技术方法

文章编号:1000-5404(2009)04-0464-03

激光捕获显微切割-单细胞 PCR 技术的应用研究

匡晓燕[1],陈 芳[2],郭家林[1],陈 倩[1],李龙萍[3],王全义[4],邓 飞[1] ([1]遵义医药高等专科学校病理科,贵州 遵义 563002,[2]遵义医学院附属肿瘤医院肿瘤科,贵州 遵义 563003;[3]遵义市妇女儿童医院病理科,贵州 遵义 563000;[4]济宁医学院附属金乡医院病理科,山东 济宁 272200)

摘 要:目的 建立一套优化的激光捕获显微切割-单细胞聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术,应用于分子组织学研究中单细胞基因的检测。**方法** 从淋巴结反应性增生冷冻组织切片中,应用激光捕获显微切割获取1~10个淋巴细胞,采用优化的单细胞 PCR 反应体系和条件进行β-珠蛋白基因检测。**结果** 单轮常规 PCR 各组多细胞的扩增阳性率比较无显著性差异($P>0.05$),而单细胞的扩增阳性率低于各组多细胞,有显著性差异($P<0.01$);半巢式降落式 PCR 的单细胞扩增阳性率高于单轮常规 PCR,有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 联合应用优化的激光捕获显微切割及半巢式降落式 PCR 技术,显著提高了单细胞 PCR 的敏感性、特异性和稳定性。

激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)联合单细胞 PCR 技术应用于肿瘤基因组学的研究[1]是一个划时代的发展,但该技术在单细胞的分离、收集和 DNA 扩增等方面均存在相应的难度。本实验进行相关技术的应用研究,旨在建立一套优化的 LCM-单细胞 PCR 技术,以期为国内分子组织学研究中单细胞基因检测提供相应的技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验取材

10例淋巴结反应性增生(Lymphnode with reactive hyperplasia, LRH)新鲜冷冻组织,取自2005年6月至2006年3月遵义医学院附院病理科临床送检标本。

1.2 实验仪器

激光捕获显微切割机(LeicaASLMD. Germany):由显微镜、激光发射器、激光控制仪、显微镜平台操纵控制器、辅助摄像机和彩色监视器,以及控制切割过程与储存数据的其他电脑软件等组成。

1.3 PCR 试剂

无核酸酶高纯水、Hotstart DNA 聚合酶为美国 Promega 产品,dNTP、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、蛋白酶K等均购自上海 Sangon 公司。β-珠蛋白基因引物 HBB. P2.1、HBB. P2.2、HBB. P5 由上海 Sangon 公司合成(引物序列来自基因数据库"http://gdbwww.gdb.org")。具体见表1。

表1 β-珠蛋白基因引物序列

引物名称	引物序列(5′→3′)	T_m 值	位点
HBB. P2.1	GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA	63.6	-129 nt
HBB. P2.2	GCTAGTGAACACAGTTGTGT	55.8	33 nt
HBB. P5	AATCTACTCCCAGGAGCAGG	59.85	-74 nt

1.4 实验方法

1.4.1 专用冷冻切片的制备 LCM 专用热塑性乙烯乙酸乙烯酯(ethylenevin ylacetate, EVA)膜载片紫外线消毒后经多聚赖氨基酸处理。使用一次性切片刀,切片厚度10 μm,基本同常规冷冻切片制备过程。

1.4.2 单细胞显微切割 带 EVA 膜切片不封片,组织块附着面向下放置。在收集器支架上安放200 μl PCR 管,管盖打开向上,朝向切片上组织块附着面。管盖内加入14 μl 无核酸酶高纯水,每管取1~10个淋巴细胞。单细胞显微切割的完成(图1)决定于激光参数的调控,10 μm 厚组织切片中单细胞显微切割的激光参数优化组合见表2。

表2 10 μm 厚组织切片中单细胞显微切割激光参数

物镜倍数	激光参数			焦点设置
	孔径	强度	速度	
40	2~4	32~42	4	40
63	2	32~42	2	52

1.4.3 观察管内单细胞 激光切割下单细胞后,调节焦面至管盖内液平面的位置,移动视野全面观察。调节焦面至清晰成像时,经软件中"Learn Inspection Setting"保存对焦面的校准。单细胞在液体中发生游动,故高倍镜成像后迅速点"Frozen",捕获、保存图像。

