

原位 PCR 技术基本原理、类型、步骤和应用

在科学研究中，每一项新技术的创立都会带来一系列新的研究成果问世，从而推动着各学科的发展。纵观形态研究领域，50 年代电子显微镜引入形态学观察领域，带来了从细胞水平到亚细胞水平的深入研究；60-70 年代，免疫组织化学与免疫细胞化学技术的广泛应用，又将观察的水平由亚细胞结构推向了蛋白质分子水平，使细胞内众多的活性物质得以进行细胞或亚细胞水平的定位，对医学生物学的发展无疑产生了深刻的影响。70 年代，分子生物学技术在形态学中的广泛应用，随着原位杂交技术的出现，使组织细胞内特定的 DNA 或 RNA 序列能够被定位，将蛋白质水平又提高到基因水平即核酸分子的观察和定位，从而使人类对许多生命现象在基因水平上的认识得以深化；80 年代，分子生物学领域中一项具有强大生命力的技术 PCR——多聚酶链反应技术问世了，很快地就被引入形态学观察的领域，使细胞内低拷贝或单拷贝的特定 DNA 或 RNA 得以进行定位及观察。这一技术的问世，必将带来更多的研究成果，使形态学的研究又向前迈出一大步。

基本原理

原位 PCR 技术的基本原理，就是将 PCR 技术的高效扩增与原位杂交的细胞定位结合起来，从而在组织细胞原位检测单拷贝或低拷贝的特定的 DNA 或 RNA 序列。

PCR 技术是在 DNA 聚合酶的作用下，经过模板的变性、退火和引物延伸三种循环，将引物引导下的特异性靶序列迅速地进行扩增，经过扩增的靶序列（一般能扩增 106 倍），很容易在凝胶电泳或 Southern 印记杂交中显示出来，因此，PCR 技术具有灵敏度高，特异性强的优势，随着热循环自动化的提高与稳定也使得 PCR 技术的操作简便易行。但是，PCR 技术是在液相中进行的，在扩增前，需将细胞破坏，从中提取核酸作为模板，因此很

难将 PCR 的结果与组织细胞的形态结构联系起来，同时，也很难判断含特异性靶序列的细胞类型。

原位 PCR 技术成功地将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来，保持了两项技术的优势又弥补了各自的不足。原位 PCR 技术的待检标本一般先经化学固定，以保持组织细胞的良好形态结构。细胞膜和核膜均具有一定的通透性，当进行 PCR 扩增时，各种成分，如引物，DNA 聚合酶，核苷酸等均可进入细胞内或细胞核内，以固定在细胞内或细胞核内的 RNA 或 DNA 为模板，于原位进行扩增。扩增的产物一般分子较大，或互相交织，不易穿过细胞膜或在膜内外弥散，从而被保留在原位。这样原有的细胞内单拷贝或低拷贝的特定 DNA 或 RNA 序列在原位以呈指数极扩增，扩增的产物就很容易被原位杂交技术检查。

基本类型

根据在扩增反应中所用的三磷酸核苷原料或引物是否标记，原位 PCR 技术可分为直接法和间接法两大类，此外，还有反转录原位 PCR 技术等。

直接法原位 PCR 技术

直接法原位 PCR 技术是将扩增的产物直接携带标记分子，即使用标记的三磷酸腺苷或引物片断。当标本进行 PCR 扩增时，标记的分子就掺入到扩增的产物中，显示标记物，就能将特定的 DNA 或 RNA 在标本（原位）中显现出来。

常用的标记物有放射性同位素 ^{35}S ，生物素和地高辛，用放射性自显影的方法或用亲和组织化学及免疫组织化学的方法去显示标记物所在位置。

直接法原位 PCR 技术的优点是操作简便，流程短，省时。缺点是特异性较差，易出现假阳性，扩增效率也较低，特别是在石蜡切片上，上述缺点更为突出。因为在制片过程中，无论是固定，脱水还是包埋，都会导致 DNA 的损害，而受损的 DNA 可利用反应体系中的

