

# 表达谱芯片常见问题



上海欧易生物 技术支持部

# 表达谱芯片常见问题

## 目 录

|   |   |
|---|---|
| 1. 什么是基因芯片？ .....   | 2 |
| 2. 表达谱芯片的实验目的？ .....  | 2 |
| 3. 欧易生物如何保证表达谱芯片服务的质量？ .....  | 2 |
| 4. 欧易生物是否获得服务认证？ .....  | 2 |
| 5. 欧易生物可以提供哪些物种的表达谱芯片检测服务？ .....  | 3 |
| 6. Agilent 和 Affymetrix 芯片的探针设计原则？ .....  | 3 |
| 7. 表达谱芯片检测的实验流程？ .....  | 4 |
| 8. 如何确保用来杂交的样品能够与芯片上的探针充分结合？ 是否存在过饱和问题？ .....   | 4 |
| 9. 表达谱芯片检测一个样品的 RNA 量？ .....  | 4 |
| 10. 组织、细胞或者血液分别需要多少用量？ 如何进行运输？ .....  | 4 |
| 11. 样品该如何收集与处理？ .....   | 4 |
| 12. 血液样本的取材有哪些注意事项？ .....   | 4 |
| 13. 生物学重复是必须的吗？ 一般要重复几次？ .....  | 4 |
| 14. 技术重复是必须的吗？ 一般应重复几次？ .....   | 5 |
| 15. 如何判断一个芯片检测结果的好坏？ .....  | 5 |
| 16. 芯片的变异系数（CV 值）怎么解释？ .....  | 5 |
| 17. 对于全基因组基因芯片，我们一般可以得到多少基因的表达信息？ .....   | 5 |
| 18. 表达谱芯片数据分析包含哪些内容？ .....  | 5 |
| 19. 欧易生物提供的表达谱芯片报告内容有哪些？ .....  | 5 |
| 20. 表达谱芯片与 qPCR array 和转录组测序的区别？ .....  | 6 |
| 21. 样品 RNA 线性放大是否会提高检出率？ .....  | 6 |
| 22. 通常大多数基因的长度在 1.5-2Kb 之间，有的甚至更长，但很多芯片在设计上采用 60-70mer 的 Oligo 探针来代表一条基因，请问它们能具有这样的代表性吗？ 设计这样的探针的原则是什么？ ..... | 7 |
| 23. 做了基因芯片后， 是否需要进行聚类分析？ .....  | 7 |
| 24. 客户选择的验证基因在芯片上差异不显著，即没有满足 $FC \geq 2$ , $P < 0.05$ 的筛选标准。 .....  | 7 |
| 25. 定量验证所用的样品和芯片检测的不一致，定量结果与芯片不一致。 .....  | 8 |
| 26. 做完表达谱芯片后，在众多的差异基因中如何确定后期研究目标？ .....   | 8 |
| 27. 后期数据分析是否可以无限次呢？ .....   | 8 |
| 28. mRNA 是否可以临床意义分析呢？ .....   | 8 |

# 表达谱芯片常见问题

## 1. 什么是基因芯片？

基因芯片 (Gene chip) 又称为 DNA 微阵列 (DNA microarray), 其基本原理是将众多的靶基因序列或寡聚核苷酸片段有序而高密度地排列在玻璃、硅、尼龙膜等固相载体上, 用标记好的待检测样本与之杂交, 并利用激光共聚焦显微扫描等技术对芯片上成千上万的杂交信号进行实时、灵敏而准确的检测, 辅以计算机统计分析从而得到样本的基因表达信息。目前基因芯片技术已广泛运用于生物学与医学的基础研究、疾病诊断、新药开发、环境保护等诸多方面。

