

原位 PCR 原理及应用

罗 帅,杨洪一

(东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:原位 PCR 是一种灵敏度特别高的基因水平上检测技术,该技术通过将原位杂交技术和普通的 PCR 技术相结合,从而可以检测出组织或细胞中低浓度的特异序列。为促进原位 PCR 技术的发展完善,简要介绍了原位 PCR 的基本原理、流程及应用情况。

关键词:原位杂交;PCR;原位 PCR

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)06-0108-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2017.06.0108

传统 PCR 技术自 Mullis 等^[1]人发明以来,由于其高度的特异性和敏感性,能够将微量的 DNA 或 RNA 进行大量扩增,以便进行后续分析。但是该技术需要将组织或细胞进行破碎,从中提取出核酸为模版进行扩增,不能反映出扩增的目的产物与组织之间的关系,与细胞形态无关,并且不能在细胞内精确的定位。而 Gall 和 Pardue^[2]建立原位杂交技术能够揭示出扩增的目的片段与目的组织之间的关系,具有良好的组织定位的能力,但其敏感性较低,对低浓度的目的基因检测能力较差。所以通过将二者结合起来,建立了一种新的方法——原位 PCR。它不但具有高度的敏感性,可以检测出组织或细胞中低浓度的

DNA 或 RNA,又可以对含有目的片段的组织或细胞进行精确的定位,进一步揭示出目的片段与组织或细胞间的形态结构信息,因此,在众多学科领域中广泛的应用。

1 原位 PCR 的基本原理

Hasse 等于 1990 年建立了一种把 PCR 技术和原位杂交技术相结合起来的原位多聚酶链式反应技术(in situ PCR),简称原位 PCR^[3]。这次扩增是在管中进行,其基本原理与普通 PCR 的扩增原理基本相同;首先将完整的细胞用 4%的 PFA 固定液固定,然后通过 Proteinase K 处理,从而允许引物、酶以及游离核苷酸进入核膜,该过程是利用细胞膜作为袋子,在进行反转录后可以直接在载玻片上进行 PCR 的过程,从而省略从样品组织中提取 RNA 的过程,还可以减少信号的丢失。众多研究人员都相继报道了原位 PCR 实验,并将研究对象从完整细胞悬液发展为细胞涂片、石蜡切片和冰冻切片等^[4]。研究的方法也在不断的进

收稿日期:2017-04-24
基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(LC2016005)
第一作者简介:罗帅(1992-),男,安徽省阜阳市人,在读硕士,从事微生物学研究。E-mail: 847613797@qq.com。
通讯作者:杨洪一(1978-),男,吉林省九台市人,博士,副教授,从事微生物学研究。E-mail:hyi01@tom.com。

Establishment of Germplasm Database Breeding in Hainan of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences Based on Internet

REN Hai-long¹, ZHANG Yan², XU Lin^{1,2}, GAO Qiang¹, WANG Tian-di¹, FU Xiao-fa¹, CHEN Ji-hao¹

(1. Hainan Center, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572014; 2. Institute of Crop Germplasm Resource, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091)

Abstract: In order to share the data of germplasm database breeding in Hainan of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, the database platform was developed that was based on internet technologies using Python development language, Postgresql database and the Browser/Server (B/S) system. The database has many basic functions, such as the information inquiry of germplasm database breeding in Hainan.
Keywords: Xinjiang; breeding in Hainan; germplasm; database

行完善,总体上可以分为 3 种,即(1)直接原位 PCR:直接原位 PCR 的特点是产物会被标记物标记,通过不同的标记物性质,检测出扩增的产物。该方法操作简便、省时,现已有较多成功的报道。缺点在于容易产生非特异性产物,从而出现假阳性等问题。(2)间接原位 PCR:间接原位 PCR 是使用最为广泛原位 PCR 技术。在不加标记物的条件下,首先进行普通的 PCR 反应,待反应结束后,再利用原位杂交技术来检测扩增出的目的信号。这种方法由于使用特异性探针,所以不会检测出非特异性产物。该方法需要在 PCR 反应之后进行洗片和信号检测等过程,所以需要的时间比其它方法相对较长。(3)原位反转录 PCR:是指在 PCR 之前首先进行反转录过程(RT),将反转录的产物作为模板用于扩增,这个过程叫做原位反转录 PCR (in situ reverse transcription PCR,简称原位 RT-PCR)。该方法可通过其较高的敏感性,来检测细胞或组织中低浓度的目的基因表达^[5]。大致过程可以分为样品制备、预处理、原位 PCR、洗脱、检测等过程。引物与模版的错配是产生假阳性的主要原因,所以引物的设计尤为重要。

