

原位 PCR 技术及其应用前景*

马 琦 张锡元 徐耀先

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 原位 PCR 是分子生物学领域中一种崭新的技术, 它结合了 PCR 技术和原位杂交技术的优点。该文介绍了原位 PCR 技术的起源、发展及方法学, 并简要描述了该技术的应用现状及前景。

关键词 原位 PCR, 原位杂交, 聚合酶链反应

原位 PCR 是直接在细胞或组织材料标本上原位扩增目的 DNA 或 RNA 片段, 并在原位检测其扩增产物的技术。它兼有 PCR 及原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 技术二者的优越性: 既可以同时获得组织及细胞的形态结构信息与分子信息, 一次同时进行定性、定位及相对定量分析, 又具有比原位杂交更好的敏感性与专一性。

1 原位 PCR 技术研究现状

对原位 PCR 技术的探讨开始于 80 年代末和 90 年代初。当时一些科技工作者成功地直接使用生物细胞或组织进行 PCR 反应, 如 Mercier^[1]直接用全血样品做 PCR。但其目的在于简化 PCR 样品的准备工作, 尚未做到在组织细胞内的原位进行特异 DNA 片段的扩增与检测, 与使用提纯的 DNA 模板进行的溶液 PCR 并无本质区别。1989 年, Koch 等^[2]发展了一种引物引导的原位标记法 (*primed in situ* labeling, PRINS) 以进行特异 DNA 片段的定位分析。PRINS 可以看作是原位 PCR 的先导。但它使用的酶是 Klenow 片段, 且只进行一次原位延伸, 与真正意义上的原位 PCR 尚存在一定的距离。1990 年, Hasse 等^[3]首先报道了使用 Taq 酶的原位 PCR, 并以之检测出了 SCP (sheep choroid plexus) 细胞中所感染的 visna 病毒, 且其检测灵敏度较直接进行原位杂交要高 300 倍。从此, 原位 PCR 技术受到

众多学者特别是病理学家的重视, 并在美国 Perkin-Elmer 等著名大公司的推动下, 日益走向成熟与实用。

原位 PCR 技术建立以来, 研究主要集中于检测细胞中的外源 DNA 或 RNA 分子。原位 PCR 在检测组织细胞中 I 型艾滋病毒 (human immunodeficiency virus type-I, HIV-1)^[4-6]、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)^[7]、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)^[8] 和人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV)^[9] 等多种人类病毒方面都取得了成功, 不仅其灵敏度显著高于分子原位杂交, 而且使人们对病毒在组织细胞中的发生与分布情况都有了更详细深入的了解。尤其是当病毒处于潜伏期, 或者拷贝数很少, 其他方法 (包括原位杂交) 还难于检测时, 原位 PCR 更显示出其优越性。这使我们在跟踪病毒在细胞中的发展、细胞病变过程以及探索病毒与宿主的关系方面又有了一个有力的手段。目前, 这个领域的研究报告正在迅速增多。

对于细胞本身基因组 DNA 与 RNA 的原位 PCR, 也有学者在不断探索。最近, Pestaner 等^[10]使用根据野生型 P₅₃ 抑癌基因第五外显子 (exon5) 顺序设计的一对引物, 对膀胱的正常及不同程度癌变细胞档案标本进行原

* 国家自然科学基金资助 (39270394)。

收稿日期: 1996-01-08, 修回日期: 1996-05-28

位 PCR 检测, 可以分辨出未癌变及开始癌变的细胞. 此外, 在以原位 PCR 技术检测细胞 EGF 受体的 mRNA 表达^[11]及杂交瘤细胞和肿瘤细胞染色体易位^[7]等方面都取得了很好的结果.

1994 年, Troyer 等^[12]利用 DISC-PCR (direct *in situ* single copy PCR) 成功地将猪 α -干扰素基因 (porcine alpha interferon gene) 的一个短片段定位于猪的 1 号染色体的长臂上, 表明了原位 PCR 技术在基因染色体定位方面的应用前景.

