

TỔNG HỢP PHÂN TỬ cDNA GẮN CHẤT NHUỘM MÀU HUỖNH QUANG CYANINE CHO THÍ NGHIỆM MICROARRAY TỪ tRNA CỦA TẾ BÀO LU-1 DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA HOẠT CHẤT 2B2D

Đỗ Thị Thảo¹, Đỗ Thị Phương¹, Nguyễn Thị Nga¹, Nguyễn Thị Trang¹, Chi-Ying Huang²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu y học lâm sàng, Trường Đại học Quốc gia Yang-Ming, Đài Loan

TÓM TẮT

Là một kỹ thuật mới với khả năng nghiên cứu, phát hiện, giám sát và phân tích sự biểu hiện của hàng ngàn, thậm chí là cả hệ genome trong cùng một thí nghiệm duy nhất, microarray tỏ ra là một công cụ hữu hiệu giúp ích cho các nghiên cứu về ung thư học, đặc biệt là về mặt cơ chế phân tử. Tuy nhiên, microarray là một kỹ thuật phức tạp và đòi hỏi nhiều thiết bị hiện đại. Một trong những khâu quan trọng của kỹ thuật này là việc gắn kết chất nhuộm màu huỳnh quang cyanine với phân tử cDNA để phục vụ cho việc nhận biết sự sai khác trong mức độ biểu hiện gen của các mẫu nghiên cứu. Sử dụng hoạt chất tiềm năng chống ung thư 1-(5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-cromen-8-yl)-but-2-en-1-on (gọi tắt là 2B2D) và dòng tế bào ung thư phổi người LU-1 làm đối tượng nghiên cứu, chúng tôi đã tối ưu hóa điều kiện thu nhận và tinh sạch RNA tổng số để làm khuôn mẫu tổng hợp cDNA. Theo đó, điều kiện tối ưu để xử lý chất 2B2D trên tế bào LU-1 nhằm thu và tinh sạch RNA hiệu quả là ở nồng độ 0,5 µg/ml và 1 µg/ml trong khoảng thời gian 24 và 48 h. Các mẫu RNA thu được có độ tinh sạch cao với mẫu số 1 có hàm lượng cao nhất (57,71 µg). Với việc gắn kết chất nhuộm màu huỳnh quang, mẫu số 1 vẫn là mẫu giàu được nhiều phân tử Cy5 nhất. Tuy nhiên, các mẫu còn lại với Pmol ≥ 142 đều là cho thấy khả năng gắn kết tốt với các phân tử huỳnh quang Cyanine 3 và 5. Như vậy, chúng tôi đã gắn kết thành công các chất nhuộm màu huỳnh quang cyanine 3 và 5 vào các mẫu cDNA trong các điều kiện cụ thể để phục vụ cho các bước tiếp theo của kỹ thuật microarray.

Từ khóa: cDNA, cyanine, LU-1, *Mallotus apelta*, microarray, spectrophotometer

MỞ ĐẦU

Hoạt chất 1-(5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-cromen-8-yl)-but-2-en-1-on tìm thấy từ loài thực vật *Mallotus apelta* của Việt Nam đã được đăng ký bảo hộ sáng chế về cấu trúc hoá học mới cũng như về hoạt tính chống ung thư bởi Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hoạt chất này đã chứng minh khả năng phòng chữa ung thư *in vitro* hiệu quả và đang trong quá trình kiểm tra các hoạt tính được lý ở mức *in vivo* (Kiem *et al.*, 2004). Tuy nhiên, để hiểu rõ hơn về cơ chế tác động của hoạt chất này ở mức phân tử thì phải nhờ đến kỹ thuật microarray.