2 原位 PCR 的流程

2.1 样品制备

样品制备理想的原则是能尽可能保持组织的形态结构。不用的组织或样本,制备的方法也不同。常用的制备方法有冰冻切片、石蜡切片等。冰冻切片由于操作简便、快速,能够比较完好地保存各种抗原活性及酶类,而多应用于手术中的快速病理诊断。其过程主要包括:取材、4%PFA 固定、包埋、切片、烘片等步骤,其中在烘片过程中,最好 60℃烘片 20 min,这样切片才能彻底的固定在载玻片上。而石蜡切片主要是通过取材、固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与粘片、烘片、脱蜡、水化等步骤。与传统的冰冻切片相比石蜡切片法最大的优点是可以切(2~3 μm)薄片,片子薄而均匀,无皱褶。石蜡切片能够长时间的固定和保存组织。但是石蜡切片在烘片过程中要尽量除尽水分,以免残余的水分在烘干的过程中会使切片不能完全贴合载玻片上,从而在后续过程中出现掉片的现象。

2.2 预处理

在切片制备好之后,一般要利用蛋白酶进行预消化。这样可以增大样品的通透性,从而允许

各种试剂进入组织中进行反应。不同的反应条件会影响实验的成败,所以反应的时间、温度等都需要根据实验过程进行优化。消化过度会破坏细胞形态,使核酸网络破坏,导致 PCR 产物流失;消化不够的话,由于核酸蛋白质网络结构结合紧密而导致各种试剂不能进入组织中,影响后续反应过程。蛋白酶可以通过甘氨酸 PBS 溶液终止反应。

2.3 原位 RT-PCR 反应

在扩增原理上原位 PCR 与普通 PCR 基本相同,但也有其特殊性,原位 PCR 是在固定的组织、细胞上进行。理论上认为原位 PCR 效率低于传统 PCR。所以,通常为获得较好的扩增效果,引物的加入量和聚合酶的浓度要比传统 PCR 高一些,并且延伸时间也应该相对延长。为获得足够目的产物,一般需要 25~35 次循环(比普通的 PCR 循环次数多)。当 PCR 扩增之后,可将其放在 4%的多聚甲醛中再次固定^[6]。

2.4 洗脱

洗片的强度也是影响实验成败关键的因素之一,当原位 PCR 结束后,要将目的样品进行洗涤,除去多余的 PCR 试剂以及非目的产物。如果洗片过程不充分,当检测时,漂散的扩增产物会重新显现,从而造成假阳性或背景颜色过深,而过分的洗涤可能会将目的产物从组织中去除,从而影响实验的成败。因此,洗涤的程度要根据阳性信号的强弱和背景这两个因素来确定。

2.5 检测

目的产物的检测通常有两种不同方法。(1)当地高辛或生物素被加入原位 PCR 过程中,则采用免疫组化方法进行检测;(2)间接法则通过原位杂交来确定目的产物的具体位置。对于这两种检测方法,通常有 3 种显示方式:荧光标记、酶标记、放射性同位素标记。

通常应该设置一系列对照实验来证明实验结果的准确性。为保证对照结果的准确性,可以设置的对照有:(1)不加探针或不加带标记的引物;(2)将已知的阳性和阴性样品同时扩增;(3)PCR 或 RT-PCR 要使用同一样品的目的基因;(4)不加聚合酶进行反应;(5)不加引物直接进行原位扩增^[7]。

3 原位 PCR 的应用

原位 PCR 技术是将分子杂交方法与 PCR 技术相结合的一种新型分子分析技术,其中主要方面是结合分子杂交方法精密定位的特点与 PCR

技术的高效扩增、高敏感的特点,在动物学、临床医学和微生物学领域应用广泛。原位 PCR 技术在动、植物方面的应用逐渐受到人们的重视,能够利用原位 PCR 技术促进人类在外源性基因检测和内源性基因检测等方面的发展,并逐渐形成系统的基因诊断学技术。

