-3' SP:5'-GGG AGA TCG TGC GTA CCT G-3'
<i>aflQ/ordA</i> ; <i>ord-1</i>	400	FP:5'-CY5-TAT TGC GAT ACG TAC CAT CCT G-3' SP:5'-ACA AGG GCG TCA ATA AAG GG-3'
<i>aflR/apa-2</i> ; <i>afl-2</i>	400	FP:5'-CY5-TGC TAG CGA AAA GCA GCA AT-3' SP:5'-TAC CCA GGC CCA CAC TCA T-3'
<i>aflS/aflJ</i>	400	FP:5'-CY5-GCA GAC ATT GCA GGA GTC C-3' SP:5'-AGT TTT GCC AGT TCA TCC G-3'
<i>aflT</i>	400	FP:5'-CY5-CCC CCT GGT TTA TTG TCA GT-3' SP:5'-GCA TTA TAT GCC ACC AGC AC-3'
<i>aflU/cypA</i>	400	FP:5'-CY5-GAT AGC CGC TAT CAC GCA TC-3' SP:5'-TTT GAG ATC TAA GAC GGT GCC-3'
<i>aflV/cypX</i>	400	FP:5'-CY5-GAA GGG GTC CTT GGT TCC-3' SP:5'-TGG GTC TAT TGT GCT CAT CG-3'
<i>aflW/moxY</i>	400	FP:5'-CY5-GGG CTG CTA CTG GAA TGA AG-3' SP:5'-GTC CTT ATC GGT CGA CGT GT-3'
<i>aflX/ordB</i>	400	FP:5'-CY5-CAG CCC AGT CAG CAC ATA GT-3' SP:5'-GTG CCA GTC TCT ACC CAA GT-3'
<i>aflY/hypA</i>	400	FP:5'-CY5-TTC CAC ACC AGC GTA CCC AT-3' SP:5'-TGG AAA GGA CGC TCT GAC C-3'
<i>beta-tublin</i>	400	FP:5'-CY5-CGG TGC TGG TAA CAA CTG G-3' SP:5'-GTG GTT CAG GTC ACC GTA AGA G-3'
<i>lacZ (beta-galactosidase)</i>	400	FP:5'-CY5-GCA GGC GTT TCG TCA GTA T-3' SP:5'-GCG GTA GTT CAG GCA GTT C-3'

注：a. FP为第一链引物(5'-CY5 荧光修饰的)；b. SP为第二链引物。

1.2 仪器与设备

基因芯片仪、AD3200 基因芯片仪 美国 BIO-DOT 基因有限公司；DNA scope LM⁺ 型荧光扫描仪 美国 Gene Focus 公司；HL-2000 型紫外交联仪 德国 UV Crosslinker 公司；9600 型 PCR 仪 美国 Perkin Elmer 公司；Milli-Q 超纯水系统 美国 Millipore 公司；CAE-25 Microarray Slides 玻璃芯片 美国 CEL Associates 公司；ArrayIt(r) Hybridization Cassette 美国 ArrayIt Miorrray Technology Color Peridot 公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

20 × SSC : 3.0mol/L NaCl、0.3mol/L 柠檬酸钠、用 14mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0, 121.3 °C, 高压灭菌 20min。终止液：35 μmol/L EDTA、1.4mol/L NaOH、121.3 °C, 高压灭菌 20min。10% SDS : 100g SDS 溶于 1000ml 水中, 121.3 °C, 高压灭菌 20min。预杂交液：25% 甲酰胺、5 × SSC、0.1% SDS、1% BSA、0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。洗液 1 : 2 × SSC, 1% SDS ; 洗液 2 : 0.1 × SSC, 0.1% SDS ; 洗液 3 : 0.1 × SSC。