标记三磷酸核苷进行修复，这样标记物就会掺入到 DNA 的非靶序列中，造成假阳性。若用标记引物的方法进行直接法原位 PCR，其扩增的效率比不标记更低。

间接法原位 PCR 技术

间接法原位 PCR 技术是在细胞内进行特定 DNA 或 RNA 扩增，再用标记的探针进行原位杂交，明显提高了特异性，是目前应用最为广泛的原位 PCR 技术。

间接法原位 PCR 与直接法不同的是，反应体系与常规 PCR 相同，所用的引物或三磷酸腺苷均不带任何标记物。即实现先扩增的目的，然后用原位杂交技术去检测细胞内已扩增的特定的 DNA 产物，因此，实际上是将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来的一种新技术，故又称之为 PCR 原位杂交(PCR in situ hybridization , PISH)。

间接法 PCR 技术的优点是特异性较高，扩增效率也较高。缺点是操作步骤较直接法繁琐。

原位反转录 PCR 技术。

原位反转录 PCR(in situ reverse transcription PCR, In Situ RT-PCR)是将液相的 RT-PCR 技术应用到组织细胞标本中的一种新技术，与 RT-PCR（液相）不同点在于，进行原位反转录 PCR 反应之前，组织标本要先用 DNA 酶处理，以破坏组织中的 DNA 酶，这样才能保证扩增的模板是从 mRNA 反转录合成的 cDNA，而不是细胞中原有的 DNA。其它基本步骤与液相的 RT-PCR 相似。

基本步骤

原位 PCR 技术的基本步骤包括标本的制备。原位扩增（PCR）及原位检测等基本环节，现分述如下（重点以石蜡切片为例）。

标本的制备

原位 PCR 技术可应用于细胞悬液、细胞涂片、冰冻切片以及石蜡切片。相比较而言，以悬浮的完整细胞做原位 PCR 效果最好，石蜡切片效果最差。随着技术方面的一些问题被解决，近年也有从石蜡切片中得到满意的 PCR 效率的报道。效果不好的原因是多方面的，如：玻片上做 PCR，热传导较差，热对流不均匀，TaqDNA 酶被玻璃片吸附等，更为主要的原因，可能是标本经制片后，细胞缺乏完整的胞浆或核膜，扩增产物易发生弥漫而导致扩增的产物在原位不易保留。绝大多数的病理标本都是以福尔马林固定，石蜡包埋的形式保存的，若能很好地解决石蜡切片原位 PCR 的有关技术问题，意义显然是十分重大的。

组织细胞的固定 一般认为组织细胞以 10% 的缓冲福尔马林或 4% 的多聚甲醛固定后进行原位 PCR 效果较好。固定的时间一般不宜过长，视组织的大小，一般以 4℃ 4-6 小时为宜。

切片的厚度 一般而言，切片若厚一些，原位 PCR 的效果也较好一些，因为切片越厚，靶 DNA 的含量也就越多，同时膜结构也较多，防止扩增产物弥散的作用也越明显。但厚切片细胞重叠多，形态学观察的效果就差了，分辨率也将下降。

玻片的处理 为防止石蜡切片在 PCR 和原位杂交过程中脱落，在玻片应作防脱片处理，常用的方法是涂以多聚赖氨酸或用硅烷化处理，一般能防止组织脱落。

蛋白酶的消化作用 在进行原位扩增之前，组织标本需经蛋白酶处理。经蛋白酶消化的组织细胞，可增加其通透性，充分允许反应体系中的各成分进入细胞内，并能很好的暴露靶序列，以利于扩增。常用的蛋白酶有蛋白酶 K，胰蛋白酶或胃蛋白酶。蛋白酶消化的程度就要根据组织固定的程度进行调整。蛋白酶消化后，要注意加热以灭活酶的活性或通过充分的洗涤将酶完全去除，因为只要有少量的残留酶存在，都将对随后进行的 PCR 反应体系的数量 TaqDNA 酶产生毁灭性的影响。

