



生命科学实验指南系列



DNA Microarrays:
a molecular cloning manual

DNA 微阵列 实验指南

[美] D. 鲍特尔 等著
J. 萨姆布鲁克
吕 华 陆祖宏 孙 啸 译



科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

DNA 微阵列实验指南

DNA Microarrays: a molecular cloning manual

〔美〕 D. 鲍特尔 等著

J. 萨姆布鲁克

吕 华 陆祖宏 孙 啸 译

科 学 出 版 社

北 京

图字: 01-2003-4114 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家,包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书,是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了,囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法,无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度,特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表,堪称经典,分别被喻为生命科学领域的“蓝宝石”和“红宝石”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

DNA Microarrays: a molecular cloning manual, by David Bowtell and Joseph Sam-brook.

Copyright © 2002. Translation rights arranged with the permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press.

图书在版编目(CIP)数据

生命科学实验指南系列:典藏版/雷东锋等编著. —北京:科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-047486-5

I. ①生… II. ①雷… III. ①生命科学-实验-指南 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑:王 静 李 悦

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张:1310 1/2

字数:31 074 000

定价:4500.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

译者序

DNA 微阵列的最初构想来自于开发一种高通量的分析工具,可以使用杂交测序(SBH, sequencing by hybridization)的方法对人类基因组进行序列测定。20 世纪 90 年代中期,美国斯坦福大学的 M. Schena 博士应用机器自动点样方法在玻片上固定 DNA 探针,并通过双色荧光标记检测技术同时测定了多个基因的表达。1996 年,美国 Affymatrix 公司应用微电子制造工业领域的照相平版印刷工艺,制备了第一块基因芯片(Genechip®)。在此后 10 多年的发展历程当中,DNA 微阵列的制作工艺日臻成熟,应用领域也在不断拓展,并派生出了蛋白质芯片、细胞和组织芯片等一系列微阵列,以及液相芯片和微流体芯片等新型的芯片分析形式。近几年来,生物芯片技术在新一代高通量 DNA 测序方法中也得到了广泛的研究和应用。总之,在当前的生命科学研究中,微阵列技术提供了一种以往任何技术都无法比拟的高通量、低成本和快速的分析手段。随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来,生命科学研究的模式面临着重大的变革,从定性到定量研究,从单个因素分析到系统性、全局性的分析,基于微阵列的各种分析方法必将在其中扮演着重要的角色,极大地提高我们获取各种生物信息的能力。

同时我们欣喜地看到,微阵列技术已经走出实验室,走向市场。微阵列和相关设施的商品化,使得更多的人可以接触和使用到这一新兴技术,更多的科研和应用项目也必将从中受益,一个巨大的微阵列产业正在形成。

清泉港实验室出版社出版的《DNA 微阵列实验指南》一书汇集了这一领域众多的知名专家和学者,他们根据各自研究成果,认真地给出了一系列全面而翔实的 DNA 微阵列实验方案。书中每个方案不仅含有实验的背景知识以及具体的操作内容,此外还提供了大量的信息栏和疑难问题解答,以帮助读者理解实验原理和进行正确的实验操作。全书内容新颖、图文并茂,兼顾了基础理论和应用实验技术,因而不仅仅是一本有价值的实验手册,同时也是了解和学习 DNA 微阵列技术的不可多得的、权威性的参考书。科学出版社将该书介绍给国内读者,对于推动我国生物芯片的研究与应用将会具有非常积极的作用。

感谢东南大学生物电子学实验室白云飞、程璐、董献军、高璐、葛芹玉、顾万君、郭晓英、贺全国、侯鹏、祭美菊、贾可、李同祥、刘和平、刘全俊、刘正春、梅茜、王宏、王进科、王志飞、肖鹏峰、肖忠党、谢建明、谢雪英、杨锡南、杨玉志、张春秀和周士新等参与了本书的最初翻译工作。为保持全书译文的准确性和前后内容的一致性以及连贯性,由吕华、陆祖宏和孙啸三位老师经大量修改润色,最终定稿。

科学出版社的李悦、王静老师为本书的出版工作付出了大量努力,在此谨向她们表示由衷的感谢!