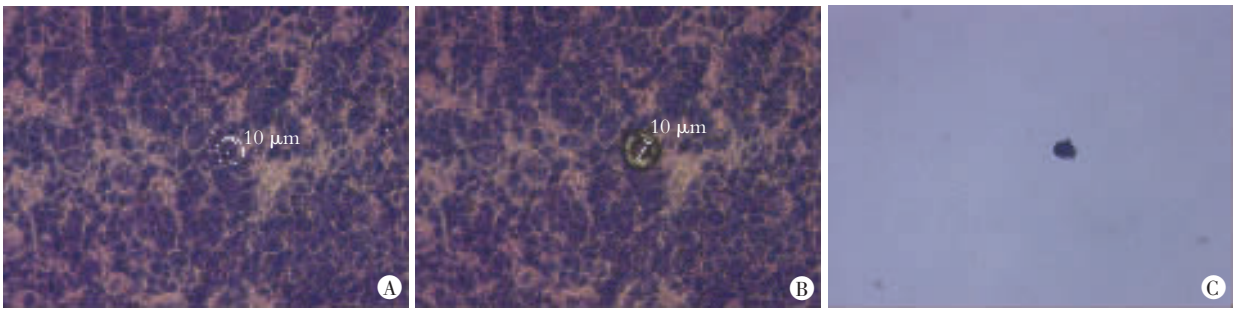
1.4.4 单细胞 DNA 提取 收集管取下后12 000 r/min 高速离心20~30 s,使管盖内含单细胞的液体沉积管底。加入5 mg/ml 蛋白酶K消化液1 μl,终浓度约为333 mg/L。55 ℃水浴2~3 h,之后95 ℃10 min 灭活蛋白酶K,离心后总体积15 μl 的模板原液一次性用于 PCR。

基金项目:贵州省优秀青年科技人才基金(2000371,200298);贵州省科学技术基金(2000-3-43)
Supported by the Outstanding Young Technological Talent Foundation of Guizhou Province(2000371、200298) and the Science And Technology foundation of Guizhou Province (2000-3-43)

作者简介:匡晓燕,女,贵州省遵义市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤病理方面的研究。电话:(0852)8923776,E-mail:kxy0326@yahoo.com.cn

通信作者:邓 飞,E-mail:mdproffeideng@hotmail.com

收稿日期:2008-06-05;修回日期:2008-07-09



A:切片中单细胞切割前; B:切片中单细胞切割后; C:收集管盖内单细胞

图 1　LCM 单细胞显微切割　(HE×630)

1.4.5　单细胞 β-珠蛋白基因扩增　　PCR 反应体系: 用无核酸酶高纯水,总体积 25 μl,10×Buffer 2.5 μl,$MgCl_2$ 2.5 mmol/L, dNTPs 200 μmol/L, Hotstart DNA 聚合酶 1.25 U,BSA 1 g/L,引物 0.5 μmol/L。单轮常规 PCR 引物为 HBB. P 2.1 和 HBB. P 2.2,半巢式降落式 PCR 首轮扩增引物同前,第 2 轮以 1 μl 首轮扩增产物作模板,引物为 HBB. P 5 和 HBB. P 2.2;PCR 反应条件:热启动,95℃预变性 10 min。单轮常规 PCR 95 ℃ 变性、55 ℃ 退火、72 ℃ 延伸各 60 s,循环 50 次,72 ℃ 后延伸 7 min;半巢式降落式 PCR 变性、延伸同前,首轮扩增 73 ℃、70 ℃、67 ℃、64 ℃、61 ℃、58 ℃,退火循环各 7、7、9、9、5、5 次,总循环数 42 次;第 2 轮扩增各退火温度循环各 6 次,总循环数 36 次。