我们实验室从 1993 年开展原位 PCR 技术

研究以来, 对这一新的技术方法作了较全面的比较研究, 并成功地在人外周血细胞及培养细胞中进行了 Y 染色体特异重复序列及单拷贝序列的扩增及检测^[13,14].

2 原位 PCR 技术的方法学

原位 PCR 既可以用于扩增 DNA, 也可以用于扩增 RNA. 后者称为反转录原位 PCR (RT-ISPCR). 在进行 RT-ISPCR 之前, 要先用 DNase 除去原有的 DNA, 并进行原位反转录获得 cDNA 后再进行原位 PCR. 原位 PCR 技术的简要操作流程见图 1.



图 1 原位 PCR 技术的简要操作流程

2.1 原位 PCR 的设备

利用现有的 PCR 仪, 或用水浴锅手工操作即可进行原位 PCR. 操作的重点在于如何形成一个密闭的反应空间. 方法多种多样, 如对于切片可以利用指甲油封片^[7,15,16], 或切碎玻片置于小离心管 (tube) 中^[11]. 而对于细胞悬液则与普通溶液 PCR 没有什么区别. 目前, 已经有了专门用于原位 PCR 的仪器系统, 但价格十分昂贵.

2.2 原位 PCR 的标记物

原位 PCR 多采用非放射性标记物, 如地高辛、生物素、5-溴-脱氧尿嘧啶 (BrdU)^[14]或荧光分子, 亦有采用放射性同位素标记^[3]. 采用标记物的目的, 是为了把扩增信号通过一定的处理转化为材料上的直接视觉信号. 由于标记 dNTP 掺入方法的不同, PCR 技术可分为直接原位 PCR (direct *in situ* PCR) 与间接

原位 PCR (indirect *in situ* PCR) 或称为 PCR 原位杂交 (PCR *in situ* hybridization)^[7]. 前者是在 PCR 反应过程中, 标记 dNTP 直接掺入 PCR 产物, 反应结束后直接用于免疫化学、荧光或放射自显影检测. 后者则是在 PCR 反应后, 以相应的标记探针进行原位杂交, 然后检测杂交信号. 比较而言, 前者操作简便, 但较易出现假阳性结果. 而后者虽操作较为繁琐, 但其特异性大为提高^[7,17].

2.3 原位 PCR 的材料、样品制备和预处理

2.3.1 原位 PCR 的材料来源很广泛, 主要分为两类: a. 细胞: 用于原位 PCR 的细胞材料可以是培养细胞、人外周血细胞和精液等. 用细胞材料进行原位 PCR, 主要有两种方式: 一是细胞悬液方式, 即将细胞悬浮于 PCR 反应体系中进行反应, 之后或通过离心或滴片使之贴附于玻片上进一步检测^[3,15], 或直接以

流式细胞光度计进行分离与统计分析^[7]. 另一种方式则是细胞制片(如滴片或细胞团块的冰冻切片), 扩增、检测均于玻片上进行^[11,15]. b. 组织: 人或动物组织的普通石蜡切片或冰冻切片, 切片以 6~8 μm 较为合适. 玻片应硅烷化或以多聚赖氨酸处理, 以增强材料的贴附性, 防止脱片. 石蜡切片需经二甲苯脱蜡.

2.3.2 材料的固定: 固定剂的选择以及固定条件的确定十分关键. 对于 DNA 的原位 PCR, 交联型(crosslinking)固定剂(如中性甲醛、多聚甲醛等)较为适宜^[15], 其原理可能在于该类固定剂使细胞内大分子形成交联网络, 可以较好地原位保留扩增产物. 用某些固定剂如 Bouin's、Trump's 以及含氯化汞组分的固定液固定的材料则不适于进行原位 PCR. 有一种新的固定剂 STFTM 能较好地保留 RNA, 适用于 RNA 的原位 PCR. 而固定条件的确定, 往往决定着能否有效保留适宜于扩增的核酸模板. 由于材料及固定液的不同, 固定条件亦各不相同. 某些保存较久的固定材料和已作过病检的材料标本也可以用于作原位 PCR^[10].

