

人单拷贝及重复 DNA 序列的原位 PCR^{*}

马 琦 张锡元 刘 汀 杨建琪 徐耀先¹⁾

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 在培养的人小肠癌转移腹水细胞系细胞中进行了 Y 染色体特异的重复序列及单拷贝序列的原位扩增与检测. 结果显示原位 PCR 法的灵敏度比直接的原位杂交法明显提高.

关键词 原位聚合酶链反应, PCR 原位杂交, 原位杂交, Y 染色体, 培养细胞

原位 PCR 技术 (*in situ* PCR, ISPCR) 是 PCR 与原位杂交技术结合的产物, 它赋予了原位杂交以 PCR 的灵敏度, 日益成为生物学领域工作的有力工具.

原位 PCR 主要有两类方法. 一类是标记的 dNTP 经原位 PCR 直接掺入 PCR 产物, 以便检测, 称为直接原位 PCR (direct *in situ* PCR)^[1]; 与之相对, 经原位 PCR 后再以标记探针进行原位杂交的方法称为间接原位 PCR (indirect *in situ* PCR) 或 PCR 原位杂交 (PCR *in situ* hybridization)^[2].

迄今为止, 有关原位 PCR 的研究报告多见于对细胞或组织中外源病毒核酸的检测^[3~5]. 可能由于细胞自身的某些复杂因素, 在对细胞本身基因组核酸固有片段特别是单拷贝基因的检测上, 成功的报道并不多^[6].

人、哺乳动物、某些两栖类和鱼类、昆虫为 XY 型性别决定型, 其雄性个体均具有 Y 染色体. 人小肠癌转移腹水细胞系 (human small intestine cancer metastatic ascites cell line, HICMA) 是李文鑫等从男性小肠癌转移腹水取样建立的. 我们利用 PCR 原位杂交方法, 在培养的 HICMA 细胞上, 以两对引物, 分别进行了人 Y 染色体特异的重复序列及单拷贝序列的原位 PCR 检测及比较研究.

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 HICMA 及 HeLa 细胞 (阴性对照),

武汉大学病毒系李文鑫老师赠送, 本室培养. 培养条件: RPMI-1640 培养基, 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml.

1.1.2 PCR 引物 Y₃ 和 Y₄, 长度均为 23 个碱基, 用于扩增人 Y 染色体上 3.5 kb 重复序列中, 大小为 446 bp 的 DNA 片段 (购自上海复华科技开发总公司生物技术中心).

1.1.3 PCR 引物 SRY₁ 和 SRY₂, 武汉大学遗传系周荣家老师赠送. 按 Emmanuel 等^[7]发表的序列合成, 用以扩增人 Y 染色体上单拷贝 SRY 基因中大小为 219 bp 的 DNA 片段.

1.1.4 Taq DNA 聚合酶: 购自华美公司.

1.1.5 Dig DNA Labeling and Detection Kit (Cat. No. 1093657), Boehringer Mannheim 公司.

1.1.6 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 均购自 Boehringer Mannheim 公司.

1.2 方法

1.2.1 正常人外周血白细胞、HICMA 及 HeLa 细胞总 DNA 的提取: 蛋白酶 K-酚: 氯仿法提取, 溶于去离子双蒸水, 4℃ 保存.

1.2.2 PCR 方法标记非放射性探针^[8]: 以 HICMA 细胞总 DNA 为模板, 分别以 Y₃、Y₄ 及 SRY₁、SRY₂ 两对引物进行扩增. 引物 Y₃、Y₄ (或 SRY₁、SRY₂) 浓度各 0.1 μmol/L, 反应体系中各 dNTP 浓度均为 200 μmol/L, 并

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39270394).

¹⁾ 湖北医科大学生物学教研室, 武汉 430071.

收稿日期: 1996-06-28, 修回日期: 1996-10-21

以 $10 \mu\text{mol/L}$ Dig-11-dUTP 取代相应浓度的 dTTP, 循环参数均为 92.5°C 45 s, 50°C 45 s, 70°C 90 s. 热启动, 30 循环. 产物以 2.0% 低熔点琼脂糖电泳, 判断探针浓度. 切取特异扩增条带, 移入 1.5 ml 离心管, 加入 200 μl 双蒸水, 沸水浴 10 min 后立即加入杂交液或 -20°C 保存备用.