1.3.2 盖玻片的处理

在温水中加入适量洗洁精，清洗盖玻片表面一次，漂洗干净；将盖玻片浸入加有洗洁精的热水中煮沸 5min 以上，漂洗干净；乙醇洗液浸泡 2h(使用前适当加热至温热)，蒸馏水反复漂洗至 pH 值为中性；用无水乙醇脱水，临用前把盖玻片逐片从无水乙醇中夹出，于超净工作台中风干。

1.3.3 探针的制备

将 25 个(*aflA* ~ *aflY*)基因探针和两个质控探针(-*tublin* 和 *LacZ*)溶于 3 × SSC 溶液中，终浓度 400 μg/μl。

1.3.4 点样

湿度：55%，大于环境湿度的 3% RH，最高不超过 65%；温度：26 °C，点样针为 1 根；点间距离：0.45 μm。点样池按 A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1、H1、A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2、H2、A3、B3、C3、D3、E3、F3、G3、H3、A4、B4、C4 的板孔顺序将 27 个点阵探针(*aflA* ~ *aflY*，-*tublin* 和 *LacZ*)依次加到 96 孔板中，每孔加探针 50 μl(400ng/μl)。点样缓冲液为 3 × SSC。

1.3.5 温浴

将芯片水平放入封闭的湿盒中于 42 °C 温浴 2h。

1.3.6 紫外交联

将芯片水平放在紫外交联仪中，能量采用 650mJ/cm²，交联时间为 30s。

1.3.7 烘烤

将芯片放入烘箱中 80℃ 烘烤 2h 后取出, 冷却至室温。

1.3.8 预杂交

将芯片放入杂交盒, 置于 42℃ 杂交炉; 盖玻片在无水乙醇中保存, 临用置于 50ml 离心管中 1000r/min 离心 10min; 杂交盒中垫滤纸, 加 3 × SSC 浸润, 保持平整、水平, 置于 42℃ 杂交炉; 加入 20 μl 预杂交液, 42℃ 预杂交 45min; 用无菌水冲洗 3 次, 再用无水乙醇冲洗 3 次, 室温干燥。

1.3.9 样品标记

表 2 反转录反应体系

Table 2 Components of RT-PCR reaction system

试剂	体积(μl)
MgCl ₂	2
10 × RT Buffer	1
RNase Free dH ₂ O	3.75
dNTP Mixture	1
RNase Inhibitor	0.25
AMV Reverse Transcriptase	0.5
Oligo dT-Adaptor Primer	0.5
总 RNA	1
总反应体积	10

按表 2 配制反应体系, 以黄曲霉 AS3.4409 总 RNA 为模版通过反转录合成 cDNA 序列。根据表 3 体系进行标记反应。

表 3 标记反应体系

Table 3 Components of labeling reaction system

试剂	体积(μl)
5 × RT Buffer	10
灭菌蒸馏水	28.75
TaKaRa Ex Taq™ HS	0.25
荧光标记的第一链引物(125mmol/L)	1
第二链引物(25mmol/L)	1
反转录产物	10
总体积	50

标记反应条件: 94℃, 2min; 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1min; 35 个循环; 72℃, 8min。

电泳检测: 采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压为 5V/cm。

纯化回收: 将 27 个基因片段的标记反应产物混合后采用琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 采用上海 Sangon 公司 PCR 产物凝胶电泳纯化试剂盒纯化。

1.3.10 杂交

1.3.10.1 杂交液制备

按表 4 所示配制杂交反应液。充分混匀, 杂交前 95℃ 变性 2min, 冰浴 10min。

表 4 杂交液体系

Table 3 Components of hybridization reaction system

溶液	体积(μl)
20 × SSC	6
10% SDS	1
样品 + 无菌水	30
Salmon DNA	3
总体积	40

1.3.10.2 芯片准备和盖玻片

将芯片放入杂交盒, 置于 42℃ 杂交炉; 盖玻片在无水乙醇中保存, 临用置于 50ml 离心管中, 1000r/min 离心 10min; 杂交盒中垫滤纸, 加 3 × SSC 浸润, 保持平整、水平, 置于 42℃ 杂交炉温浴 20min。