## 2. 表达谱芯片的实验目的？

表达谱芯片是一种高通量检测技术, 用于在全基因组水平检测某生物学现象中所有基因的表达量变化, 进而发现变化明显的标志性基因。

## 3. 欧易生物如何保证表达谱芯片服务的质量？

**进口的配套试剂:** 所有的试剂都是进口的配套试剂, 充分保证实验的准确性和稳定性;

**完整的硬件系统:** 配备芯片检测所需的所有仪器, 包括杂交炉、扫描仪、2100 样品质控系统;

**专业的技术操作人员:** 八年表达谱芯片实验的操作经验; 专业的生物信息分析团队, 熟悉各种分析算法和软件;

**更高的服务标准:** 采取严格的质量标准、多重实验质控和完备的实验记录, 确保更高的成功率、更低的样品损失及实验失败风险, 并且客户可以参与整个芯片实验过程, 接受客户监督, 更加透明和可信;

**更个性化的生物信息分析服务:** 与客户充分互动, 提供更多个性化分析思路和分析方案;

**完善的后续验证支持:** 持续专注于 mRNA 的定量检测, 为上千位客户提供过相关服务;

**严谨的科学作风:** 尊重科学、尊重事实、务求严谨、绝不弄虚作假;

**优秀的服务理念:** 核心团队平均 10 年以上技术服务领域工作经验, 均具备良好的职业操守及服务客户理念。

## 4. 欧易生物是否获得服务认证？

欧易生物是 Agilent 和 Affymetrix 公司的官方认证服务商, 而且是国内近五年唯一获得 Agilent 官方认证的服务商。



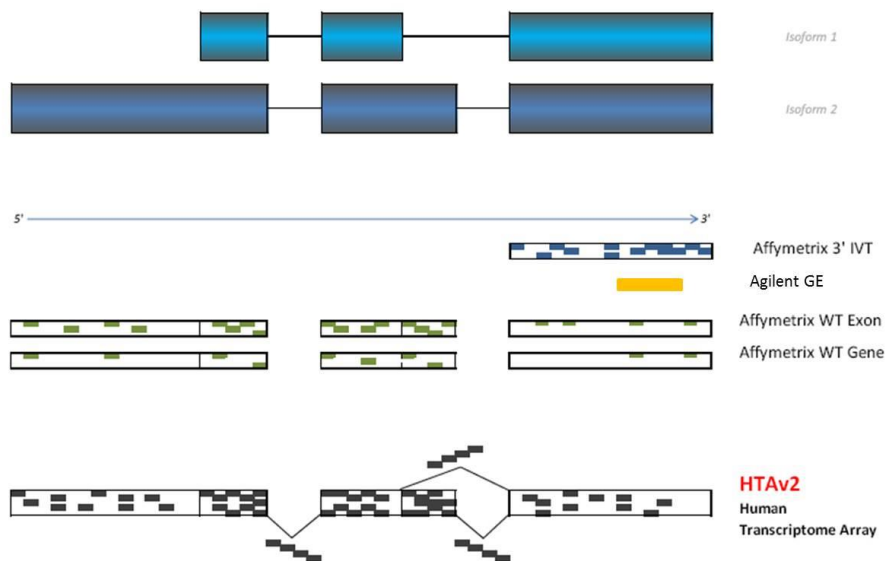
## 5. 欧易生物可以提供哪些物种的表达谱芯片检测服务？

目前欧易生物可以提供 Agilent 和 Affymetrix 所有目录产品芯片检测服务，非目录产品可以利用 Agilent 平台进行定制，具体物种如下：

| 表达谱芯片服务 |   |
|---------|---|
| 模式生物    | 人、大鼠、小鼠、线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、水稻、拟南芥、大肠杆菌、酵母   |
| 动物      | 人、大鼠、小鼠、线虫、果蝇、鸡、狗、猪、牛、家兔、绵羊、恒河猴、斑马鱼、疟蚊、非洲爪蟾、斑胸草雀、猫、豚鼠、狨猴、中国仓鼠卵巢细胞、马、豚鼠、猕猴、三文鱼 |
| 植物      | 水稻、拟南芥、小麦、大麦、玉米、棉花、葡萄、番茄、柑橘、甘蔗、苜蓿、杨树、大豆、烟草、芸苔                                 |
| 微生物     | 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母、绿脓杆菌、稻瘟病菌   |