Kỹ thuật microarray là một kỹ thuật phức tạp, dựa trên cơ sở của Southern Blotting. Trong đó, các đoạn của phân tử DNA được gắn vào một giá đỡ nhất định (tấm nhựa, thủy tinh...) và được lai với các gen hoặc các đoạn DNA mẫu (http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray). Kỹ thuật cDNA microarray có nhiều tiện ích nhưng ưu điểm lớn nhất của nó là cho phép nghiên cứu, phát hiện, giám sát sự biểu hiện của hàng ngàn cho tới

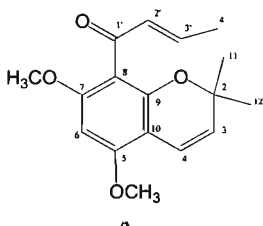
hàng chục ngàn gen khác nhau, thậm chí là toàn bộ hệ gen của một đối tượng sinh vật trong cùng một thí nghiệm duy nhất (Ross *et al.*, 2000; Scherf *et al.*, 2000; Weinstein *et al.*, 1997). Bên cạnh đó, công nghệ này cung cấp một mô hình rất đa dạng trong việc khai thác thông tin từ Dự án Genome Người (Human Genome Project) để đem lại lợi ích cho việc bảo vệ sức khỏe của con người, đặc biệt là đối với căn bệnh ung thư, một căn bệnh do đột biến các gen của tế bào (Cooper, 2001; Kim *et al.*, 2004).

Như vậy, việc sử dụng kỹ thuật microarray để tìm hiểu cơ chế tác động ở mức phân tử của hoạt chất 2B2D khi ức chế tế bào ung thư phát triển, và tăng sinh sẽ mang tính khả thi cao. Tuy nhiên, để thực hiện được các thí nghiệm cDNA microarray thì việc gắn kết thành công các chất nhuộm màu huỳnh quang cyanine vào phân tử cDNA là hết sức quan trọng và không dễ dàng.

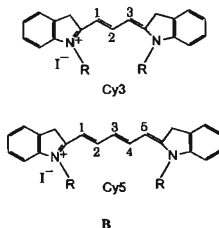
Hiện nay, cyanine 3 (Cy3) và cyanine 5 (Cy5) là hai chất nhuộm màu huỳnh quang phổ biến nhất được sử dụng cho kỹ thuật microarray (Grissom *et al.*, 2005; Randolph, Waggoner, 1997). Các bộ thống

lai, quét hình ảnh và đọc tín hiệu của các hàng thiết bị microarray trên thế giới đều được thiết kế dựa trên cơ sở là hai chất nhuộm huỳnh quang này.

Vì thế, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm để



nghiên cứu khả năng gắn kết Cy3 và Cy5 với mẫu cDNA thu được từ thí nghiệm xử lý tế bào ung thư phổi người LU-1 bằng hoạt chất 2B2D. Báo cáo dưới đây là các kết quả nghiên cứu của chúng tôi.



Hình 1. (A) Công thức hóa học của hoạt chất 2B2D; (B) Công thức cấu tạo chất nhuộm màu huỳnh quang Cy3 và Cy5.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Hoạt chất 2B2D do PGS. TS. Phan Văn Kiệm, Viện Hóa sinh biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Các chất huỳnh quang Cy3-dUTP và Cy5-dUTP được mua từ hãng GEHealthcare. Ngoài ra, các kit, hóa chất thông thường khác dùng trong sinh học phân tử như RNase-free water (DEPC treated), oligo dT primer (16- to 18-mer) at 1 µg/µl, 3 M Sodium Acetate, pH 5.2, 100% Ethanol, 70% Ethanol, Superscript II Reverse Transcriptase, 5X first strand buffer RNase A (4 mg/ml), RNase H (2 unit/µl), PCR CleanUp Kit (Qiagen), RNeasy® RNA Isolation kit (Qiagen)...

Đòng tế bào ung thư phổi người LU-1 do GS. J M Pezzuto, Trường Đại học Hawaii ở Hilo, Hoa Kỳ cung cấp.