蛋白酶消化处理组织细胞可提高通透性,有利于后续进行的各反应成分进入细胞内或核内,但同时也使得扩增产物的弥散机会增多,有可能带来假阳性或假阴性的结果。

原位扩增 (PCR)

原位扩增即在组织细胞标本上进行 PCR 反应,其基本原理与液相 PCR 完全相同。

引物 PCR 所用的引物一般为 15-30bp 为宜,扩增的片断为 100-1000bp 左右。原位 PCR 宜用较短的引物。从石蜡切片中提取的 DNA 很少超过 400bp, RNA 很少超过 200bp,较长序列的扩增易引起引物与模板的错配而导致非特异性反应的出现。

反应体系 原位 PCR 的反应体系与常规的液相 PCR 基本相同,由于是在经过固定的组织切片上进行,为获得较好的扩增效果,有人主张反应体系中的引物, TaqDNA 聚合酶以及 Mg^{2+} 的浓度均应高于液相的 PCR 反应体系。在反应体系中要加入牛血清白蛋白 (BSA),以防止 TaqDNA 聚合酶与玻片的结合而降低了扩增效率。

热循环 原位 PCR 的热循环可在专门的热循环仪上进行,操作简便。也可在一般的 PCR 热循环仪上进行,通常在样品台上覆盖一层铝箔,制成平台,样品台上的空间用矿物油或水充填,将载玻片至于平台上,即可进行热循环的步骤。

为了保证进行充分的扩增,原位 PCR 热循环中每一步骤的时间可比常规 PCR 略长些,另外,也可采用热启动 (hot start) 的方法,即玻片加热到 80-94℃时,再立即加入 TaqDNA 聚合酶。

为了保证反应体系在热循环过程不过多丢失,可用清亮的指甲油,矿物油或 PAP 笔把盖片四周封闭起来。

洗涤 原位扩增结束后,标本应清洗,以除去弥散到细胞外的扩增产物。洗涤不充分,会导致扩增产物在检测时显现,造成背景过深或假阳性结果的出现。但是,洗涤过度,也会造成细胞内扩增的产物被洗脱,是阳性信号减弱或丢失。

有作者在扩增后用 4%多聚甲醛 2 小时或 2%戊二醛 5 分钟进行后固定，以使扩增的产物在检测时能很好地保留在细胞内，提高检测的敏感性和特异性。

原位检测

原位 PCR 的扩增产物检测方法，取决于原位 PCR 的设计方案，直接法则根据标记分子的性质对扩增产物直接进行原位检测。间接法则需用原位杂交的方法进行检测。

荧光素、生物素、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记的检测，与免疫组织化学技术和亲和组织化学技术相同，详见前述。

原位杂交的基本步骤详见核酸杂交一章。

原位 PCR 技术的应用

原位 PCR 技术的突出优势，就是能在组织细胞原位检测出拷贝数较低的特异性基因序列。按照待测基因的性质，可将原位 PCR 的应用分为检测外源性基因和内源性基因两方面。

1、用于外源性基因的检测

(1) 病毒基因的检测

感染病毒的细胞常无较好的检测手段，但当原位 PCR 技术应用后，使这一极为困难的问题有望解决。

对 HIV、HPV、HSV、HBV、HCV 等多种病毒的检测，使我们能够成功观察到这些病毒在艾滋病、生殖系统肿瘤、肝炎及肝癌中的作用，能够及时发现受感染的人群。

(2) 细菌基因的检测

最突出的应用是在结核杆菌的检测上，当结核病变不够典型时，经过特殊染色的方法（详见第一篇第五章）很难在镜下找到结核杆菌，而应用原位 PCR 技术可帮助明确诊断，当结核杆菌很少时仍能在镜下被很容易地找出来。