最后感谢我们的同事和家人在本书翻译工作期间给予的理解、鼓励和支持。

希望本书的出版会对 DNA 微阵列领域的科研和应用人员有所帮助。由于译者能力所限,翻译中的不妥之处,恳请读者批评指正。

译者

2007 年 12 月于东南大学

原 著 序

基因组学 (genomics) 出现于 20 世纪 70 年代, 当时 Sanger 提出一个观点, 认为确定个体的全部基因组序列是理解其生物学的良好起点。他与剑桥分子生物学实验室的同事一起, 用 Sanger 测序法^[1]测定了 ϕ X174 噬菌体^[2]、人线粒体^[3]和 λ 噬菌体^[4]的基因组序列。根据其他一些发现, ϕ X174 序列揭示了重叠基因, 线粒体基因则表明其中使用了交替密码子。这个开创性的工作推动了更大的项目, 最终促成近年来对人类基因组的大部分序列进行测定^[5,6]*。公共数据库中数量巨大的高质量序列信息, 作为对 Sanger 遗产的衡量, 也向我们提出了一个挑战, 即从序列到基因组功能和高度复杂的生物体。基于计算机的分析方法也由 Sanger 研究组开创^[7]。例如, 通过发现候选基因, 从序列出发经过很长过程来提取生物学上相关的信息。但是计算机无法测量基因表达的水平, 或是分析 DNA 样品中序列的改变。对于这些和其他问题, 我们不仅需要改进现有的实验方法, 同时也需要开创在规模上能与复杂基因组的巨大尺寸相适应的方法。

有两种方法可以大规模地进行我们的实验: 自动串行处理是将 Sanger DNA 测序法改进以适合分析复杂基因组需要的巨大规模而采用的方法; 另一种方法是并行处理, 以微阵列为例, 它具有很多优点, 但它需要有一种简单过程, 以便于发展成为携带许多分立测试部位的装置。核酸从单独两条碱基序列互补的链形成双链, 正是这样一种过程。包含大量已知序列探针组的微阵列, 可以使得许多杂交反应在一个小型装置中并行地进行。

微阵列的基本设计有许多变化, 但几乎全部使用非渗透性的支持物作为基底, 其上固定探针样点。与基于分子杂交早期分析方法中使用的膜相比, 非渗透性支持物有许多优点。重要的是, 它使得在一个非渗透性的表面聚集许多细微部件成为可能。典型的微阵列结构的单元尺寸约为 $20 \sim 200 \mu\text{m}$, 因此数千个结构单元可以安放在标准的显微镜载玻片上。不仅如此, 由于分析物溶液不能透过表面, 因此杂交和漂洗过程要比可渗透支持物快得多。玻璃具有所希望的物理特性, 因此是最常用的支持物^[8]。与通常的印迹膜不同, 玻璃在润湿和干燥时不会变形。阵列的制造和读出过程中, 空间稳定性对于探针点的精确定位极为重要。

适合于阵列制备的印刷方法能够分辨到微米级, 并可用于传送预先合成的探针、cDNA 克隆、PCR 产物或合成的寡核苷酸, 或者是传送试剂用于原位合成探针。对大多数自行制备阵列的研究人员来说, 用预先合成的探针点样是唯一可使用的方法。原位方法有几家厂商在使用, 但这种方法目前花费昂贵, 大多数用户无法使用, 尤其是那些在大学实验室里工作的人。

* 2003 年 4 月 14 日, 美国联邦国家人类基因组研究项目负责人弗朗西斯·柯林斯博士在华盛顿宣布, 美、英、日、法、德和中国科学家经过 13 年努力共同绘制完成了人类基因组序列图, 人类基因组计划所有目标全部实现。——译者注

某些应用,如分析来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的基因表达,需要一套标准探针——涵盖全部基因产物的探针。一旦建立起一个最优探针集,采用它作为标准有许多优点。用预先合成的探针点样^[9]和照相平版印刷方法^[10]适合于生产许多在设计上相同的阵列;然而它们不适合一轮又一轮生产不同的阵列,这在一些研究计划中是必需的。另一方面,原位喷印合成^[11]和应用微镜阵列的光导制备^[12]不仅适合于重复生产一种设计的阵列,而且也适合于生产具有不同设计的阵列,只要简单改变从计算机到喷墨打印机或微镜阵列的指令集就能实现。

对所有制备方法而言,质量控制是一个主要的问题。很少有方法可以检查每个点上的序列及放置或合成探针的数量^[13, 14]。通过反复扩增增加探针数量可能会导致杂质序列的过度增加。由于该原因,化学合成探针可能会取代克隆和 PCR 产物。对选择性剪接作为调节基因功能机制重要性的逐步认识也显示,必须使用寡核苷酸按外显子逐个测量基因表达。原位合成产生的探针质量主要取决于耦联化学的效率。光合成方法每步的产率相对要低^[15],并限制了寡核苷酸的长度只能到 25 聚体。但是喷墨制备可以产生长度为 60 聚体的寡核苷酸^[11],这对大多数应用是足够的。样点质量是影响阵列性能的另一个因素。例如,点样针或者毛细管可能会产生形状和尺寸差异极大的点,使得寻找和积分杂交信号工作更加困难。