2.3.3 材料的通透预处理: 对于不同的材料, 此步骤亦有较大的差异. 一般而言, 组织切片固定后均需用蛋白酶或去垢剂(Triton、NP-40 和 Tween20 等)预处理^[9,7,10,16]. 对于细胞材料, 一般不经此步处理或者仅用去垢剂处理后即可应用于原位 PCR, 很少采取蛋白酶处理的方式^[15,18]. 预处理的目的在于消除 PCR 反应组分进入细胞所遇到的空间障碍. 其具体作用可能有二: 一是在细胞的外壁上形成一些通道; 二是可能可以部分地去除 DNA 或 RNA 的结合蛋白, 如组蛋白等. 预处理的程度很重要. 通透不足, PCR 反应组分难以充分接触模板, 会导致 PCR 困难. 但处理过度, 则会引起细胞形态和组织结构的破坏, 甚至于脱片; 并会导致 PCR 产物扩散, 使之无法原位存留. 通过改变处理浓度、时间和温度等条件, 可以较好地控制处理的分寸.

2.4 原位 PCR 反应体系

原位 PCR 体系较之一般的溶液 PCR 有些改变, 如 Mg^{2+} 和 Taq 酶的浓度一般要增加一至数倍. 反应中的变性、退火和延伸时间需适当延长. 这可能是由于原位 PCR 的特殊性, 如分子空间障碍、细胞或组织样品对 PCR 反应组分的吸附以及可能存在的某些抑制因素等. 如果不相应地改变这些条件, PCR 反应就难以进行.

2.5 原位 PCR 的反应条件

对于原位 PCR, 热启动(hot-start)是必要的^[9,8,16]. 与溶液 PCR 相似, 它可以显著降低臆象的发生. Nuovo 等认为在进行单拷贝模板的单引物对原位 PCR 时, 必须采用热启动才能获得好的结果. 此外有研究证明, 在直接原位 PCR 中假阳性结果的产生与循环次数过多有关, 故而有必要限制 PCR 的循环次数^[7]. 而且对于 RT-ISPCR, 循环次数过多时, 残存的基因组 DNA 亦可能引起假阳性信号^[11].

2.6 原位 PCR 的后处理及结果检测

一些研究在 PCR 后对材料进行后固定^[3,7], 但多数忽略此步骤. Nuovo 等^[9]认为后固定对减轻产物扩散并无明显效果.

由于标记方法、材料及研究目的不同, 检测方法亦不同. 如前所述, 间接原位 PCR 需经原位杂交后方可用于检测. 对于采用非放射性标记进行原位 PCR 后的样品, 可以通过相应的免疫组化显色后镜检(地高辛、生物素及 BrdU 标记), 或直接荧光显微镜检测, 以及用流式细胞光度计进行悬浮细胞的统计分析(荧光标记).

2.7 影响原位 PCR 结果分析的几个问题

2.7.1 假阳性的问题: 一些研究者认为在位 PCR, 特别是直接原位 PCR 中假阳性是普遍的; 而另一些研究却显示这种假阳性问题并不突出^[19]. 为了增强结果的可靠性, 采用多种对照是必要的. 据分析, 在直接原位 PCR 中的假阳性为聚合酶浓度及循环次数依赖性, 对照中不加引物可减少但不能根除假阳性结果

的出现^[7]. 一些研究认为这可能是由 Taq 酶引起的 DNA 修复或由于自身 DNA 片段引导的扩增导致了标记 dNTP 的非特异性掺入. 间接原位 PCR 所采用的探针与一般的原位杂交方法相似. 使用与扩增产物内部片段互补的寡聚核苷酸探针可最大程度地避免探针与非特异性扩增产物以及引物二聚体等非目的核酸片段杂交而导致的假阳性信号^[15].