(3) 导入基因的检测

在转基因动物的研究中,是否导入了基因,在接受基因治疗的患者体内,是否接受了导入的基因,均可用原位 PCR 技术来证实。因此,原位 PCR 技术成为重要的检测手段。

2、用于内源性基因的检测

(1) 异常基因的检测

机体内基因的突变、重排、也可用原位 PCR 技术进行检测,原癌基因,抑癌基因的突变,恶性淋巴瘤免疫球蛋白重链基因的重排,对肿瘤的研究和诊断无一均提供了广阔的应用前景。

(2) 固有基因的检测

对于机体细胞内只有单个或几个拷贝的低表达固有基因,原位杂交技术因基因拷贝数太少而无能为力,液相 PCR 虽可进行扩增检测出来,但不能确定含有该基因的细胞类型,原位 PCR 技术则弥补了上述两种技术的不足,使得我们能够对人类各种基因进行检测,而完成人类基因图的绘制。

荧光原位杂交



荧光原位杂交方法是一种物理图谱绘制方法,使用荧光素标记探针,以检测探针和分裂中期的染色体或分裂间期的染色质的杂交。

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是在 20 世纪 80 年代末在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传技术,以荧光标记取代同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法,探针首先与某种介导分子(reporter

molecule)结合,杂交后再通过免疫细胞化学过程连接上荧光染料[1,2].FISH 的基本原理是将 DNA(或 RNA)探针用特殊的核苷酸分子标记,然后将探针直接杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测 DNA 序列在染色体或 DNA 纤维切片上的定性、定位、相对定量分析.FISH 具有安全、快速、灵敏度高、探针能长期保存、能同时显示多种颜色等优点,不但能显示中期分裂相,还能显示于间期核.同时在荧光原位杂交基础上又发展了多彩色荧光原位杂交技术和染色质纤维荧光原位杂交技术.

对于利用 rRNA 的荧光原位杂交来说,如下原因可导致较低的荧光信号强度:

较低的细胞核糖体含量

较低的细胞周边的通透性

较低的目标序列可接触性 (由于 rRNA 的折叠产生的构象,有些位置与 rRNA 分子内其他链或其他 rRNA 或蛋白紧密接触,从而使探针无法和目标序列杂交)

为检验细胞中的目标序列是否容易被探针杂交,及测试最佳杂交温度,可利用“克隆荧光原位杂交”(clone-FISH)进行试验:将 rRNA 基因结合入质粒,转化至大肠杆菌中表达,构成核糖体,再用荧光标记的探针杂交。

FISH 可与流式细胞术联用,对特定荧光标记的细胞进行计数或者分离。

荧光原位杂交 (FISH) 技术简介

1974 年 Evans 首次将染色体显带技术和染色体原位杂交联合应用,提高了定位的准确性。20 世纪 70 年代后期人们开始探讨荧光标记的原位杂交,即 FISH 技术。1981 年 Harper 成功地将单拷贝的 DNA 序列定位到 G 显带标本上,标志着染色体定位技术取得了重要进展。20 世纪 90 年代,随着人类基因组计划的进行,由于绘制高分辨人类基因组图谱的需要,FISH 技术得到了迅速的发展和广泛应用。

1. 原理

FISH(fluorescence in situ hybridization)技术是一种重要的非放射性原位杂交技术。它的基本原理是:如果被检测的染色体或 DNA 纤维切片上的靶 DNA 与所用的核酸探针是同源互补的,二者经变性-退火-复性,即可形成靶 DNA 与核酸探针的杂交体。将核酸探针的某一种核苷酸标记上报告分子如生物素、地高辛,可利用该报告分子与荧光素标记的特异亲和素之间的免疫化学反应,经荧光检测体系在镜下对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。