所有方法的应用都希望达到高灵敏度和特异性的效果,但这可能导致互相矛盾。短探针,大约 20 聚体,杂交信号相对低;较长的探针灵敏度较高,但可能特异性较低,因为它们可能会与序列相似度较低的靶分子相互作用。一项详细研究^[11]表明杂交条件对特异性和灵敏度的巨大影响,并强调了这两种需求之间的矛盾——最佳特异性需要的条件比给出最佳杂交结果条件的严格度更高。在一些应用中,必须使用短探针。例如,通过杂交检测单碱基错配,不可能使用长度大于约 20 个碱基的探针,较长的探针几乎显示不出完全匹配双链和错配双链在结果上的差异。

微阵列实验的巨大规模需要计算机的帮助。在实验开始时,设计阵列和引导制备过程需要计算机;计算机用于获取杂交的靶分子图像;将图像转换成对杂交程度的有效度量需要计算机;将杂交程度解释为对靶分子中互补序列数量有意义的测量需要计算机。已有软件包可用于处理该过程的所有方面。要求最高的计算任务是结果的解释,大量精力花在用统计学评价结果的质量和发现数据中模式的方法上,如应用聚类算法去发现基因调控的公共模式。一些商用软件包对大学用户来说过于昂贵,但类似从 EBI <http://www.ebi.ac.uk/microarray> 获取的公共域程序可以解决这一需求。

微阵列技术的成功推动了它的改进,如更加灵敏地检测 mRNA。反过来,这种要求也导致了需要对内在过程的机制进行更加深入的了解。作为回应,我们开始看到发表的研究工作越来越多是关于固定的探针结构和杂交机制,这对器件的性能十分重要。例如,原位合成可以形成非常高的寡核苷酸密度,以致表面上的分子之间会相互作用;空间位阻抑制了靶分子和探针的紧密靠近。空间效应可以通过长的手臂分子固定探针^[13, 16],或是减小它们的密度^[13]来得到缓解,并可使杂交效果增加 6~150 倍。高的探针密度对杂交动力学也有影响。典型的探针密度约为 1~10 pmol/mm²。这样一个直径为 100 μm 的典型样点中有 0.01~0.1 pmol (约 10¹⁰~10¹¹ 个分子) 探针。每个阵列点中探针的量通常远远超出溶液中它的靶分子数量;在一个典型的转录水平分析中,总共

约 1 μg RNA (约 1 pmol) 可能与含有 10 000 个点的阵列杂交, 其中共有约 1 nmol 探针。这直接导致位于样点上方的靶分子溶液中与样点探针互补的靶分子迅速耗尽, 反应是受扩散控制的, 搅拌对整个速度有巨大的影响^[17]。一个实用的推论是将靶分子稀释至可以有效搅拌的大容量后再加到阵列上, 这比使用不能搅拌的浓缩薄层要好。

微阵列技术已经在不相同的应用领域取得了许多重要的结果。转录物分析被用于发现外显子和基因, 从而对人类基因组序列草图进行注释^[18]。对基因组 DNA 分析, 检测到肿瘤中的扩增和缺失^[19, 20]。差异基因表达分析揭示了公共调节途径中的基因网络^[21, 22], 它显示了肿瘤之间不能为常规方法所区分的差异^[23, 24]。这些重要结果没有一项可以用其他分析方法如此简单或迅速地得到。

阵列平台是一个相对复杂的技术, 它将来自许多学科、充满活力、有共同兴趣的人集中在一起: 除了分子生物学家、遗传学家和计算机科学家以外, 还有工程师、材料科学家、数学家和化学家。未来将有新的方法和用途涌现出来。已经在使用这项技术的人要跟上发展的步伐; 而该领域的新进入者则需要得到帮助。这本书提供的最新信息, 将会引导用户及那些寻求改进该方法和开发新用途的人员继续努力实践。