2.7.2 污染的影响: 不同的小组在这方面的研究结果也显示出分歧. 一般认为, 原位 PCR 由于需要将扩增信号与细胞或组织的结构信息相联系, 污染这一溶液 PCR 中的大问题相对而言较为次要. Embleton 等^[18]的研究显示, 溶液中的扩增片段没有扩散至细胞内并在胞内进一步扩增形成信号. 但 Long 等^[7]的研究却表明, 不存在目的核酸片段的阴性对照细胞置于含有已扩增片段的反应体系中进行 PCR, 30 循环后在细胞内产生了信号斑点, 且该现象随扩增片段分子量减小而显著增加. 因此, 避免污染仍是较为重要的.

2.7.3 扩增片段的长度与实验的成功之间亦有一定联系: 片段过小, 则较易于扩散, 不利于产物的原位存留^[3]; 片段过大, 则会引起扩增困难. 地高辛或生物素标记 dNTP 的掺入会导致扩增分子体积的扩大, 使之易于形成团块, 因此可以显著地降低小分子扩增产物的扩散^[7]. 另外, 为了解决扩增片段较小引起扩散的问题, 开始有些研究者采用多重引物对 (multiple primer pairs) 以产生大片段产物^[3]. 另一些研究则认为组织切片的原位 PCR 应使用多重引物对, 而对于细胞悬液及细胞制片采用单引物对即可^[7]. 后来, 采用单引物对在组织切片上取得成功的研究报道越来越多^[10,16], 从而认为多重引物对的使用并非必要^[11]. 同时亦有一些研究者认为, 是片段的扩增程度而非片段大小决定着扩增产物原位存留的效果^[9].

2.7.4 非放射性标记物浓度与免疫显色信号强度的关系: 我们的研究表明原位 PCR 中 Dig-11-dUTP 与 dNTP 中 dTTP 浓度的最适比

例为 1:20. 提高 Dig-11-dUTP 所占的比例对最后的信号强度并无明显影响; 而在用 BrdU 作为标记物时则明显不同, 细胞中免疫显色信号的强度是随着 BrdU 浓度的提高而增强, 成近似的正比关系. 这种不同效果产生的原因可能是 BrdU 与 dTTP 的分子大小很接近, 它的掺入对 PCR 的顺利进行影响不大; 而 Dig-11-dUTP 分子明显大于它要取代的 dTTP, 过多的掺入导致更大的空间障碍, 反而不利于 PCR 产物的合成, 免疫显色信号强度也就不能相应增强.

3 原位 PCR 的应用前景

由于原位 PCR 的独特优点, 在检测外源病毒, 尤其是低拷贝数病毒在人和动物体内的传播与分布; 检测低拷贝数基因组 DNA; 研究细胞自身基因或病毒基因的表达; 癌变的早期检测及某些遗传病的检测以及在了解病理表现与基因组的点突变等之间的内在联系上; 在细胞水平上跟踪疾病的发展和评价治疗效果; 在基因定位和法医学等相关学科领域中, 它都有着巨大的应用潜力. 结合荧光标记的原位 PCR 技术与流式细胞光度术, 还可以在大量细胞中检测并分离极少量的病变细胞 (癌变或病毒感染).

美国的 PCR 技术专利持有者 Perkin-Elmer 公司对原位 PCR 技术是这样评价的: “原位 PCR 是继 PCR 技术发明以来, 分子生物学技术上又一个革命性的突破.” 原位 PCR 的实用化及其进一步完善成熟, 将对分子生物学、细胞生物学、病理学和诊断学等学科领域产生深远的影响.