1.5　统计学处理

实验数据的分析采用 SPSS 12.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

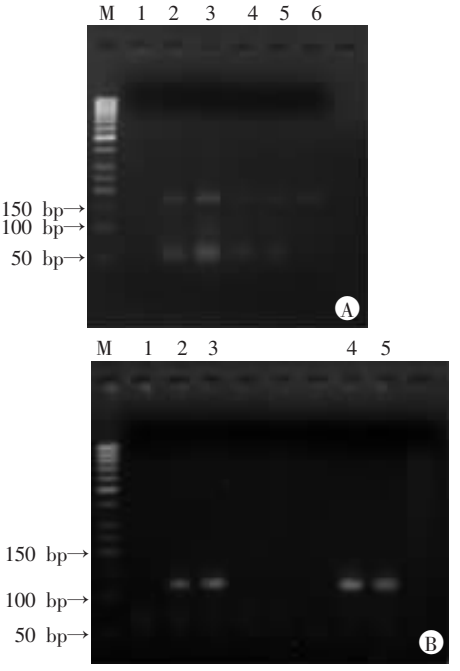
PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察。以高纯水代替模板为空白对照,LRH 新鲜组织 DNA 模板为阳性对照。单轮常规 PCR 目的 DNA 条带为 162 bp (图 2A),10、7、5、1 个细胞的扩增阳性率分别为 54.55%、43.75%、43.33%、5%。各组多细胞的扩增阳性率比较差异无显著性(χ^2 = 0.44, P = 0.8 029),而单细胞的扩增阳性率低于各组多细胞,有显著性差异(χ^2 = 32.74, P < 0.01)(表 3);半巢式降落式 PCR 目的 DNA 条带为 107 bp(图 2B),半巢式降落式 PCR 单细胞扩增阳性率为 42%,高于单轮常规 PCR 单细胞扩增阳性率(5%),有显著性差异(χ^2 = 27.12, P < 0.01)(表 4)。

表 3　不同细胞数的单轮常规 PCR 扩增阳性率

细胞数	收集管数	阳性管数	阳性扩增率(%)
10	11	6	54.55
7	16	7	43.75
5	30	13	43.33
1	80	4	5.00

表 4　不同单细胞 PCR 方法的扩增阳性率

PCR 方法	收集管数	阳性管数	阳性率(%)
单轮常规 PCR	80	4	5
半巢式降落式 PCR	50	21	42



A:1 – 10 个细胞单轮常规 PCR 扩增产物　M: 50 bp 梯度 DNA 标准; 1:空白对照;2:10 个细胞;3:阳性对照;4 ~ 6:1 个、5 个、7 个细胞

B:单细胞半巢式降落式 PCR 扩增产物　M: 50 bp 梯度 DNA 标准; 1: 空白对照; 2 – 4:1 个细胞;5:阳性对照

图 2　β-珠蛋白基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

3　讨论

3.1　应用 LCM 的技术难点

3.1.1　调控激光切割质量　　激光参数值的设定直接影响单细胞显微切割的完成质量,操作者需根据待切割组织切片的厚度、性质(石蜡或冷冻),以及靶细胞的数量、大小、细胞间距等影响因素,调控对应的激光参数。单细胞切割的激光参数宜采用低孔径和低速度值,有利于单细胞的精确分离。与相同厚度的石蜡切片比较,切割冷冻切片中单细胞所需激光的强度需相应提高,因为冷冻切片组织水分较多,细胞间粘性较高。

3.1.2　保证单细胞收集率　　切割时质量轻微的单细胞在激光冲击下可能飘出收集管外, 还可能由于静

电的作用吸附至切片上 EVA 膜的表面,导致单细胞收集率的下降。保持一定的环境湿度,并采用偏低强度的激光对单细胞叠加切割,可有效控制静电作用以及激光冲击力导致的细胞飘失,保证单细胞收集率。

3.1.3 监视收集管内单细胞 Leica ASLMD 收集管盖底面与高倍镜头间的距离超过观察成像的距离,在管盖内加入一定量的高纯水,形成一定高度的液平面,可有效缩短管盖底面与高倍镜头的间距,能获得管盖内水面上单细胞的清晰镜下观。管盖内加水还可避免干燥状态下单细胞因静电吸附作用难以离心至管底。由于液体表面张力的作用,管盖内周边水面略低于中央区,因此,由中央区转至边缘区观察时,需不断精细地调节焦面,避免监视过程中遗漏粘附于管盖周边内壁的单细胞。

3.2 应用单细胞 PCR 技术的难点

3.2.1 优化组合 PCR 反应体系 本实验研究结果显示,即使检测同样的基因,扩增组织 DNA 模板的 PCR 反应体系也是不适用于扩增单拷贝或低拷贝 DNA 模板的。本实验结果还提示,经相同的单轮常规 PCR 扩增,单细胞的扩增阳性率显著低于多细胞。因此,必须对单细胞 PCR 技术进行多方面的优化。本实验通过设置浓度梯度的方法, 摸索单细胞 PCR 反应体系。本实验组单细胞 PCR 适宜高浓度的 Mg^{2+}、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶以及中位浓度的引物,而其他研究组单个培养细胞或体液细胞的 PCR 反应体系一般为低浓度[2]。分析其间的差异,可能是由于取自组织切片中的细胞模板,受到苏木精染色剂的影响作用。有研究报道苏木精染色剂与 DNA 结合不仅影响蛋白酶对细胞的消化,还可影响、抑制 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 和 *Taq* DNA 聚合酶的活性[3]。