Ed Southern

序言参考文献

1. Sanger F. and Coulson A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**: 441–448.
2. Sanger F., Coulson A.R., Friedmann T., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Fiddes J.C., Hutchison C.A., III, Slocombe P.M., and Smith M. 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174. *J. Mol. Biol.* **125**: 225–246.
3. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., and Young I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457–465.
4. Sanger F., Coulson A.R., Hong G.F., Hill D.F., and Petersen G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* **162**: 729–773.
5. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
6. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304–1351.
7. Staden R. 1977. Sequence data handling by computer. *Nucleic Acids Res.* **4**: 4037–4051.
8. Maskos U. and Southern E.M. 1992. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: A novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1679–1684.
9. Schena M., Shalon D., Davis R.W., and Brown P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467–470.
10. Lipshutz R.J., Fodor S.P., Gingeras T.R., and Lockhart D.J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet. (suppl.)* **21**: 20–24.
11. Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M., Ziman M., Schelter J.M., Meyer M.R., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y.D., Stephanian S.B., Cavet G., Walker W.L., West A., Coffey E., Shoemaker D.D., Stoughton R., Blanchard A.P., Friend S.H., and Linsley P.S. 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* **19**: 342–347.
12. Singh-Gasson S., Green R.D., Yue Y., Nelson C., Blattner F., Sussman M.R., and Cerrina F. 1999. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol.* **17**: 974–978.

13. Peterson A.W., Heaton R.J., and Georgiadis R.M. 2001. The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5163–5168.
14. Gray D.E., Case-Green S.C., Fell T.S., Dobson P.J., and Southern E.M. 1997. Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilized on a combinatorial array. *Langmuir* **13**: 2833–2842.
15. McCall G.H., Barone A.D., Diggelmann M., Fodor S.P.A., Gentalen E., and Ngo N. 1997. The efficiency of light directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 5081–5090.
16. Shchepinov M.S., Case-Green S.C., and Southern E.M. 1997. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1155–1161.
17. Ramakrishnan R., Dorris D., Lublinsky A., Nguyen A., Domanus M., Prokhorova A., Gieser L., Touma E., Lockner R., Tata M., Zhu X., Patterson M., Shippy R., Sendera T.J., and Mazumder A. 2002. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res.* **30**: e30.
18. Shoemaker D.D., Schadt E.E., Armour C.D., He Y.D., Garrett-Engle P., McDonagh P.D., Loerch P.M., Leonardson A., Lum P.Y., Cavet G., Wu L.F., Altschuler S.J., Edwards S., King J., Tsang J.S., Schimmack G., Schelter J.M., Koch J., Ziman M., Marton M.J., Li B., Cundiff P., Ward T., Castle J., Krolewski M., Meyer M.R., Mao M., Burchard J., Kidd M.J., Dai H., Phillips J.W., Linsley P.S., Stoughton R., Scherer S., and Boguski M.S. 2001. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature* **409**: 922–927.
19. Fritz B., Schubert F., Wrobel G., Schwaenen C., Wessendorf S., Nessling M., Korz C., Rieker R.J., Montgomery K., Kucherlapati R., Mechttersheimer G., Eils R., Joos S., and Lichter P. 2002. Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Res.* **62**: 2993–2998.
20. Hodgson G., Hager J.H., Volik S., Hariono S., Wernick M., Moore D., Nowak N., Albertson D.G., Pinkel D., Collins C., Hanahan D., and Gray J.W. 2001. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat. Genet.* **29**: 459–464.
21. Miki R., Kadota K., Bono H., Mizuno Y., Tomaru Y., Carninci P., Itoh M., Shibata K., Kawai J., Konno H., Watanabe S., Sato K., Tokusumi Y., Kikuchi N., Ishii Y., Hamaguchi Y., Nishizuka I., Goto H., Nitanda H., Satomi S., Yoshiki A., Kusakabe M., DeRisi J.L., Eisen M.B., Iyer V.R., Brown P.O., Muramatsu M., Shimada H., Okazaki Y., and Hayashizaki Y. 2001. Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 2199–2204.
22. Zhu G., Spellman P.T., Volpe T., Brown P.O., Botstein D., Davis T.N., and Futcher B. 2000. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* **406**: 90–94.
23. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Mmasese J.C., Brown P.O., Bostein D., Eystein Lonning P., and Borresen-Dale A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 10869–10874.
24. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson J., Jr., Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Staudt L.M., et al. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**: 503–511.

前言

当微阵列界就如何产生可靠结果所需的实验类型和分析方法这一问题趋于共识的时候，本书开始酝酿——这一情形令人回想起重组 DNA 研究的早期阶段。与早期克隆实验一样，点样微阵列技术的早期使用者发现很少有完美的实验方案，并且几乎没有什么商品化的试剂。在这个开拓时期，技术的发展大多数是由在个别大学实验室中工作、使用定制仪器和“自制”试剂的博士后和学生所推动的。我们特别幸运，能有许多这一年轻领域的领头人参与本书的写作。