1.3.10.3 杂交

将 20 μl 样品加于芯片上无条码一侧, 加盖玻片, 从一侧开始覆盖, 防止产生气泡, 水平放入杂交盒, 42℃ 杂交过夜。

1.3.11 洗片

杂交完后取出芯片, 用洗液 1 冲洗 10min; 用洗液 2 冲洗 10min; 用洗液 3 冲洗 5min;

用无菌水冲洗 3 次; 用无水乙醇冲洗 3 次, 室温晾干。

1.3.12 图象采集

采用基于 PMT(photomultiplier tube, 光电倍增管) 原理的激光共聚焦扫描。

2 结果与分析

2.1 样品荧光标记



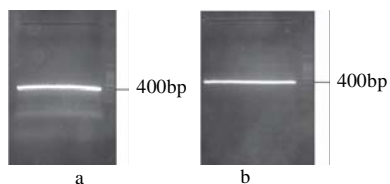
泳道 1 ~ 31 分别是 100bp DNA Ladder Marker、*aflA*、*aflB*、*aflC*、*aflD*、*aflE*、*aflF*、*aflG*、*aflH*、*aflI*、*aflJ*、*aflK*、*aflL*、*aflM*、*aflN*、*aflO*、*aflP*、*aflQ*、*aflR*、*aflS*、*aflT*、*aflU*、*aflV*、*aflW*、DL2000、100bp DNA Ladder Marker、*aflX*、*aflY*、*-tublin*、*LacZ*、DL2000。

图 1 黄曲霉凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR amplification products of RNA extracted from *Aspergillus flavus* AS3.4409

从黄曲霉 AS3.4409 中提取的 RNA 先经过 DNase 消化处理再进行反转录之后通过在 PCR 过程中掺入荧光标记的引物对样品进行荧光标记。凝胶电泳检测结果(图 1)表明, 黄曲霉 RNA 中与黄曲霉毒素生物合成相关的 25 个基因片段和 1 个阳性对照 *-tublin* 基因片段均被扩增得到。*LacZ* 基因片段来源于大肠杆菌 DH5。由

图2可知,经纯化荧光PCR产物中的杂质(包括引物二聚体等)均被去除。



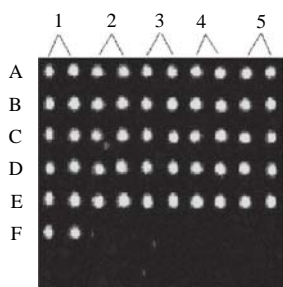
a.纯化前凝胶电泳图谱;b.纯化后凝胶电泳图谱。

图2 荧光PCR产物纯化前后对比

Fig.2 Comparison of PCR products without and with purification

2.2 图象采集

杂交后芯片经过清洗、干燥后,扫描成像见图3。



A₁ ~ A₅. *aflA*、*aflB*、*aflC*、*aflD*、*aflE*; B₁ ~ B₅. *aflF*、*aflG*、*aflH*、*aflI*、*aflJ*; C₁ ~ C₅. *aflK*、*aflL*、*aflM*、*aflN*、*aflO*; D₁ ~ D₅. *aflP*、*aflQ*、*aflR*、*aflS*、*aflT*; E₁ ~ E₅. *aflU*、*aflV*、*aflW*、*aflX*、*aflY*; F₁. 阳性对照 *-tublin*; F₂. 阴性对照 *LacZ*; F₃. 空白对照。

图3 黄曲霉产黄曲霉毒素的芯片图象

Fig.3 Gene chip map of *Aspergillus flavus* AS3.4409 producing aflatoxin

研究表明芯片点阵后依次通过温浴2h, 650mJ/cm²紫外光交联30s, 80℃烘烤2h, 预杂交45min, 清洗, 干燥等步骤, 最后与待测样品在42℃杂交16h, 可获得低背景高质量的芯片。本实验所用探针来源于寄生曲霉, 而待测样品选择了黄曲霉菌株, 芯片扫描结果显示荧光信号稳定, 与反转录PCR扩增结果一致, 并且无背景干扰。证明探针设计合理, 实验方法可靠。初步建立了用芯片检测与黄曲霉毒素生物合成相关基因的技术平台。