Phương pháp

Xử lý tế bào LU-1 bằng hoạt chất 2B2D và xác định điều kiện tối ưu để thu nhận RNA

Tế bào LU-1 được nuôi cấy dưới dạng hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy DMEM có bổ sung 10% FBS, 1% PSF, 10% Sodium pyruvat (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ẩm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Lượng chất 2B2D đưa vào xử lý tế bào LU-1 được thử nghiệm ở 3 nồng độ gồm: 0,5 µg/ml; 1 µg/ml và

1,5 µg/ml. Một thí nghiệm đối chứng bằng DMSO 10% cũng được tiến hành song song để kiểm chứng độ sống sót của tế bào. Sau các thời điểm 6, 12, 24, 48 và 72 h, tiến hành thu hoạch tế bào. Tế bào sau đó được rửa sạch bằng đệm PBS pH = 7,0 và làm rời bằng Trypsin EDTA 0,01% trong 5 phút. Dừng phản ứng trypsin bằng 1 ml môi trường nuôi cấy và đem ly tâm trong vòng 1 phút ở 1000 v/phút. Tiến hành nhuộm tế bào bằng trypan blue để phát hiện tỷ lệ tế bào sống/chết và so sánh với đối chứng DMSO 10% để tìm điều kiện xử lý chất 2B2D tối ưu cho việc tách chiết RNA.

Tách chiết, tinh sạch và xác định nồng độ RNA tổng số

Mẫu phẩm tế bào LU-1 xử lý bằng chất 2B2D được sử dụng để tách chiết RNA tổng số. Việc tách chiết và tinh sạch RNA sử dụng RNeasy® RNA Isolation kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp theo, mẫu RNA được xác định độ tinh sạch và nồng độ bằng hệ thống Nanodrop ND-1000 version 3.3.0 Spectrophotometer (Thermo Scientific) cũng như bằng phương pháp điện di trên gel agarose.

Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số đồng thời gắn kết Cyanine

Do quá trình này liên quan đến các chất hiện màu huỳnh quang rất nhạy cảm với ánh sáng nên các bước thực hiện cũng như các phản ứng, dung dịch v.v. phải được làm trong tối. Đối với mỗi 10 - 20 µg RNA tổng số hoặc 0.1 - 0,5 µg tRNA, thành phần

của mỗi phản ứng sẽ gồm: (thực hiện ở 4°C hoặc trong đá) 8 µL 5X First Strand reaction buffer (Superscript II, Invitrogen); 1,5 µL AncT primer (5'-T20VN, 100 pmol/µL); 3 µL dNTP-dCTP (6.67 mM dATP, dGTP, dTTP, GE Healthcare); 1 µL 2 mM dCTP (GE Healthcare); 1 µL 1 mM Cyanine 3-dUTP hoặc Cyanine 5-dUTP (GE Healthcare); 4 µL 0.1 M DTT (Invitrogen); 20 µg RNA tổng số; Nuclease-free water tới 40 µL. Sau khi chuẩn bị hỗn hợp phản ứng, tiến hành ủ mẫu trên ở 65°C trong 5 minutes trong tối để làm biến tính RNA tổng số. Trước khi bổ sung enzyme, làm nguội mẫu ở 42°C trong 5 minutes trong tối. Thêm 2 µL reverse transcriptase (SuperScript II, Invitrogen) và tiếp tục ủ mẫu trong tối ở 42°C trong 2 h. Dừng phản ứng bằng cách thêm 4 µL 50mM EDTA (pH 8.0) và 2 µL 10 N NaOH. Tiếp tục ủ mẫu ở 65°C trong 20 phút. Trung hòa mẫu ở trên bằng cách thêm 4 µL 5M acetic acid. Các mẫu cDNA sau gắn kết được tinh sạch lại bằng Qiagen PCR CleanUp Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kiểm tra hiệu quả gắn kết Cy3 và Cy5 với phân tử cDNA

Điện di trên TAE agarose gel: 5 µl mẫu Cy5-cDNA được trộn với 5 µl 30 % (v/v) glycerol được đưa vào giếng điện di trên 1% (w/v) TAE agarose gel. Chất nhuộm Loading dye được đưa vào một giếng điện di khác để dễ phòng màu của Loading Dye sẽ ảnh hưởng đến việc phát màu huỳnh quang của Cy5. Quá trình điện di được thực hiện trong 45 phút với điện thế 90 V. Màu huỳnh quang đỏ của Cy5 (ở bước sóng 650 nm) được nhìn thấy bằng hệ thống quét Axon GenePix 4000b scanner trang bị phần mềm Gene Pix Pro 6.0.