我们的目标是出版一本实验指南，使得任何持之以恒和细心的人，若有适当的预算开支，就可以制造、使用和分析微阵列。在 2001 年 4 月，本书材料的汇编工作逐渐落实，当时 Jan Witkowski 慷慨地答应在冷泉港实验室 Banbury 中心主办一次微阵列会议。参会人员提供并分析了许多实验方案，现已成为本书的核心。在第二年里，最初的草案被重新优化和编辑，这项工作经常是针对这一领域的发展进行实质性的修改，并补充了关键实验方案，以及数量不断增加的微阵列设备和试剂供应商的信息。

用于平行分析基因表达的现代 DNA 微阵列，是生长在薄膜过滤膜上、细菌 cDNA 克隆网格状阵列的直接派生物。由于网格滤膜阵列仍是进行表达分析有效且经济的方法，因而书中的一些实验方案叙述了它的合成与使用。另一方面，本书大部分内容阐释了当前的两种主要技术：由斯坦福大学 Patrick Brown 实验室首创的在玻璃载玻片上的点样 DNA 微阵列和由 Affymetrix 公司制造的原位合成寡核苷酸阵列。尽管需要一定的努力和技巧，但点样微阵列是可以在大学实验室中制造的。与此相比，Affymetrix 阵列的使用更加接近“现成型”，它回避了制造阵列本身，并且使用试剂盒进行靶分子标记和杂交。因为这两种技术都有一些难点，本书通过详细的“疑难解答”部分，来讨论点样和 Affymetrix 阵列中遇到的常见问题。经慎重考虑，本书着重于使用 cDNA 阵列进行表达分析，因为这是迄今为止该技术的主要应用。为了便于将此分析方法用于极少量纯化细胞，本书介绍关于微分离和少量 RNA 体外扩增的实验方案。一旦技术得以发展，人类的智慧同样会赋予它新的用途，这当然也是微阵列领域的一个特点。使用微阵列检测基因组的变化——自然的和病源的——日益增多，本书用较多篇幅介绍了这类应用。微阵列产生大量必须由其他方法验证的数据，因此本书还包含了应用原位杂交和免疫组化对微阵列数据进行快速下游分析的实验方案。

发展有力的和用户友好的生物信息学工具来管理微阵列实验，挖掘与提取数据仍然是一个主要前沿。这些工具正处在迅速发展的时期。应用集中在非监督的数据聚类方法，如 Mike Fisen 的聚类程序和相似的程序，对于探索几乎没有其他信息可用于引导分析的微阵列数据来说，仍然非常有效。然而，基于有监督机器学习的方法正逐渐变得有力，并为未来发展提供了广阔的领域。倘若微阵列生物信息学发展迅速，那么没有一种关于该领域的描述会长期有效或者永不过时。本书中详细介绍了已经建立的技术，包括层次聚类法。然而，这部分的作者将大多数内容侧重于不易改变的基本概念，如获得

数值数据、实验设计和数据库的要求。

由于微阵列领域变化极为迅速，因此，将初步实验方案迅速出版成书很重要。我们向参编者表示感谢，他们非常慷慨地接受了紧迫的时间限制，并且很专业地完成了编写工作。这当中许多提供单独实验方案的科学家出现在拍摄于 Banbury 会议的照片中*。他们和其他许多人在本书编辑的不同时期提供了无法估价的、持续的技术建议。我们特别感谢 Vivek Mittal, Marcelo Bento Soares, Christoph Iller, Roland Toiler, Josh Dabna 和 Karin Schutze。Ed Southern 在某种意义上来说是这一领域的创始者，感谢他为本指南撰写了优美的序。

在本书制作中，我们得到了各种各样的支持。我们感谢 Beth Nickerson，他在本指南接近后期制作时加入，提供了许多无价的洞察性建议。尽管远在半个世界之遥，冷泉港实验室出版社的编辑和制作员工令人难忘的高效工作和投入，将出版过程的每个步骤变得极为轻松。我们尤其要感谢 David Crotty, Dorothy Brown, Susan Schaefer, Nora Rice, Mary Cozza, Sian Curtis, Denise Weiss 和 Kimberly LaVine，他们的成果得到了 Inez Silalano 和 Jan Argentine 的协调和强化，在似乎有无数的工作有待完成时，他们两人为大家提供了智慧、镇定的指导。我们感谢在 Peter MacCallum 癌症研究所的同事，当会议取消时他们给予宽容和理解，当无数次被告知“本书即将完成”时他们始终表现出坚信不疑。Linda Stevens 给予了出色的帮助，他负责重新安排会议和按常规管理我们的活动。