3.1 原位 PCR 在外源性基因检测

外源性基因检测有感染基因(病毒基因 HIV、HPV、HSV、HBV、HCV、EB 及其它微生物如弓形虫)和导入基因(基因工程、基因诊断、基因治疗)。

3.1.1 感染基因检测 原位 PCR 能够将特定病毒的 DNA 和 RNA 在被感染的组织或细胞内显示出来,从而提供了一个好的办法将病毒在组织细胞中进行精确定位。Bagasra 等人^[8-9]用原位 PCR 方法分析了 11 个感染了 HIV 病人的感染情况,结果表明,其中 8 个人用普通原位杂交方法未能检测出来,却含有 HIV 病毒序列。赵英等(2008)^[10]利用原位 RT-PCR 技术成功的在梨树组织中检测到苹果锈果类病毒。Maria R. Rojas 等^[11]用原位 PCR 直接检测西红柿黄萎病毒(TYLCV)。结果表明,西红柿黄萎病毒主要侵染植物的叶、茎和花等组织。黄广明等人^[12]应用原位 PCR 对鸡传染性法氏囊早期侵染过程进行研究。Murphy 等人^[13]利用原位 PCR 检测口蹄疫病毒在培养的细胞中的位置。近期也有文献报道利用原位 PCR 检测寄生虫感染^[14]。

3.1.2 导入基因检测 原位 PCR 可通过基因检测的方式来鉴定外来基因,从而可以确定出新导入的基因会发生什么变化,为临床兽医分子水平的研究和诊断提供有益的帮助,现已应用于导入基因如转基因动物和基因治疗等的检测和观察^[15]。李远华等(2004)^[16]通过使用原位 PCR 方法,研究了葡萄糖苷酶基因在福鼎大白茶体内的分布,结果表明在叶主脉的韧皮部、薄壁组织以及上下表皮和下鞘叶片的海绵组织、上下表皮以及栅栏组织可以检测到 β -葡萄糖苷酶基因。Wood M J 等^[17]对哺乳动物中枢神经系统导入的外源基因进行研究,该方法对通过对导入基因的本身进行检测,从而能够确定转入基因的精确位置,并且弥补了目前所使用的标记基因的不足之处。

3.2 原位 PCR 在内源性基因检测

内源性基因检测通常有两类:异常或突变基

因(遗传性疾病基因,肿瘤基因)和固有基因(人类基因)。可以将原位 PCR 技术用于基因突变和重排、染色体基因定位等研究。

3.2.1 突变和重排基因检测 Tokusashi 等^[18]使用原位 PCR 技术来辨别鼠肝组织切片中未发生突变的清蛋白基因和发生突变的清蛋白基因。Long 等^[19]分别采用直接法和间接法原位 PCR 检测了人鼠杂交瘤细胞株 CON 的 t(14;18)。

许多恶性肿瘤会发生不用基因重排。通过原位 PCR 可以研究基因的重排^[20-21]。Embleton 等^[22]采用原位 RT-PCR 技术,在单个细胞内显示出重排的免疫球蛋白重链和轻链的可变区基因。

3.2.2 染色体基因定位 1998 年,T. Uchiumi 等通过原位 PCR 方法,扩增得到菜豆染色体上的豆根瘤蛋白(Lb)基因序列,并使用 FISH 技术,成功的将该基因精确定位到菜豆的 2 条染色体上^[23]。Heniford 等^[24]以特异性序列为引物,通过采用原位 RT-PCR 的方法对不同组织细胞的表皮生长因子受体 mRNA 进行检测。Cohen 等^[25]用原位 RT-PCR 方法对肝细胞中线粒体周围的精氨酸、琥珀酸和裂解酶的 mRNAs 进行亚细胞水平定位研究。

然而,原位 PCR 在对植物应用方面的研究,受到多种条件因素的约束。应用难度较大,如植物细胞的细胞壁对核苷酸出入的阻碍作用,中期染色体凝缩严重,较难在原始位置扩增得到目的片断等。但是在经过研究人员的共同努力之下,取得了不少的进步和发展^[26]。

4 展望

原位 PCR 技术自从诞生以来,便凭借着其高度敏感和精确定位的特性,在植物学、病毒学、病理学、肿瘤以及临床医学等研究中应用广泛。虽然还存在一些问题,例如假阳性、特异性等,但仍不失为非常重要的一种分子工具。相信随着分子生物学、细胞生物学等技术发展,原位 PCR 技术会得到进一步的发展和完善,从而在各个学科领域中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction [J]. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986, 51: 263-273.
- [2] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