芯片详细信息请见：<http://www.oebiotech.com/index.php?s=/Index/special>

## 6. Agilent 和 Affymetrix 芯片的探针设计原则？



**注：**Agilent 芯片主要针对基因的 3' 端进行探针设计（一般一个转录本一条探针），不同探针代表不同的转录本。Affymetrix 的 3' IVT 系列芯片是针对转录本的 3' 端进行探针设计，不过每条转录本是由平均 11 条探针组成。WT 系列芯片针对不同的外显子进行探针设计。HTA2.0 是 Affymetrix 最新开发的产品，除了外显子设计探针外（每个外显子都设计了 10 条探针），每个外显子之间的 junction 也有相应探针设计（每个已知的可变剪接位点设计 4 条探针），便于检测可变剪接。

## 7. 表达谱芯片检测的实验流程？

Agilent 表达谱芯片的检测流程详情请见：

<http://www.oebiotech.com/index.php?s=/Index/detail/id/75.html>

Affymetrix 表达谱芯片检测流程详情请见：

<http://www.oebiotech.com/index.php?s=/Index/detail/id/76.html>

## 8. 如何确保用来杂交的样品能够与芯片上的探针充分结合？是否存在过饱和问题？

相对于用来杂交的标记样品，固定在芯片上的对应杂交探针量远远多于标记样品，因此不用担心标记样品相对于固定探针是否存在过饱和问题。如果是双通道芯片，芯片上固定的探针也可以充分确保两种荧光标记的样品都能够完全结合到芯片对应的固定探针上。

## 9. 表达谱芯片检测一个样品的 RNA 量？

Agilent 表达谱芯片检测真核生物最低需要总 RNA 量为 200ng，原核生物则至少需要 5ug；Affymetrix 芯片需要的最低的总 RNA 量为 250ng。

## 10. 组织、细胞或者血液分别需要多少用量？如何进行运输？

组织量为 100mg，细胞量为  $10^6$ ，血液量为 2ml。非上海地区客户，如果提供血液样品，最好自行进行红细胞裂解，分离白细胞并加入 Trizol 后提供给我们。所有样品都采用干冰运输，偏远地区应保证干冰量足够。

## 11. 样品该如何收集与处理？

针对不同类型的样品收集与处理，我们专门整理了《样品采集操作指南》，客户可以自行在我们的官网下载（<http://www.oebiotech.com/index.php?s=/Index/download/id/0.html>）或者向当地的销售索取。

## 12. 血液样本的取材有哪些注意事项？

在诸多类型的样品取材中，我们发现血液白细胞样本收集过程中发生 RNA 降解的情况最常见，为此我们专门整理了《血液类样品处理办法》，客户可以自行在我们的官网下载（<http://www.oebiotech.com/index.php?s=/Index/download/id/0.html>）或者向当地的销售索取。

## 13. 生物学重复是必须的吗？一般要重复几次？

是的。一般应该重复 3 次以上，具体情况需要根据具体实验来决定。样本数量越多对于

统计筛选越有利，因为 p value 值与样本数量相关。

#### 14. 技术重复是必须的吗？一般应重复几次？

为增强说服力，可以进行技术重复。技术重复是为了避免产品不稳定或技术平台不稳定从而对数据可靠性产生影响。理想的情况下，技术重复应达到 3 次。但对于重复性非常好的实验，并不一定需要每个样品都要重复 3 次，可以随机选择部分样品进行技术重复。但是目前商品化芯片都具有良好的可重复性，相关系数  $R^2 > 0.95$  (MAQC 计划)，而且欧易生物通过了 Agilent 和 Affymetrix 两家公司的官方认证，保证了服务的准确性，一般情况下技术重复不是必须的，可以通过增加生物学重复的数量来提高结果的可靠性。

#### 15. 如何判断一个芯片检测结果的好坏？

从图象来看：主要看有无划痕，有无图象缺失，图象是否清晰，背景是否过高，点是否规则，大小是否均一，有无融点，拖尾等现象，图象均一性如何，是否存在边缘不清晰，阳性及阴性内参的情况等。

从数据来看：(1) 检出率是否异常；(2) 重复性如何（相关系数）；(3) 变异系数（CV 值）；(4) 与 qPCR 趋势的吻合程度；(5) 技术重复中差异基因的重复程度等。