特别感谢 Kaaren Janssen，离开她就不可能有这本书。从最初组织 Banbury 会议，到编辑最后一个实验方案，她是最活跃的参加者之一，在整个过程中尽力保持欢乐、热情、不知疲倦和毫无怨言。我们特别幸运能和她一起工作，并享有她的友谊。最后，我们向我们的家庭表示衷心的感谢，在许多失去的夜晚和缺席的周末，他们给予了我们支持、鼓励和理解。

D. Bowtell

J. Sambrook

* Banbury 会议照片见封底。

原著作者名单

- Donna Albertson *Comprehensive Cancer Center, Cancer Research Institute, and Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco*
- Catherine A. Ball *Stanford University School of Medicine, Stanford, California*
- Bernd Becker *Universität Regensburg, Regensburg, Germany*
- Kevin G. Becker *DNA Array Unit, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland*
- Monique Bernsen *Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*
- Carolyn J.M. Best *Pathogenetics Unit, Laboratory of Pathology and Urologic Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*
- Tone Bjørnsen *University Hospital, Department of Pathology, Regionsykehuset Tromsø-RiTo, Tromsø, Norway*
- Michael Bittner *National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*
- Karl Brand *Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*
- Dieter Brocksch *Business Group Microscopy, Carl Zeiss, Göttingen, Germany*
- Renate Burgemeister *P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany*
- Christer Bush *University Hospital, Department of Pathology, Regionsykehuset Tromsø-RiTo, Tromsø, Norway*
- Ron Butow *University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas*
- Piero Carninci *Genome Science Laboratory, Riken Main Campus, Wako, Saitama, Japan*
- Settara Chandrasekharappa *National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*
- Chris Cheadle *DNA Array Unit, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland*
- Yidong Chen *National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*
- Geoffrey Childs *Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*
- Rodrigo F. Chuaqui *Pathogenetics Unit, Laboratory of Pathology and Urologic Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*
- Annette Clement-Sengewald *Frauenklinik der Ludwig Maximilians Universität, Munich, Germany*
- Suzanne Dee *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*
- Joseph DeRisi *University of California, San Francisco*
- Maximilian Diehn *Stanford University School of Medicine, Stanford, California*
- James Eberwine *University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia*
- Michael R. Emmert-Buck *Pathogenetics Unit, Laboratory of Pathology and Urologic Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*

Charles B. Epstein *Aventis Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts*

Jian-Bing Fan *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*

Gabriele Friedemann *P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany*

John W. Gillespie *Pathogenetics Unit, Laboratory of Pathology and Urologic Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*

Richard Glynn *Eos Biotechnology, South San Francisco, California*

Sean Grimmond *ARC-SRC for Functional and Applied Genomics, Gene Expression Profiling Facility, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland St Lucia, Australia*

Thomas Harris *Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*

Wolfgang Heckl *Institute of Crystallography, Ludwig Maximilians Universität, Munich, Germany*

Joel N. Hirschhorn *Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts; Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; Divisions of Genetics and Endocrinology, Children's Hospital, Boston, Massachusetts*

Andrew Holloway *Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Australia*

Galen Hostetter *Cancer Genetics Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Bi-Huei Hou *Carnegie Institute of Washington, Stanford, California*

Xiaohua Huang *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*

Trey Ideker *Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts*

Vishwanath Iyer *University of Texas, Austin*

Janet Estee Kacharina *University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia*

Olli-P. Kallioniemi *Cancer Genetics Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Sophie Katsabanis *Peter MacCallum Cancer Research Institute, Melbourne, Australia*

Javed Khan *Advanced Technology Center, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, NIH, Gaithersburg, Maryland*

Juha Kononen *Cancer Genetics Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Georgia Lahr *Academic-Hospital München-Harlaching, Munich, Germany*

Jerry Lee *Eos Biotechnology, South San Francisco, California*

Isabel M. Leiva *Pathogenetics Unit, Laboratory of Pathology and Urologic Oncology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*

Yin-Mei Lim *Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts*

Per Lindahl *Göteborg University, Department of Medical Biochemistry, Göteborg, Sweden*

Kerstin Lindblad-Toh *Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts*

Chih Long Liu *Biological and Biomedical Sciences, Division of Biomedical Sciences, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts*

Robert Lucito *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*

Tracy McIntosh *University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia*

Paolo Marciano *University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia*

Francesco M. Marincola *HLA and Immunogenetics Laboratory, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Aldo Massimi *Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*

Hajime Matsuzaki *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*

Annette Mayer *Institute of Anthropology and Human Genetics, Goethe University, Frankfurt/Main, Germany*

Damare Monte *Carnegie Institute of Washington, Stanford, California*

Maria Murphy *Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Australia*

Sven Nilsson *Göteborg University, Department of Medical Biochemistry, Göteborg, Sweden*