3.2.2 选用适宜的 PCR 佐剂 PCR 优化技术中,一系列 PCR 佐剂被用于提高 PCR 的扩增产量、特异性和稳定性。单细胞 PCR 要求反应体系灵敏、高效,除了保证足够的有效循环次数,选用适宜的 PCR 佐剂对于该技术的优化也非常重要。PCR 佐剂的种类和工作浓度不同,对具体 PCR 反应体系的作用也存在差异。有国外资料报道[4],一定浓度的 BSA 不仅能提高 PCR 的扩增效率,还可作为一种酶保护剂稳定 Taq DNA 聚合酶的活性,被应用于扩增古生物微量 DNA 以及含 PCR 抑制剂的 DNA 模板。本研究表明,常用的 PCR 佐剂,如 5% 的二甲基亚砜和甘油,对单细胞 PCR 的优化无明显作用,而选用 1 g/L 的 BSA 作为 PCR 佐剂,可显著提高单细胞 PCR 的扩增率。

3.2.3 保证靶基因扩增的特异性 与组织 DNA 模板的扩增相比,单拷贝和低拷贝靶基因的扩增,更可能在低退火温度下形成引物二聚体或其他非特异性扩增产物[5]。因此,必须在提高单细胞 PCR 灵敏度的同时保证 DNA 扩增的特异性。本实验选用高保真 Hotstart DNA 聚合酶,联合巢式 PCR 和降落式 PCR 技术,保证单细胞 PCR 的特异性。降落式 PCR[6] 针对退火温度参数进行优化,设定高于 Tm 值 5 ℃的上限温度和低于 Tm 值 10 ℃的下限温度,形成一个跨越 15 ℃的退火温度范围,在此范围内以梯度式的温差降落,完成退火温度的循环。从高退火温度开始反应,使得靶基因序列的扩增占主导地位,能有效抑制低退火温度下非特异性产物的形成。

3.2.4 严格控制污染 LCM-单细胞 PCR 技术应用过程中,必须严格控制污染。本实验室除了加强人员隔离、试剂隔离、以及工作间和器材的消毒外,每次实验从细胞切割开始至 PCR 结束设立一个全程监控的空白对照管。若出现污染的 DNA 条带,则分别设置 3 个空白对照管,分段监测、查找单细胞提取、消化、PCR 过程中的污染源。

总之,本实验通过改善 LCM 单细胞分离和收集技术,选用 PCR 佐剂 BSA 并优化 PCR 反应体系,联合应用半巢式 PCR 和降落式 PCR 技术,保证了单细胞 PCR 的敏感性、特异性和稳定性。

关键词:激光捕获显微切割;单细胞;半巢式降落式 PCR
中图法分类号:R446 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 闫 峰, 李宗芳. 激光捕获显微切割技术应用研究新进展[J]. 癌症, 2004, 23(7): 860 - 864.

[2] Ren Z, Zhou C, Xu Y, *et al*. Mutation and haplotype analysis for Duchenne muscular dystrophy by single cell multiple displacement amplification[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(6): 431 - 436.

[3] Chen J T, Lane M A, Clack D P. Inhibitom of the polymerase chain reaction in Papanicolaou stain. Removal with a simple destaining procedure [J]. Acta Cytol, 1996, 40(5): 873 - 877.

[4] Weissensteiner T, Griffin H G, Griffin A. PCR technology: current innovations [M]. 2nd ed. NewYork: CRC Press, 2004: 5 - 51.

[5] Piyamongkol W, Bermudez M G, Harper J C, *et al*. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis [J]. Mol Hum Reprod, 2003, 9(7): 411 - 420.

[6] Sessa R, Schiavoni G, Di-Pietro M, *et al*. Chlamydia pneumoniae in PBMC: reproducibility of the OMPA nested touchdown PCR[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2005, 18(1): 113 - 120.

(编辑 栾 嘉)