#### 16. 芯片的变异系数（CV 值）怎么解释？

根据商品化芯片内部质控点的数据分别计算 CV 值，对其取中位数即代表芯片的变异系数，这是检测芯片实验好坏的重要指标，一般 CV 值都要求小于 15%。CV 值是标准偏差与平均值之比，用百分数表示，计算公式为： $CV = SD/Mean \times 100\%$ 。

#### 17. 对于全基因组基因芯片，我们一般可以得到多少基因的表达信息？

经典的分子生物学理论告诉我们，在生物体细胞的某个生长时相，往往只有 40% 的基因发生表达（活跃部位），其中还有部分是很低表达的基因，目前的常规检测手段都很难检测到。因此，如果是全基因组表达谱基因芯片，一般能检测出 20—40% 的基因有表达信息；如果是分类芯片，这一比例就不太好确认，与芯片上所涵盖的基因种类有关。

#### 18. 表达谱芯片数据分析包含哪些内容？

欧易生物提供的表达谱芯片的数据分析内容包括：芯片原始数据的提取、质控以及数据标准化、常规分析和高级分析。我们专门整理了表达谱芯片报告模板，里面详细介绍了我们所提供的数据分析内容，客户可向当地销售索取。

#### 19. 欧易生物提供的表达谱芯片报告内容有哪些？

欧易生物提供的表达谱芯片报告由实验数据、实验图像、实验文件和项目总结报告组成。实验数据文件夹包含了所有芯片的原始数据和分析数据以及详细的数据查看说明文件；实验图像文件夹包含了所有芯片的原始扫描图像，以及数据分析中的图像文件及详细的图片查看说明；实验文件文件夹包含了 RNA 质控报告，实验操作流程及常用软件；项目总结报告是这个项目的完整说明。



## 20. 表达谱芯片与 qPCR array 和转录组测序的区别？

|                      | 表达谱芯片                               | qPCR array                    | 转录组测序      |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------|
| 基因数                  | 上万个基因                               | 某个通路的 84/336 个关键基因            | 上万个基因      |
| 物种                   | 常见的研究物种                             | 主要是人、大小鼠、恒河猴，其他物种需要定制         | 理论上所有物种    |
| 是否需要 qPCR 验证         | 需要                                  | 不需要                           | 需要         |
| 能否发现新的基因             | 不能                                  | 不能                            | 理论上可以      |
| 研究可变剪切转录本            | 部分产品可以                              | 不能                            | 可以         |
| 实验周期                 | 20-25 个工作日                          | 25 个工作日                       | 60-65 个工作日 |
| 最低样品量<br>(total RNA) | Agilent: 200ng<br>Affymetrix: 250ng | 96 孔板: 1ug<br>384 孔板: 4*400ng | 5ug        |
| 所用仪器                 | 芯片扫描系统                              | qPCR 仪                        | 测序仪        |

## 21. 样品 RNA 线性放大是否会提高检出率？

样品经过线性放大后再标记杂交，会明显地提高检出率，主要还是把样本里原有低拷贝数的基因信息得以放大而提高检出率。尤其对植物材料而言，由于其次生代谢物比较多，还有多糖的影响，所以通常采用直接标记探针做杂交时，往往得到的结果都不甚理想，所以建议更应该做放大，间接标记然后再杂交。

## 22. 通常大多数基因的长度在 1.5-2Kb 之间，有的甚至更长，但很多芯片在设计上采用 60-70mer 的 Oligo 探针来代表一条基因，请问它们能具有这样的代表性吗？设计这样的探针的原则是什么？

从理论上讲，如果是单一的看一条基因的杂交控制，肯定是全长基因完整的杂交更具有特异性，但基因芯片技术是一种高通量技术手段，在一个体系内需要完成几万个基因的杂交反应，这时在考虑特异性的同时，还需要考虑同源基因竞争、杂交信号强度、 $T_m$  值区间大小等诸多问题。综合这些问题，专业技术人员通过大量的实验已经验证出，通过特定设计的 60-70mer 的 Oligo 探针完全可以在该体系内去特异性的代表一条基因（Nature Biotechnology • Volume 19 • April 2001 该文章的研究表明 60mer 寡核苷酸探针能达到最佳的检测特异性和灵敏度的平衡）。