3 讨论

基因芯片技术的实质是反向点杂交的集成化, 在固相介质上固定的是基因探针, 而标记的是待测样品^[4-5]。因研究目的不同、期望制作的芯片类型不同, 制备芯片的方法也不尽相同^[6-8]。以DNA为例, 基本可分为两大类: 一类是原位合成, 适用于寡核苷酸; 一类是预合成后直接点样, 可用于大片段DNA和寡核苷酸。由于原位合成比较复杂, 除了在基因芯片研究方面享有盛誉的Affymetrix等公司使用该技术合成探针外, 研究者

大多使用合成后点样法。点样的方式又分为两种。其一为接触式点样, 即点样针与固相支持物表面接触, 将样品留在支持物上, 显著优点是可制备高密度阵列, 通常可达到2500dots/mm²; 其二为非接触式点样, 即喷头, 是以压电原理将样品通过毛细管直接喷至支持物表面。因喷点的斑点较大, 故探针密度低, 通常只有400dots/mm², 多用于蛋白芯片的制备。本实验采用合成后接触式点样法, 比原位合成探针法更容易操作, 且成本更低廉。基因芯片的杂交属于固相杂交, 不同的标记方法, 标记样品的纯化, 杂交温度, 杂交时间等很多因素均会影响到杂交效果。因此对这些参数必须严格控制。

为获得均一的杂交温度, 本实验设计的探针片段长度一致, 均为400bp的中长寡核苷酸片段, 因此杂交时选择低温长时杂交, 即42℃, 16h。

3.1 点样载片的选择

基因芯片的载片材料有尼龙膜、硝酸纤维素膜、玻璃芯片、硅芯片、陶瓷芯片等。尼龙膜和硝酸纤维素膜的荧光背景高, 而且液滴在膜上易扩散, 使得制作的微阵列密度很低, 加上它们不容易被固定在点阵台上, 所以不适用于本实验的研究。本实验选用玻片材料做载片。相对于其他芯片玻片材料具有易得、荧光背景低、杂交体系小并且应用方便等优点。

3.2 点样后芯片的处理

点样后的芯片处理是实验成功的关键步骤之一, 关系到芯片的质量和可信度。CELL公司的玻片是氨基化的, 氨基带有正电荷和中性的pH值, 可以和天然DNA的磷酸骨架以离子键结合。用紫外线或加热处理基片后可以产生静电, 这可以在DNA的胸腺嘧啶残基与烷胺基之间以自由基作用形成耦合物, 天然DNA与基片表面的静电或非特异性共价结合是稳定的^[9]。本研究采用靶基因片段固定的方法是紫外光交联后, 再高温烘烤2h, 可以使DNA片段牢固地结合在芯片上。与目前的芯片制作工艺相比, 该方法无须干燥24h或干燥过夜^[10], 缩短了操作时间。

3.3 待测样品的制备与纯化

高质量目标序列的制备是芯片杂交成功的关键。单链DNA目标序列与双链目标序列相比, 敏感性强, 至少是随机引物法标记的双链目标序列的8倍左右^[10], 因此杂交效率也更高, 这是因为双链在杂交时, 除与点样探针杂交外, 其自身的两条链之间也会形成无效杂交, 这种互补链的竞争反应导致了杂交信号减弱。估计随着靶核酸长度的增加, 扩增产物出现严重的二级结构会使两种方式得到的样品信号之间的差距更明显。制备单链核酸有分离双链、DNA线性扩增等方法^[11-13], 但用不对称扩增方法制备的单链不需分离、纯化, 亦不