Do hàm lượng cDNA được gắn Cy3 và Cy5 bằng hệ thống UV-visible spectrophotometer dựa trên nguyên lý các chất màu Cyanine được thiết kế

để phát ra ánh sáng huỳnh quang nhưng cũng có thể được phát hiện bằng việc hấp phụ ánh sáng nhìn thấy. Theo đó, Cy3 có ánh sáng huỳnh quang xanh (Green Fluorescence) và hấp phụ ánh sáng thường ở bước sóng 550 nm. Cy5 có ánh sáng huỳnh quang đỏ (Red Fluorescence) và hấp phụ ánh sáng thường ở bước sóng 650 nm. Do vậy, khi sử dụng hệ thống máy đọc quang phổ có thể xác định hiệu quả gắn kết Cy3 và Cy5 theo công thức $[Pmol\ Cy3(hoặc\ 5)/\mu l] = (A / E) \times V \times 10^6$. Trong đó: A là độ hấp phụ của Cy3 ở 550 nm hoặc của Cy5 ở 650 nm; E là hệ số triệt quang (extinction coefficient) của Cy3 là 150,000 và của Cy5 là 250,000; V là số µl mẫu đo.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định điều kiện tối ưu để xử lý chất 2B2D cho việc tách chiết RNA

Để xác định điều kiện xử lý chất tối ưu cho việc tách chiết RNA, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm ở các điều kiện khác nhau, đồng thời dựa vào giá trị IC₅₀ của thí nghiệm tính độc tế bào để tính lượng chất đưa vào cho phù hợp. Theo đó, các điều kiện thử nghiệm là: (i) Lượng chất 2B2D đưa vào xử lý tế bào ở 3 nồng độ gồm: 0,5 µg/ml; 1 µg/ml và 1,5 µg/ml. Một thí nghiệm đối chứng bằng DMSO 10% cũng được tiến hành song song để kiểm chứng độ sống sót của tế bào; (ii) Thời gian thu hoạch tế bào gồm: 6 h, 12 h, 24 h, 48 h và 72 h.

Sau các thời điểm thu hoạch ở trên, tế bào được rửa sạch bằng đệm PBS pH = 7,0, làm rời bằng Trypsin EDTA 0,01% trong 5 phút, ly tâm trong vòng 1 phút ở 1000 v/phút và nhuộm tế bào bằng trypan blue để phát hiện tỷ lệ tế bào sống/chết. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ tế bào sống/chết dưới các nồng độ thử chất 2B2D khác nhau.

Chất Thí nghiệm	Thí nghiệm									
	6 h		12 h		24 h		48 h		72 h	
	Tb sống/ chết	% sống sót	Tb sống/ chết	% sống sót	Tb sống/ chết	% sống sót	Tb sống/ chết	% sống sót	Tb sống/ chết	% sống sót
2B2D 0,5 µg	78/22	78	72/34	72	69/31	89	65/35	65	62/38	62
2B2D 1 µg	69/31	69	62/38	62	58/4	58	51/49	51	46/54	46
2B2D 1,5 µg	58/42	58	51/49	51	47/53	47	34/66	34	23/77	23
DMSO 0,5%	97/3	97	94/6	94	95/5	95	96/4	96	96/4	96

Như vậy, ở nồng độ thử chất 1,5 $\mu\text{g/ml}$ thì sau 48 h, tỷ lệ tế bào sống sót chỉ là 34% và sau 72 h là 23%. Chỉ số này quá thấp, lượng tế bào chết nhiều nên khả năng tách chiết và phân lập được lượng lớn RNA là khó khăn. Trong khi đó, ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ và 1 $\mu\text{g/ml}$, 2B2D đã ức chế được phần nào sự phát triển và gây chết tế bào ung thư nhưng lượng tế bào sống sót là tương đối lớn nên sẽ phù hợp để tách chiết RNA.

Về thời gian xử lý chất, chúng tôi nhận thấy khoảng thời gian 24 - 48 h là phù hợp. Nếu thu hoạch tế bào trước khoảng thời gian này thì tác động của hoạt chất chưa rõ ràng. Còn thu hoạch sau đó thì số tế bào chết nhiều cũng sẽ ảnh hưởng đến lượng RNA thu được.