1.2.3 细胞制片: 将玻片置于细胞培养瓶中, 常规方法进行细胞培养. 待细胞于玻片上长至半满, 取出玻片, 投入固定液. 固定液选用新鲜配制的多聚甲醛、10% 中性甲醛、无水乙醇或卡诺氏固定液. 固定时间从 10 min 至 1 h 不等. 无水乙醇脱水并晾干, -20°C 保存.

1.2.4 细胞原位杂交: 原位杂交参照地高辛应用手册 (Applications Manual "DNA Labeling and Detection Nonradioactive") 进行. 主要包括: 梯度乙醇脱水; 0.2 mol/L HCl 消化 20 min; 100 mg/L RNase 37°C 处理 1 h; 4% 多聚甲醛后固定 30 min; 42°C 预杂交 15 min, 预杂交液 ($6\times \text{SSC}$, 45% 甲酰胺, $5\times \text{Denhardt's}$ 液, 100 mg/L 经打断并变性的鲑精 DNA); 42°C 杂交过夜, 杂交液 ($6\times \text{SSC}$, 45% 甲酰胺, $5\times \text{Denhardt's}$ 液, 10% 硫酸葡聚糖, $500 \mu\text{g/L}$ 标记探针). 显色参考地高辛试剂盒说明书, 1:50 稀释抗体. 1% 伊红复染, 镜检.

1.2.5 细胞PCR原位杂交: a. 细胞玻片处理. 包括 0.2 mol/L HCl 消化 20 min; 100 mg/L RNase 处理 1h; 4% 多聚甲醛后固定 30 min; 70% 甲酰胺/ $0.1\times \text{SSC}$, 70°C 处理 10 min 后立即浸入冰冷 $0.1\times \text{SSC}$ 和双蒸水各 1 min, 梯度乙醇脱水, 室温晾干. b. PCR 反应. PCR 反应溶液体系中 MgCl_2 浓度为 3 mmol/L , 引物 Y_3 、 Y_4 (或 SRY_1 、 SRY_2) 各 $0.15 \mu\text{mol/L}$, 各 dNTP 浓度均为 $200 \mu\text{mol/L}$, 反应总体积为 20 μl 每玻片. 40°C 预热玻片与反应溶液后加入 2.5 U Taq 酶, 封严玻片与反应溶液, 94°C 变性 5 min 后进行 30 循环反应. 对于引物 Y_3 、 Y_4 , 循环参数为 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min; 引物 SRY_1 、 SRY_2 的退火温度为 50°C . 反应结束后取出玻片, 双蒸水充分洗

涤, 梯度乙醇脱水, 室温晾干. c. 原位杂交检测细胞内扩增产物: 原位杂交方法同 1.2.4.

1.2.6 对照: 在细胞原位 PCR 反应体系中不加引物或酶, 其余步骤均与 1.2.5 相同.

2 结果与分析

2.1 PCR 方法标记非放射性探针

2.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物结果 (图 1). Y_3 、 Y_4 扩增产物为 446 bp, SRY_1 、 SRY_2 扩增产物为 219 bp. 由图 1 可见, HICMA 细胞总 DNA 与正常人总 DNA 的 446 bp 及 219 bp 扩增片段是一致的.

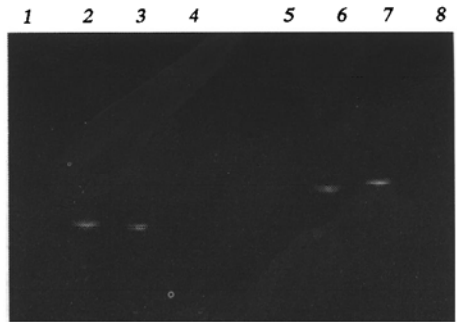


图 1 PCR 产物电泳结果

1: 模板为 HeLa 细胞总 DNA, 引物为 SRY_1 、 SRY_2 ; 2: 模板为 HICMA 细胞总 DNA, 引物为 SRY_1 、 SRY_2 , 反应体系中含 $10 \mu\text{mol/L}$ Dig-11-dUTP; 3: 模板为 HICMA 细胞总 DNA, 引物为 SRY_1 、 SRY_2 ; 4: 模板为正常男性外周血总 DNA, 引物为 SRY_1 、 SRY_2 ; 5: 模板为正常男性外周血总 DNA, 引物为 Y_3 、 Y_4 ; 6: 模板为 HICMA 细胞总 DNA, 引物为 Y_3 、 Y_4 ; 7: 模板为 HICMA 细胞总 DNA, 引物为 Y_3 、 Y_4 , 反应体系中含 $10 \mu\text{mol/L}$ Dig-11-dUTP; 8: 模板为 HeLa 细胞总 DNA, 引物为 Y_3 、 Y_4 .