Norma J. Nowak *School of Medicine and Biomedical Sciences, State University of New York, Buffalo and Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York*

Sujatha Panavally *National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Nila Patil *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*

Daniel Pinkel *Comprehensive Cancer Center and Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco*

Jonathan R. Pollack *Stanford University School of Medicine, Stanford, California*

Virgil Rhodius *University of California, San Francisco*

Thomas Ryder *Affymetrix, Inc., Santa Clara, California*

Guido Sauter *Institute of Pathology, University of Basel, Switzerland*

Stefan J. Scheidl *Göteborg University, Department of Medical Biochemistry, Göteborg, Sweden*

Karin Schütze *P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany*

Richard Seagraves *Comprehensive Cancer Center, Cancer Research Institute, University of California, San Francisco*

Gavin Sherlock *Stanford University School of Medicine, Stanford, California*

Pamela Sklar *Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts; Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; Department of Psychiatry, Massachusetts General Hospital, Boston*

Antoine Snijders *Comprehensive Cancer Center, Cancer Research Institute, University of California, San Francisco*

Shauna Somerville *Carnegie Institute of Washington, Stanford, California*

Terry Speed *University of California, Berkeley*

Paul T. Spellman *University of California, Berkeley*

Monika Stich *Academic-Hospital München-Harlaching, Munich, Germany*

Wilhelm Stolz *Universität Regensburg, Regensburg, Germany*

Minoru Takemoto *Göteborg University, Department of Medical Biochemistry, Göteborg, Sweden*

Stefan Thalhammer *Institute of Crystallography, Ludwig Maximilians Universität, Munich, Germany*

Ed Tom *Eos Biotechnology, South San Francisco, California*

Melanie Trivett *Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Australia*

Marcory C.R.F. van Dijk *Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*

Thomas Vogt *Universität Regensburg, Regensburg, Germany*

Ena Wang *HLA and Immunogenetics Laboratory, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Jun S. Wei *Advanced Technology Center, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, NIH, Gaithersburg, Maryland*

Michael Wigler *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*

Dorian Willhite *Eos Biotechnology, South San Francisco, California*

William H. Wood III *DNA Array Unit, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland*

Yee Hwa Yang *University of California, Berkeley*

Suzanne Ybarra *Eos Biotechnology, South San Francisco, California*

目 录

译者序

原著序

前言

原著作者名单

第 1 章 点样微阵列探针的生成	1
导言	1
方案	4
1. cDNA 克隆集的复制和储存	4
• 附加方案：使用冷冻菌种	8
2. 来自细菌克隆集探针的 PCR 扩增	9
• 可选方案：作为扩增模板的质粒 DNA 的制备	16
3. PCR 产物的纯化	17
• 可选方案：用乙醇沉淀法纯化扩增产物	18
4. PCR 产物的观察和评估	19
• 附加方案：用 PicoGreen 进行定量	22
5. 点样法阵列备用 DNA 的重新悬浮及储存	23
6. 从酵母中分离和扩增用于阵列的材料	25
信息栏	30
克隆集	30
点样微阵列中使用的对照	36
基因组和 cDNA 文库中 T1 噬菌体的预防和检测	38
长链寡核苷酸的点样：替代用于表达分析的 cDNA 阵列	42
酵母探针	44
参考文献	49
因特网资源	51
第 2 章 玻璃微阵列的点样	53
导言	53
方案	62
1. 制备用于微阵列的聚 L-赖氨酸玻片	62
2. 在玻片上点样	64
3. 检查印刷玻片的质量	72
• 替代方案：利用标记的引物杂交	75
4. 鹅毛笔针的保养与清洗	77
信息栏	80