Như vậy, điều kiện tối ưu để xử lý chất 2B2D trên tế bào LU-1 nhằm thu và tinh sạch RNA hiệu quả là ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ và 1 $\mu\text{g/ml}$ trong khoảng thời gian 24 và 48 h.

Kết quả tách chiết, tinh sạch và xác định nồng độ RNA

Để phục vụ cho thí nghiệm microarray thì phân tử RNA được sử dụng làm khuôn mẫu tổng hợp cDNA phải đảm bảo độ tinh sạch, nồng độ chuẩn và quan trọng nhất là không bị biến tính, đứt gãy. Vì thế, để đảm bảo thí nghiệm thành công, chúng tôi tiến hành xử lý chất 2B2D ở cả hai nồng độ là 0,5 $\mu\text{g/ml}$ và 1 $\mu\text{g/ml}$. Thời gian thu hoạch tế bào là 24 h và 48 h. Hai mẫu đối chứng DMSO cũng được thu hoạch ở hai thời điểm nói trên. Sau quá trình thu hoạch tế bào và tách chiết RNA theo phương pháp đã đề cập ở phần phương pháp với bộ kit RNAeasy mini kit của hãng Qiagen, chúng tôi đã tách chiết được RNA tổng số và tiến hành xác định hàm lượng cũng như độ tinh sạch. Kết quả như sau:

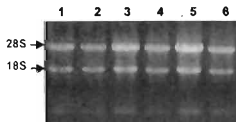
Xác định hàm lượng

Sáu mẫu RNA (4 mẫu xử lý chất 2B2D và 2 mẫu DMSO đối chứng) được kiểm tra hàm lượng cũng như độ tinh sạch bằng máy Nanodrop ND1000 của Thermo Scientific và bằng phương pháp chạy điện di trên gel agarose. Kết quả được trình bày ở hình 2.

Kết quả trên cho thấy, cả 6 mẫu thu được đều có hàm lượng RNA cao với độ tinh sạch tốt (hệ số A260/A80 đều lớn hơn 2). Trong đó, mẫu số 1 (2B2D 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ở 24 h) có hàm lượng có hàm lượng RNA cao nhất là 57,71 μg (1923,57 $\text{ng}/\mu\text{l}$ x 30

μl). Mẫu số 3 (DMSO 0,1% ở 24 h) có hàm lượng RNA thấp nhất là 35,54 μg (1184,86 $\text{ng}/\mu\text{l}$ x 30 μl).

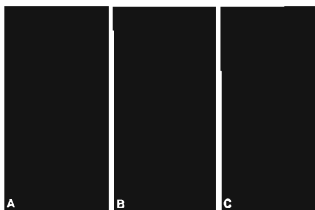
Kết quả điện di cũng cho thấy các mẫu RNA thu được có độ tinh sạch cao, ít bị phân hủy trong quá trình tách chiết. Như vậy, các mẫu RNA tách chiết được đủ điều kiện về hàm lượng và độ tinh sạch để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Kết quả điện di các mẫu RNA tinh sạch trên gel agarose

Kết quả tổng hợp cDNA và gắn chất hiện màu huỳnh quang

Chúng tôi đã tiến hành bố trí gắn chất hiện màu huỳnh quang vào các mẫu thí nghiệm như sau: (i) Mẫu tế bào đối chứng xử lý bằng DMSO 10% (sau 24h và sau 48 h) được gắn Cyanine 3-dCTP; (ii) Mẫu tế bào xử lý chất 2B2D (2B2D 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 2B2D 1 $\mu\text{g/ml}$ sau 24 h và sau 48 h) được gắn Cyanine 5-dCTP.



Hình 3. A. Mẫu xử lý 2B2B sau 24 h được gắn với Cy5. B. Mẫu xử lý 2B2B sau 48 h được gắn với Cy5. C. Mẫu 2B2B sau 48 h không gắn với Cyanine

Sau quá trình gắn chất hiện màu huỳnh quang Cy3 vào mẫu đối chứng và Cy5 vào các mẫu thí nghiệm theo đúng quy trình chuẩn hóa của nhà sản

xuất như đã nêu ở phần phương pháp, chúng tôi tiến hành kiểm tra chất lượng của quá trình gắn kết này bằng phương pháp điện di và đo hàm lượng màu bằng máy quang phổ như đã trình bày ở phần phương pháp.