- States of America, 1969, 63(2): 378.
- [3] Haase Ashley T, Retzel Ernest F, Staskus Katnerine A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, 1990, 87(13): 4971-4975.
- [4] 陈林蛟. 原位 PCR 技术及其应用[J]. 生物工程进展, 2000, 2(5): 475-478.
- [5] 谢辉, 章伟文, 陈宏, 等. 原位反转录 PCR 技术及其应用的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2003(4): 402-403.
- [6] 李雪梅, 李菲菲. 原位 RT-PCR 技术的应用[J]. 中国兽医科技, 2005, 3(2): 157-160.
- [7] 商明清, 魏梅生. 植物病毒检测新技术研究进展[J]. 植物检疫, 2004, 18(4): 236-240.
- [8] Bagasra O, Hauptman S P, Lischner H W, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction[J]. New England Journal of Medicine, 1992, 326(21): 1385-91.
- [9] Bagasra O, Seshamma T, Oakes J W, et al. Frequency of cells positive for HIV-1 sequences assessed by *in situ* polymerase chain reaction[J]. Aids, 1993, 2(11): 7.
- [10] 赵英, 牛建新. 梨树组织中的苹果锈果类病毒原位 RT-PCR 检测[J]. 分子植物育种, 2008, 6(4): 812-818.
- [11] Rojas M R, Jiang H, Salati R, et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus[J]. Virology, 2001, 291(1): 110-25.
- [12] 黄广明, 张曼夫, 乔素兰. 应用原位 PCR 对鸡传染性法氏囊病病毒早期侵染过程的研究[J]. 病毒学报, 2001, 17(1): 60-64.
- [13] Murphy MLP, Rodriguez M, Schudel A A, et al. Localization FMDV RNA in tissue culture infected cells via *in situ* polymerase chain reaction [J]. Journal of Virological Methods, 1995, 54(2-3): 173.
- [14] 李爽, 甘绍伯, 彭瑞云, 等. 原位 PCR 对弓形虫感染鼠毒力检测效果的观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 41-43.
- [15] Yin J, Kaplitt M G, Kwong A D, et al. *In situ* PCR for *in vivo* detection of foreign genes transferred into rat brain[J]. Brain Research, 1998, 783(2): 347.
- [16] 李远华, 江昌俊, 余有本. 茶树叶片 β -葡萄糖苷酶基因的原位 PCR 研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(2): 147-150.
- [17] Wood M J, Byrnes A P, Kaplitt M G, et al. Specific patterns of defective HSV-1 gene transfer in the adult central nervous system; implications for gene targeting[J]. Experimental Neurology, 1994, 130(1): 127.
- [18] Tokusashi Y, Nishikawa Y, Ogawa K. Differentiation of the normal and mutant rat albumin genes on hepatic tissue sections by *in situ* PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(18): 3790.
- [19] Long A A, Komminoth P, Lee E, et al. Comparison of indirect and direct *in-situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Detection of viral DNA, gene rearrangements and chromosomal translocations[J]. Histochemistry, 1993, 99(2): 151-162.
- [20] Komminoth P, Long A A. In-situ polymerase chain reaction[J]. Virchows Archiv B, 1993, 64(1): 67-73.
- [21] Long A A, Komminoth P, Lee E, et al. Comparison of indirect and direct *in-situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Detection of viral DNA, gene rearrangements and chromosomal translocations[J]. Histochemistry and Cell Biology, 1993, 99(2): 151-62.
- [22] Embleton M J, Gorochov G, Jones P T, et al. In-cell PCR from mRNA; amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(15): 3831-7.
- [23] Uchiumi T, Kuwashiro R, Miyamoto J, et al. Detection of the leghemoglobin gene on two chromosomes of *Phaseolus vulgaris* by *in situ* PCR linked-fluorescent *in situ* hybridization(FISH)[J]. Plant & Cell Physiology, 1998, 39(7): 790-794.
- [24] Heniford B W, Shum-Siu A, Leonberger M, et al. Variation in cellular EGF receptor mRNA expression demonstrated by *in situ* reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3159-66.
- [25] Cohen N S. Intracellular localization of the mRNAs of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase around liver mitochondria, visualized by high-resolution *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1996, 61(1): 81-96.
- [26] 钟筱波. 用荧光原位杂交技术构建高分辨率的 DNA 物理图谱[J]. 遗传学报, 1997(3): 44-48.

In Situ PCR Principle and Application

LUO Shuai, YANG Hong-yi

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: *In situ* PCR is a highly sensitive gene level detection technique, the technique combines the *in situ* hybridization with the common PCR technique to detect low concentrations of specific sequences in tissues or cells. In order to promote the development of *in situ* PCR technology, the basic principle, process and application of *in situ* PCR were briefly introduced.

Keywords: *in situ* hybridization; PCR; *in situ* PCR