参 考 文 献

- 1 Mercier B, Gaucher C, Feugeas O *et al.* Nucleic Acids Reserch, 1990; **18**: 5908
- 2 Koch J, Kolvraa S, Kirsten B *et al.* Chromosoma, 1989; **98**: 259
- 3 Hasse A, Retzel E, Stakus K. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 4971
- 4 Nuovo G, Margiotta M, MacConnell P *et al.* Diagn Mol

- Pathol, 1992; 1 (2): 98
- 5 Bagasra O, Hauptman S, Lischner H *et al.* N Engl J Med, 1992; 326: 1385
- 6 Patterson B, Till M, Otto P *et al.* Science Wash, 1993; 260: 976
- 7 Long A, Komminoth P, Lee E *et al.* Histochemistry, 1993; 99: 151
- 8 Nuovo G, Lidonnici K, MacConnell P *et al.* Am J Surg Pathol, 1993; 17: 683
- 9 Nuovo G, MacConnell P, Forde A *et al.* Am J Pathol, 1991; 139: 847
- 10 Pestaner J, Bibbo M, Bobroski L *et al.* Acta Cytol, 1994; 38: 676
- 11 Heniford B, Shum-Siu A, Leonberger M *et al.* Nucleic Acids Research, 1993; 21: 3159
- 12 Troyer D, Goad D, Xie H. Cytogenet Cell Genet, 1994; 67: 199
- 13 Zhang X, Jiang H, Li L *et al.* Science in China (Series C), 1996; 39 (1): 45
- 14 Zhang X, Jiang H, Ma Q *et al.* J Wuhan Univ (Natural Science, English Edition), 1996; 1 (1): 119
- 15 Komminoth P, Aidan A, Long A *et al.* Diagn Mol Pathol, 1992; 1: 85

- 16 Tsongalis G, McPhail A, Lodge-Rigal R *et al.* Clin Chem, 1994; 40 (3): 381
- 17 Sallstrom J, Zehbe I, Aleml-M *et al.* Anticancer Res, 1993; 13: 1153
- 18 Embleton M, Gorochov G, Jones P *et al.* Nucleic Acids Research, 1992; 20: 3831
- 19 Correspondence: Questioning in situ PCR. Am J Pathol, 1994; 145 (3): 741

The Method and Applications of *in situ* PCR.
Ma Qi, Zhang Xiyuan, Xu Yaolian (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract *In situ* PCR is a novel technique in the field of molecular biology. It combined advantages of both PCR and *in situ* hybridization (ISH). Its origin, development and methodology are introduced. Its application and prospect are also described briefly.

Key words *in situ* PCR, *in situ* hybridization, PCR

真核生物 DNA 复制起始调控

窦亚丽 童坦君¹⁾

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 复制起始调控是真核生物复制调控机制的重要环节, 也是细胞生长调控的核心问题。对 SV40 病毒和酵母体系的研究为阐明真核生物的复制起始机制及其与细胞周期的关系提供了线索。目前, 与 DNA 复制起始有关的多种蛋白质因子 (如核蛋白 P₁, DNA 单链结合蛋白, DNA 聚合酶 α , 增殖细胞核抗原等) 的作用机理逐渐明朗, 周期依赖的调控特点得到了证实。文章着重介绍了 DNA 复制起始在细胞周期中的两个调控点及各种周期蛋白在该点的作用。文中还涉及复制起始异常与肿瘤发生的关系。

关键词 复制起始, SV40 细胞周期蛋白, 染色质状态

遗传物质的稳定性是细胞正常生长、分化的前提。真核生物经过长期进化, 建立起一套完善的 DNA 复制调控系统。这个调控系统保证了遗传结构的稳定性。它在 DNA 复制的起始、延长、终止各个阶段, 以及复制与细胞周

期的协调方面皆发挥重要作用。这一系统如受干扰, 便会出现染色质断裂, 丢失及重复复制等现象。

¹⁾通讯联系人。

收稿日期: 1995-11-10, 修回日期: 1996-04-08