微阵列接触印刷使用的点样仪与点样针	80
用于点样的基底	86
参考文献	89
因特网资源	89
第3章 RNA 的表达分析	90
导言	91
PART I RNA 分离	92
导言	92
方案	97
1. 来自哺乳动物组织和细胞的总 RNA 的纯化	97
• 替代方案: 从 OCT 包埋的病理样品中提取 RNA	103
2. 用 FastPrep 仪器从组织中分离总 RNA	105
3. 用 TRIzol 从植物组织中分离总 RNA	106
4. 松树方法分离植物 RNA	109
5. 用 FastTrack 分离 poly (A) ⁺ RNA	111
6. 分离膜结合的多核糖体 RNA	115
7. 用批量制备色谱法分离 poly (A) ⁺ RNA	122
8. 用 CsCl 溶液超速离心分离 RNA	124
9. 酵母总 RNA 的纯化	127
• 替代方案: 用锁相胶纯化 RNA	130
10. <i>E. coli</i> RNA 的纯化	130
11. 从单细胞和少量组织中分离和扩增 RNA	134
• 替代方案: 组织切片中 RNA 的原位转录	145
• 附加方案: 切片的吖啶橙染色	147
12. RNA 通用参考集	148
PART II 标记和杂交	152
导言	152
方案	156
13. 用反转录酶进行 cDNA 第一链的荧光标记	156
• 替代方案: 荧光标记的 cDNA 的纯化和浓缩 (Microcon YM-30)	163
14. 用氨基-烯丙基染料对 DNA 进行间接荧光标记	164
15. 用于为筛选 DNA 微阵列筛选产生靶序列的 mRNA 制备物的扩增	170
• 附加方案: 标记 aRNA	178
16. 用于表达分析的少量 mRNA 的扩增	179
17. 用 <i>E. coli</i> DNA 聚合酶的 Klenow 片段标记第二链 DNA	188
• 替代方案: 用 <i>E. coli</i> DNA 聚合酶的 Klenow 片段标记基因组 DNA	191
18. 用生物素化核苷标记扩增 RNA 来与寡核苷酸阵列杂交	192

• 附加方案：生物素化 cRNA 的片段化	196
19. 未掺入的 Cy 染料的回收：使用 HPLC 重新纯化	197
20. 杂交和杂交后洗涤	201
• 附加方案：微阵列玻片的叠放	211
疑难解答指南	211
信息栏	225
Alexa 染料	225
细菌微阵列	226
用酚抽提蛋白质和 DNA	229
甲酰胺	230
采用胍盐抽提 RNA	232
动物细胞及组织的匀浆	233
抑制 RNase	234
哺乳动物、植物和细菌的 RNA	236
测量 DNA 染料标记的效率	238
鼠白血病病毒反转录酶	239
oligo-(dT) 纤维素	240
RNA 的定量	240
RNA 操作的特别注意事项	242
RNA 的保存和回收	243
参考文献	244
因特网资源	252
第 4 章 膜点样 cDNA 阵列	253
导言	253
PART I 膜阵列的制备和杂交	254
方案	255
1. 膜阵列的点样	255
2. RNA 的制备和标记	258
3. 靶分子与膜阵列的杂交	260
• 附加方案：靶分子的清除和膜的重新利用	262
PART II 数据的分析和解释	264
参考文献	265
因特网资源	266
第 5 章 组织显微切割	267
导言	267
PART I 徒手显微切割和激光俘获显微切割	273
导言	273
方案	275
1. 徒手显微切割	275

• 替代方案：冰冻组织样品的显微切割	278
2. 激光俘获显微切割	278
3. 免疫-LCM	283
4. 应用于表达分析的显微切割组织的处理	284
PART II 激光压力弹射	288
导言	288
方案	294
5. 准备载玻片用于为 LMPC 进行组织切片	294
6. 用于 LMPC 的石蜡包埋组织切片的制备	295
7. 用于 LMPC 的新鲜冰冻组织切片的制备	297
8. 使用 Zincfix 固定组织的 LPC 用于 mRNA 谱分析	298
9. 使用液体盖玻片保护组织样品	301
10. 激光显微切割和弹射后活细胞的分离	302
参考文献	306
因特网资源	309
第 6 章 基因组微阵列分析	310
导言	311
PART I 微阵列检测 DNA 拷贝数	311
导言	311
方案	314
1. cDNA 微阵列比较基因组杂交	314
2. 制备 BAC DNA 用于通过连接介导 PCR 进行 CGH	320
3. BAC 基因组微阵列 CGH	330
4. 基于微阵列的 DNA 拷贝数代表性分析：靶 DNA 制备	335
5. 基于微阵列的 DNA 拷贝数代表性分析：玻片制备及杂交	342
PART II 突变检测及 SNP 基因分型	347
导言	347
方案	349
6. SBE-标签阵列用于 SNP 基因分型	349
• 替代方案：为 SBE 进行多重扩增反应	364
7. Affymetrix 标签阵列用于 SBE SNP 基因分型	368
8. 高密度微阵列用于序列变异检测	376
9. SNP 阵列用于杂合性缺失分析	386
PART III 基于微阵列的 DNA-蛋白质相互作用检测：微阵列上的染色质免疫 沉淀	399
导言	399
方案	400
10. 应用阵列对酵母基因组上 DNA-蛋白质相互作用作图	400
11. 酵母基因组的 DNA-蛋白质相互作用作图：DNA 扩增及标记	405