2. 实验流程

FISH 样本的制备→探针的制备→探针标记→杂交→(染色体显带)→荧光显微镜检测→结果分析。

3. 特点

原位杂交的探针按标记分子类型分为放射性标记和非放射性标记。用同位素标记的放射性探针优势在于对制备样品的要求不高,可以通过延长曝光时间加强信号强度,故较灵敏。缺点是探针不稳定、自显影时间长、放射线的散射使得空间分辨率不高、及同位素操作较繁琐等。采用荧光标记系统则可克服这些不足,这就是 FISH 技术。FISH 技术作为非放射性检测体系,具有以下优点:1、荧光试剂和探针经济、安全;2、探针稳定,一次标记后可在两年内使用;3、实验周期短、能迅速得到结果、特异性好、定位准确;4、FISH 可定位长度在 1kb 的 DNA 序列,其灵敏度与放射性探针相当;5、多色 FISH 通过在同一个个核中显示不同的颜色可同时检测多种序列;6、既可以在玻片上显示中期染色体数量或结构的变化,也可以在悬液中显示间期染色体 DNA 的结构。

缺点:不能达到 100%杂交,特别是在应用较短的 cDNA 探针时效率明显下降。

4. 应用

该技术不但可用于已知基因或序列的染色体定位,而且也可用于未克隆基因或遗传标记及染色体畸变的研究。在基因定性、定量、整合、表达等方面的研究中颇具优势。

荧光原位杂交技术的发展历程

1 FISH 技术检测位点数目及检测目标的发展

在 FISH 技术基本确立之后, FISH 不仅用于单基因或核酸检测, FISH 技术的进一步发展扩展到多色 FISH 多基因位点同时检测, 从基因检测发展到基因组、染色体、活细胞中转录产物 mRNAs 原位检测以及组织水平的核酸检测, 并且在今后的研究中还有可能应用到整个生物体的检测。早期的探针较大, 是通过载体的增殖、缺口平移法、体外转录法和随机引物 DNA 合成法来制备以获得特异性杂交克隆。然而大片断的探针通常带有重复序列造成高荧光背景, 采用未标记的核酸进行预处理使其与非特异性位点结合用于抑制非特异性杂交可以克服上述问题, 同时也使得研究者扩大了检测目标, 实现了整条染色体染色。在细胞遗传学上 FISH 技术在染色体分析方面也因此得到了显著的提高。如通过比较基因组杂交 (Comparative genomic hybridization) 用于检测染色体区域的缺失和重复。大片段探针一旦和样品非特异性结合就会形成一个信号, 混淆染色体上基因的检测, 就需要剪切成小片段 < 200 核苷酸。现在检测手段的提高以及检测软件的不断发展使得 FISH 技术的检测要求越来越低, 灵敏度越来越高。精确的计算机图片处理算法的不断改进形成了亚显微水平的探针高分辨技术。随着检测目标越来越小, FISH 技术已用于隐蔽的亚端粒核型基因重排和精确的染色体作图及单拷贝 mRNA 的检测。

FISH 检测范围的扩大, 使得 FISH 技术的应用在 20 世纪 90 年代急速增长。由 FISH 技术应用而形成的分支技术实现了越来越多的不同类型位点同时检测。首先是采用不同的荧光素来检测多位点, 如双色荧光用于检测特异的核酸序列, 每一条染色体、基因或者转录产物分别由一种可以分辨的荧光信号来表示。之后是采用两种色彩译码方案进一步扩大

了 FISH 应用范围。译码方案主要是针对色彩比例，即每一种颜色在总颜色中所占的比例来描绘多位点。前述的每一种方法，或是两种方法的结合都已经将可检测位点多达 12 个。采用计算机翻译的五色方案可同时检测出人类所有染色体代表着 FISH 技术多位点检测的里程碑。尽管可以采用多种方法观测到 mRNAs，但是 FISH 对整个转录产物的原位分析似乎更有应用前景。色彩译码技术已经实现了对整个组织的检测。