2.2 细胞原位杂交

446 bp 探针的原位杂交结果 (图 2) 和 219 bp 探针的原位杂交结果 (图 3) 表明:

经统计分析, 446 bp 重复序列探针与 HICMA 细胞原位杂交后, 约有 40% 的细胞核

内出现杂交信号斑点, 而与 HeLa 细胞的杂交结果显示为阴性; 219 bp 探针与 HICMA 细胞的原位杂交显示约有 10% 的细胞核内出现信号斑点, 与 HeLa 细胞的杂交结果亦显示为阴性.

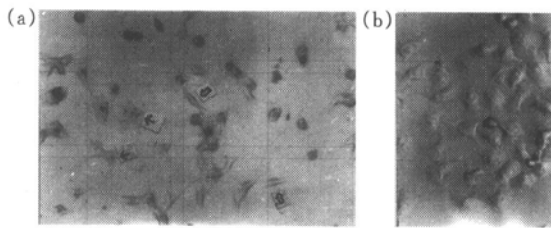


图 2 446 bp 探针的原位杂交结果

(a) HICMA 细胞; (b) HeLa 细胞. \ 所指细胞内出现信号斑点(下同); ∞ 所指细胞内无信号斑点(下同).

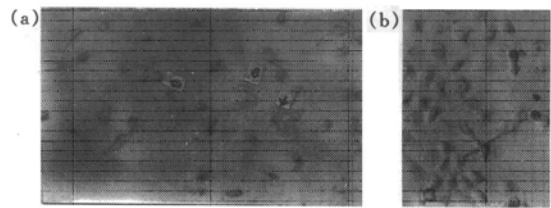


图 3 219 bp 探针的原位杂交结果

(a) HICMA 细胞; (b) HeLa 细胞.

2.3 细胞的 PCR 原位杂交

446 bp 探针的 PCR 原位杂交结果 (图 4) 和 219 bp 探针的 PCR 原位杂交结果 (图 5) 表明:

细胞原位 PCR 后, 446 bp 重复序列探针与 HICMA 细胞的原位杂交结果显示约有 90% 以上的细胞核内出现杂交信号斑点, 而与 HeLa 细胞的杂交结果仍显示为阴性; 219 bp 探针与 HICMA 细胞的原位杂交显示约有 60% ~ 70% 的核内出现信号斑点, 与 HeLa 细胞的杂交结果亦显示为阴性. 由 1.2.4 与 1.2.5 的结果比较可见, 原位 PCR 大大提高了原位杂交检测的灵敏度.

2.4 对照

结果与直接进行的原位杂交相类似.

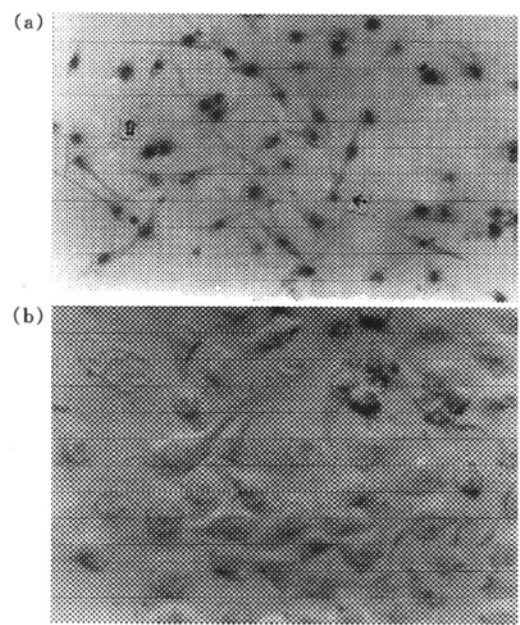


图 4 446bp 探针的 PCR 原位杂交结果

(a) HICMA 细胞; (b) HeLa 细胞.