需在反应液中加入核酸竞争抑制剂及其他活性剂,可以直接用于杂交,有效地减少了芯片使用的中间环节,降低了成本^[14]。不对称扩增时,两条引物浓度的比例采用 1:5、1:10、1:50、1:100 都可以特异扩增,但引物比例较高时,产物中双链含量较低,用常规的凝胶电泳难以检测^[15]。实验发现引物比例为 1:5 及 1:10 产生的单链都足以与点样探针杂交,因此引物比例选择 1:5 较合适,既可以通过不对称扩增产生足够的单链 DNA,也可以用凝胶电泳来观察扩增结果。此外,待测样品 DNA 还必须经过纯化,以除去 dNTP、NTP、蛋白质、小分子量的引物和小片段 cDNA,这些混合物的存在可能在杂交过程中出现未知的化学反应,使其牢固地结合在芯片的表面上,尽管应用严格的杂交后清洗程序,也去除不净。目前的研究报道,样品 DNA 多采用 CyScribe GFX Purification Kit(Amersham 公司)^[16-17] 或 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc., Ontario, Canada)^[18] 进行纯化,此法成本高。本实验采用上海生工公司的普通柱式凝胶回收试剂盒,不但成本低,而且简洁、快速。

3.4 操作环境

基因芯片可以敏感地检测出基因表达的变化。激光扫描的结果背景必须低,要达到此目的,本实验除了在洁净的环境中进行操作和使用优质的试剂外,在杂交后也进行了严格的清洗,以保证实验结果的可靠性。

参考文献:

- [1] 尤涵,樊代明. 基因芯片技术研究进展[J]. 陕西肿瘤医学, 2000, 8 (3): 129-132.
- [2] MARSHALL A, HODGSON J. DNACHips: an array of possibilities[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 27-31.
- [3] 何志巍, 谢鹭, 许亮国, 等. 一个与人鼻咽癌相关新基因的克隆[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 1168-1173.
- [4] van't VEER L J, DAI H, de VIJVER M J, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer[J]. Nature, 2002, 415 (6871): 530-536.
- [5] CHEN J J, WU R, YANG P C, et al. Profiling expression patterns and isolation differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection[J]. Genomics, 1998, 51(3): 313-324.
- [6] LIEN Y C, NOEL T, LIU H, et al. Phospholipase C- δ 1 is a critical target for tumor necrosis factor receptor-mediated protection against adriamycin-induced cardiac injury[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4329-4338.
- [7] TAN J, ZHUANG L, JIANG X, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity[J]. J Biol Chem, 2006, 281(15): 10508-10515.
- [8] CHAUDHRY M A. Bystander effect: Biological endpoints and microarray analysis[J]. Mutat Res, 2006, 597(1/2): 98-112.
- [9] 张宝, 马文丽, 石嵘, 等. 纯化探针降低基因芯片杂交结果的背景[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 27-28.
- [10] BEDNARCZUK T A, WIGGINS R C, KONAT G W. Generation of high efficiency, single-stranded DNA hybridization probes by PCR[J]. Biotechniques, 1991, 10(4): 478-493.
- [11] WANG E, MILLER L D, OHNMACHT G A, et al. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 457-459.
- [12] van GELDER R N, von ZASREOQ M E, YOOL A, et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(5): 1663-1667.
- [13] EBERWINE J, YE H, MIYASHIRO K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(7): 3010-3014.
- [14] 赵文瑾, 何群, 张玉魁, 等. PCR法制备乙肝病毒基因芯片目标序列的探讨[J]. 中国医科大学, 2005, 34(4): 318-319.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 417-418.
- [16] 高宏伟, 马永和, 段铭, 等. 应用基因芯片对4种产毒霉菌的检测[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 376-378.
- [17] SONG Y, DAI E, WANG J, et al. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray[J]. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(2): 121-127.
- [18] LEMARCHANDA K, BERTHIAUME F, MAYNARDA C, et al. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(2): 115-126.