2 FISH 技术的定量分析阶段

Pinkel 等（1986）首次将荧光图像定量分析用于基本细胞遗传检测，采用双色激发块装置照相机检测荧光信号，而且定量分析技术很快用于了 mRNA 检测。荧光检测的关键是信号的重现性、无规律性及背景的自发荧光。不仅不同的样品之间荧光不同，而且同一载玻片上的材料或者同样的细胞都有可能显示出不均衡的荧光。目前已有多种方法用于消除一些组织中的自发荧光：如样品制备过程中，采用的消除自发荧光试剂包括硼氢化钠或者采用光照辐射进行预处理以消除非特异性背景信号。这些消除自发荧光的方法并不完全有效，通常在进行图像分析时通过计算机算术除去自发荧光信号。荧光图像的光谱数据包括真正的信号和许多杂噪，分别进行分析并且通过单独的光谱组分分析除掉杂噪数据。多色 FISH 有自身的限制，包括不同的荧光强度和颜色重叠。但是通过计算机算法分析平衡了多色图像，包括强度变化和自动纠正信号重叠。

FISH 图像自身的限制并没有影响到自动破译算法的发展。采用序列较大探针进行 DNA 位点检测和多色荧光计数算法辅助病理学家实现了自动化分析。此外，检测探针试剂盒和点计数方法的应用为便捷的检测结果提供了一个平台。尽管多种方法已经用于分析或优化自动细胞检测系统，人工的细胞病理检测仍是可信度高的组织分析方法。然而，细胞制备、鉴别、固定介质上细胞样品计算机化检测在未来的医学诊断

中的高效益性不容忽视，快速检测细胞内的分子信号只有通过计算机辅助方法进行检测。现在，自动化检测程序已经扩展到采用多基因转录模型检测特异的 DNA 簇和转录位点以确定功能细胞的状态。

3 FISH 技术检测领域的发展

鉴于 FISH 起始阶段的发展主要是探针类型和检测位点的扩展，荧光检测技术将来的发展可能包括检测领域的扩展。荧光图像临床诊断应用需要在检测体系上进一步提高，如探针的结合，照相和分析的自动化，因此避免了不同操作间的误差。样品厚度是荧光显微镜检测样品类型的一个限制因素。近来的激光共聚焦显微镜和光学 X 射线断层摄影技术要求样品厚度达到 1~2mm。一种改进的光学投射 X 显微断层摄影技术可以获取到 15mm 厚样品的图像扩大了生物学和诊断样品的检测范围。活细胞的 RNAs FISH 技术检测也有报道。既可以采用体内释放的荧光集团也可以采用杂交后探针的荧光素进行检测。这两种新方法都可以降低非特异性标记探针存在时的高背景（如活细胞），可以用于追踪 mRNA 的合成和转移途径。这些方法较绿色荧光蛋白（Green fluorescence protein, GFP）更易于检测不同靶分子。相对于 GFP 活细胞原位杂交检测，FISH 易受到细胞内合成探针的影响。FISH 需要进一步的改进以降低活体基因表达检测时的干扰背景，避免细胞内自身杂交物的干扰。其实完全可以不必考虑 FISH 检测和荧光检测蛋白技术的差异，将 FISH 技术和荧光蛋白技术结合起来可以同时检测目的核酸和蛋白。

多光子显微技术的应用进一步扩大了荧光图像的应用范围。采用多光子显微镜，激光块可以发射光子聚焦于显微镜两到三次激发目的荧光素。采用近红外激发光可以更深层次穿透生物样品，比可见光对活体样品造成的毒性低。这种新方法的应用已将荧光图像用于活体系统的检测，甚至整个动物体。由于还不能合成生物体标记探

针，因此目前生物体内荧光图像的应用只限于检测荧光分子或生物体自发荧光。生物组织在正常的生理或者病理生理过程中产生的自发荧光信号可以作为一种重要的诊断信号。一旦生物体探针成为可能，将会成为鉴别特异核酸序列，进行非入侵诊断，获取诊断图像的一种有力辅助手段。