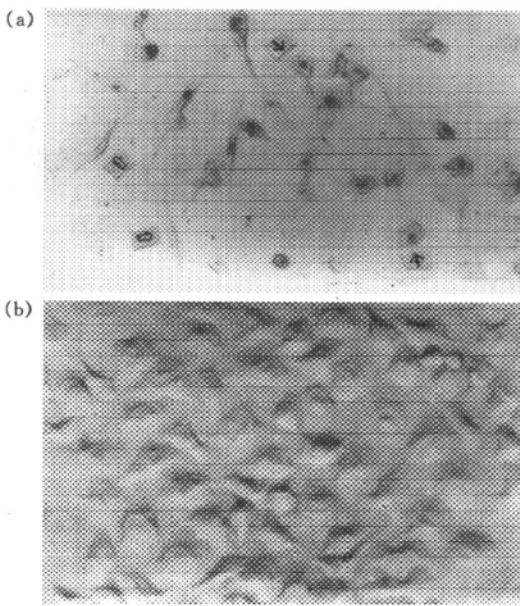


图 5 219 bp 探针的 PCR 原位杂交结果

(a) HICMA 细胞; (b) HeLa 细胞.

3 讨 论

a. 本实验采用了间接的原位 PCR 方法.

尽管该法较直接原位 PCR 法繁琐, 但有其独特的优点: a. 特异性强. 可能是由于 Taq 酶引起的 DNA 损伤修复过程, 或由自身 DNA 片段作为引物引导的扩增导致了标记 dNTP 的非特异性掺入^[9], 在直接原位 PCR 法中出现假阳性的可能性较大. 而间接原位 PCR 由于需经过专一性探针进行原位杂交后方能显示扩增信号, 就从原理上避免了这类现象的产生. b. 经济性. 相对而言, 间接原位 PCR 耗用 Dig 11-dUTP 量大为减少, 一次标记的探针可用于许多次杂交反应.

b. 关于蛋白酶或非离子去污剂的使用: 在一般原位 PCR 操作中, 通常都使用蛋白酶或非离子去污剂来增加细胞的通透性, 以利反应溶液进入细胞. 但这些处理常会导致细胞形态的破坏以及扩增产物的扩散, 并使细胞染色困难. 本研究舍弃了此步处理, 同样得到了满意的扩增, 且细胞形态完好, 杂交信号浓集于核内, 胞质内未见到明显的扩散. 这说明, 对于细胞的原位 PCR, 蛋白酶或非离子去污剂并不一定是必不可少的.

c. 原位 PCR 的反应条件: 由于在玻片上与试管内进行 PCR 时 DNA 模板存在状态的不同 (前者为螺旋缠绕状态), 以及细胞内可能存在的许多 PCR 反应抑制成分 (如红细胞内的铁卟啉)^[10], 使得在细胞内进行 PCR 扩增有一定的困难. 本研究结果表明, 适当地提高酶、引物、 Mg^{2+} 的浓度以及适度延长每循环中变性、退火、延伸的时间有利于 PCR 反应的进行.

d. 固定液的选择: 与国外的研究相似, 我们发现多聚甲醛或中性甲醛固定的材料扩增效果较好. 这可能是因为二者均属于交联型固定剂^[9, 11]. 它们使细胞内的大分子凝聚且交联在一起, 从而对扩增产物的扩散构成一种迁移屏障, 有利于产物的原位存留.

e. 单拷贝与重复序列 PCR 结果的比较: 从方法学上来说, 操作单拷贝与重复序列没有区别, 个别条件的调整仅与引物特性有关. 这说明某一特定的原位 PCR 体系对于不同材料

可以有较好的适应性. 另外从结果可以明显看出, 二者的原位 PCR 信号比例及信号强度较之相应的直接原位杂交结果均明显增大, 这反映了原位 PCR 较高的检测灵敏度. 直接原位杂交在细胞中是较难检出单拷贝基因的, 而原位 PCR 达到了很高的检测比例. 同时可以看出, 重复序列的原位 PCR 较之单拷贝序列的原位 PCR, 其结果中阳性细胞比例较高, 这从某一程度上也可为细胞内 DNA 片段拷贝数的相对定量提供依据.

国外关于原位 PCR 的工作开展已有约 5 年了, 也已取得很多重要的成果, 而国内目前关于该方面的报道还很少. 希望我们在前一阶段^[12, 13]以及现在所作的这些工作能够对我国在原位 PCR 领域的研究有所帮助.