公司在设计这种探针时通常采用如下原则：

- 1) 尽可能在靠近 3' 端 1.5Kb 内设计探针（原因和 RNA 的标记方法有关）；
- 2) 探针设计在 60-70 个碱基长度能保持杂交特异性和杂交信号强度的平衡；
- 3) 不同探针之间的  $T_m$  值相差不超过  $\pm 5^\circ\text{C}$ ；
- 4) 探针序列和其他基因同源性小于 70%；
- 5) 探针本身内部不能含有连续 7 个相同的碱基 PolyN。

## 23. 做了基因芯片后，是否需要聚类分析？

聚类分析的方法已经被广泛的应用在基因芯片的数据分析中。这种方法是把基因芯片上的每个基因看作一个独立的类，然后根据芯片多次产生的实验数据，计算出每两个基因之间的距离，把最为接近的两个基因合并，用一个新的类替换，该新类的值为此两基因的平均值，如此对其他基因作相同处理，然后用同样的方法进行下级处理，直至最终形成一个类，这样就能够使这些数据点形成一个家谱的树状结构，其中树枝的长度所表示的是两组数据的相似程度。因此进行聚类分析需要满足以下两个条件：1) 至少有 5 对以上的样本有了芯片实验的数据，样本数量越大，得到的聚类关系越准确；2) 进行聚类分析的样本应该有相同的对照样品。

## 24. 客户选择的验证基因在芯片上差异不显著，即没有满足 $FC \geq 2$ ， $P < 0.05$ 的筛选标准。

我们在给老师做芯片定量验证的时候，最好建议老师挑选的是差异显著的基因 ( $FC \geq 2$ ， $P < 0.05$ )，由于芯片这个工具本身的性质决定，对于差异显著的基因去做定量验证吻合度会比较高，而对差异不显著的基因准确性就要低一些。但我们往往只能保证芯片结果中差异显著基因的验证一致性，对于其他的基因的验证一致性，无法保证。当然，因为实验研究目的不同，有些老师比较关注那些在芯片上差异不显著的基因，当然这些基因也是值得去定量检测看看的，但是这个时候一定要告知老师，很有可能与芯片结果不一致，如果有不一致的情



况，建议以定量结果为准。有些老师验证了这些基因之后，发现和芯片不一致就开始质疑芯片的质量，其实这是客户走进了一种用芯片验证定量的认识误区。

## 25. 定量验证所用的样品和芯片检测的不一致，定量结果与芯片不一致。

如果是这种情况，那么定量验证结果和芯片不一致可能是因为样品本身的差异造成的。芯片筛选毕竟是针对少量样品检测的结果，如果要准确检测的话，是需要放大样品量进行验证的。

## 26. 做完表达谱芯片后，在众多的差异基因中如何确定后期研究目标？

一般情况下有几个原则可以参考：

- 1) 单纯从数据角度而言，FC 最大，P Value 最小可为后期研究目标；
- 2) 结合课题组的研究方向和进展，挑选自己研究相关的通路基因；
- 3) 至少在一组样本中，基因具有一定的表达量，即标准化信号值大于 8；
- 4) 结合其他科研工作者的研究论文，排除已研究透彻基因。

## 27. 后期数据分析是否可以无限次呢？

一般我们承诺在标准化报告出具后，还可免费帮助客户调整分析一次，客户只需提供分析要求的 word 文档即可（一定要附上合同号）。再次之后，如果客户还需要再次进行分析，需与本公司负责的客户工程师联系确认。

## 28. mRNA 是否可以临床意义分析呢？

可以分析的，不过属于个性化分析内容。需要您提供需要分析的 mRNA name 和 ID 等信息，以及需要分析的疾病类型（为避免错误，最好是英文名称）或疾病亚型。

联系我们:



公司总部：上海市浦东新区祖冲之路 1505 弄 138 号 6 楼

服务热线：4006-4008-26

欧易官网：[www.oebiotech.com](http://www.oebiotech.com)

市场联络邮箱：[market@oebiotech.com](mailto:market@oebiotech.com)

技术服务咨询邮箱：[service@oebiotech.com](mailto:service@oebiotech.com)

邮编：201210

微信：