Qua quá trình điện di phát hiện huỳnh quang trên 1% (w/v) TAE agarose gel, chúng tôi nhận thấy mẫu cDNA của chúng tôi đã được gắn kết thành công với chất nhuộm màu huỳnh quang. Mẫu không được gắn với cyanine đã cho kết quả âm tính (Hình 3). Tuy nhiên, Cy5 được phát hiện tốt bằng biện pháp này nhưng Cy3 thì không cho thấy hình ảnh rõ ràng. Vì vậy, chúng tôi đã sử

dụng thêm phương pháp định lượng màu bằng hệ thống quang phổ.

Mẫu số 1 (2B2D 0,5 µg/ml ở 24 h) vẫn là mẫu gắn được nhiều phân tử Cy5 nhất. Tuy nhiên, các mẫu còn lại với Pmol ≥ 142 đều là cho thấy khả năng gắn kết tốt với các phân tử huỳnh quang Cyanine 3 và 5 bởi theo nhiều tác giả với Pmol > 70 thì mẫu cDNA được xem là phù hợp để phục vụ cho thí nghiệm Microarray sau này (Grissom *et al.*, 2005; Sterrenburg *et al.*, 2002). Kết quả trên cho thấy qui trình tổng hợp cDNA gắn huỳnh quang của chúng tôi là phù hợp, các mẫu cDNA đủ điều kiện để thực hiện quá trình lai với các chip Microarray.

Bảng 2. Kết quả đo hàm lượng huỳnh quang bằng hệ thống UV-visible spectrophotometer.

	Cy3 (550 nm)			Cy5 (650 nm)		
	DMSO (24 h)	DMSO (48 h)	2B2D (0,5 µg/ml/24 h)	2B2D (0,5 µg/ml/48 h)	2B2D (1 µg/ml/24 h)	2B2D (1 µg/ml/24 h)
Hệ số A	0,0852	0,0876	0,162	0,154	0,142	0,143
Hệ số E	150.000	150.000	250.000	250.000	250.000	250.000
V	50	50	50	50	50	50
P mol	142	146	162	154	142	143

KẾT LUẬN

Với các kết quả thu được chúng tôi nhận định rằng điều kiện tối ưu để thu nhận RNA là xử lý hoạt chất 2B2D ở nồng độ từ 0,5 - 1 µg/ml tại thời điểm 24h và 48h. Với các điều kiện thí nghiệm đã nêu ra, chúng tôi đã tổng hợp và gắn kết thành công các mẫu cDNA với các chất màu huỳnh quang Cy3 và Cy5 phục vụ cho thí nghiệm microarray.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn tới GS. John M Pezzuto, trường đại học Hawaii, đã cung cấp dòng tế bào LU-1, tới PGS. TS. Phan Văn Kiệm, Viện Hóa sinh biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cung cấp hoạt chất 2B2D để sử dụng trong nghiên cứu. Công trình nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài nghiên cứu CS09_2 cấp Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cooper CS (2001) Applications of microarray technology in breast cancer research. *Breast Cancer Res* 3: 158-175.

Grissom SF, Lobenhofer EK, Tucker CJ (2005) A qualitative assessment of direct-labeled cDNA products prior to microarray analysis. *BMC Genomics* 6:36

Kiem PV, Minh CV, Huong HT, Nam PH, Lee JJ, Kim YH (2004) Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. *Arch Pharm Res* 27(11): 1109-1113.

Kim U, Kang HC, Park JG (2004) Microarray applications in cancer research. *Cancer Res Treat* 36(4): 207-213.

Randolph JB, Waggoner AS (1997) Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucl Acids Res* 25(14) 14 2923-2929.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Rijn MV, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JCF, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Bostein D, Brown PO (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24: 227-235.

Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrew DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sauvillie EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24: 236-244.

Sterrenburg E, Turk R, Boer JM, Ommen G B, Dunnen J T