参 考 文 献

- 1 Komminoth P, Aidan A, Long A *et al.* *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagn Mol Pathol*, 1992, **1**: 85~ 97
- 2 O'Leary J, Browne G, Landers R. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR *in situ* hybridization. *Histochem J*, 1994, **26**: 337~ 346
- 3 Nuovo G, MacConnell P, Forde A *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1991, **139**: 847~ 854
- 4 Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T *et al.* Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. *AIDS*, 1994, **8**: 1669~ 1674
- 5 Patterson B, Till M, Otto P *et al.* Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science Wash*, 1993, **260**: 976~ 979
- 6 Heniford B, Shum-Siu A, Leonberger M *et al.* Variation in cellular EGF receptor mRNA expression demonstrated by *in situ* reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**: 3159~ 3166
- 7 Emmanuel J P, Corinne Y C. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**: 2772
- 8 Thomas L, Oskar A H. Nonradioactive labeling of probe with Digoxigenin by polymerase chain reaction. *Analytical Biochem*, 1990, **188**: 335~ 337
- 9 Long A, Komminoth P, Lee E *et al.* Comparison of indirect and direct *in situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. *Histochemistry*, 1993, **99**: 151~ 162
- 10 Michael P, Andrew L. PCR based diagnosis in the presence

of 8% (v/v) blood. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 1151

11 Nuovo G, Gallery F, Hom R *et al.* Importance of different variables for enhancing *in situ* detection of PCR-amplified DNA. PCR Methods Appl, 1993, 2: 305~ 312

12 Zhang X Y, Jiang H B, Li L J *et al.* *in situ* amplification of DNA fragments specific for human Y chromosome in cellular nuclei by PCR. Science in China (Series C), 1996, 39 (1): 45~ 52

13 Zhang X Y, Jiang H B, Ma Q *et al.* Studies on *in situ* PCR detected by the BrdU antibody technique. J Wuhan Univ (Natural Science, English Edition), 1996, 1 (1): 119~ 124

in situ Polymerase Chain Reaction of Human's Single copy and Repeated DNA Sequences. MA Qi, ZHANG Xiuyan, LIU Ting, YANG Jianqi,

XU Yaoxian¹⁾ (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; ¹⁾Department of Biology, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China) .

Abstract Single-copy and specific repeated DNA sequences of human Y chromosome were amplified and detected by *in situ* PCR in cultured human small intestine cancer metastatic ascites cell line cells. The results show that *in situ* PCR is much more sensitive than *in situ* hybridization.

Key words *in situ* polymerase chain reaction, PCR *in situ* hybridization, *in situ* hybridization, Y chromosome, cultured cell

mRNA 差别显示研究肝再生调控基因*

邱兆华 贺福初¹⁾

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 以正常肝和再生肝为对比材料, 利用 mRNA 差别显示技术, 研究肝再生过程中基因的差别表达, 旨在从基因选择性表达水平上探讨肝再生调控机理. 得到 4 种未知肝再生相关 cDNA, 完成其克隆与序列分析, 一例在再生肝中的表达低于正常肝, 余者则高于正常肝. 这些序列均已在 EMBL (Europe Molecular Biology Laboratory) 数据库中登录, 登录号分别为 X95721、X95722、X95723、X97973.

关键词 肝再生调控, mRNA 差别显示, 基因克隆, 核苷酸序列分析

mRNA 差别显示技术 (mRNA differential display, DD 法) 是 1992 年由美国哈佛大学医学院的 Liang Peng 等^[1] 根据基因的选择性表达而建立的一种新的分子克隆策略. 本实验应用 DD 法, 研究肝再生过程中基因的选择性表达, 共得到 4 种肝再生相关 cDNA, 其一在再生肝中的表达低于正常肝, 余者则高于正常肝. 该结果为我们进一步从基因表达水平上探讨肝再生调控机理奠定了良好的基础.

1 材料与方法

1.1 动物、质粒、宿主菌、工具酶及其他试剂
Wistar 大鼠 (一级、健康、雄性、体重 180~ 220 g) 由军事医学科学院动物中心提

供. PCR 产物克隆载体 pGEM-T vector、大肠杆菌 JM 109 株、限制性内切酶、其他工具酶及 Wizard PCR Preps DNA Rapid Purification System 均购自 Promega 公司, DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司, α -³²P-dATP (比活性 1.11×10^{11} Bq/mmol) 购自福瑞公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, 其他主要试剂购自华美生物工程公司.

1.2 引物设计

按照 DD 法的引物设计原则^[2], 设计上、

* 国家 863 计划资助项目 (863-102-08-5).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-09-10, 修回日期: 1996-12-01