

单细胞逆转录 PCR 研究方法及其应用

Single cell RT-PCR technique and its application

熊杰¹, 夏照帆^{1*}, 韩玲²

(1. 第二军医大学长海医院烧伤科, 全军烧伤研究所, 上海 200433; 2. 第二军医大学海军医学系放射医学教研室)

[摘要] 高等动物的基因表达分析往往受制于大量纯化同质细胞的取材困难, 由于细胞异质性的影响, 常规研究方法也无法识别细胞间表达特性的差异。单细胞水平是切实表明综合性基因表达最行之有效的研究途径, 而单细胞逆转录 PCR 又是该水平上基因表达研究最有力的工具。与常规 RT-PCR 相比, 该技术在各个环节上都有着显著差异。为此, 详尽论述了单细胞逆转录 PCR 技术在各个环节上的要点包括显微操作、扩增和分析方法、基本注意事项等内容以及该技术在实际科研中的应用情况。

[关键词] 单细胞; 逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R 34-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0332-03

发育、细胞生长、分化和癌变等过程与全基因组表达的选择性激活和时空调节密切相关, 因此这些过程中基因表达模式的改变已成为当今生物学的热点之一。高等动物作为高度分化的系统, 其基因表达分析往往需要大量纯化的同质细胞, 一般要求细胞数量在 10^6 以上, 这无形中就增加了实验研究的难度, 特别是对于那些来源极其有限的珍贵样本就更为明显。尽管原位杂交/PCR 能检测到未纯化细胞中的 RNA 或蛋白, 但前提是目的细胞能通过可见的或位置标记加以确认, 并且每次只能检测单个已知基因, 从而限制了这些技术的应用范围。消减杂交、差异显示等技术虽可研究多基因表达的异同, 但是需要大量的同质细胞提取 RNA 以制备探针。同时, 由于细胞异质性的影响, 采用常规方法获取的细胞, 其研究结果只能说明一个细胞群中基因表达的大致情况, 而那些导致了细胞分型甚至细胞间惟一差别的表达特性却不能得知。此外, 基因表达绝不是孤立的, 由基因表达决定的细胞特性, 其实是许多基因表达产物相互结合和相互作用的结果。而要能切实的表明这种综合性的基因表达, 在单细胞水平上进行研究无疑是最行之有效的途径^[1]。PCR 方法凭借其极为灵敏的检测水平, 已经使得分析单个细胞的基因组 DNA 或 mRNA 已成为可能^[2-3], 单细胞 RT-PCR 的出现则为该水平上的基因研究提供了最有力的工具。

1 单个细胞的获取

要进行单细胞 RT-PCR, 如何获取单个细胞就显得至关重要, 单个细胞的获取需要非常高的准确性, 这与仪器设备的精度和操作者的熟练水平是密切相关的。目前获取单个细胞的方法大致有 4 种。

第一种是利用膜片钳技术吸取单个细胞^[4]。膜片钳技术为此提供了较为理想的方法, 该技术既可对单细胞的电生埋功能进行研究, 同时亦可借助膜片钳电极所形成的吸收通道, 吸取单个细胞, 对其进行单细胞水平的分子生物学研究。在相差显微镜观察下, 可以借助于膜片钳电极, 直接用电极将待选取的单个细胞吸取出来, 将其转入 Eppendorf 管中, 然后可用去污剂将吸取细胞的细胞质膜溶解, 同时注意保持

溶出核膜的完整, 再通过离心, 就可将细胞核和核内所含有的基因物质分离出来。

第二种提取单个细胞的方法是采用与流式细胞技术结合的荧光激活细胞分类技术(FACS)来获取单个细胞^[5]。该技术方法分离细胞的效果更好, 可快速、准确地分离单个细胞, 或分离任何数量的同一种类细胞。而且通过 FACS 分离的细胞, 还可在对其含有的基因进行分析之前, 对其功能加以研究。因为此方法应用对细胞具有选择特异性的荧光探针, 所以可在选择分离细胞的同时, 就该细胞的细胞周期、质膜特性、细胞表面或胞质内的特异性标记等方面, 综合地进行多指标的研究。

第三种方法是采用激光显微切割技术从组织切片中直接分离获取单个细胞^[6]。该方法将激光技术与显微切割相结合, 可从实体组织的染色切片中, 得心应手地获取单个细胞。具体地说, 该方法借助于激光器发射一定能量的激光, 从而使组织切片中(冰冻切片或石蜡切片)待取的单个细胞和其周围的组织细胞分离。然后, 再借助一个特定的微型探针, 将待检的细胞挑取出来。通过该技术方法取得的单个细胞, 其核酸降解程度亦非常的低^[7]。

最后一种方法就是从单细胞悬液中直接实施显微操作吸取单个细胞^[8]。在采用过滤、酶消化等方法制备得到单细胞悬液后, 可以在倒置相差显微镜下直接利用显微操作系统的微吸管吸取单个细胞。上述几种方法相比各有利弊, 具体采用哪种方法还应当取决于人力、物力、资金等实际条件。

2 单细胞 RT-PCR 的扩增和分析方法

由于单个细胞中的 mRNA 数量很少, 大约只有 1 pg 左右, 因而与常规的 RT-PCR 相比, 单细胞 RT-PCR 在各个环节上都有着显著差异。常规 RT-PCR 首先要将组织中的

[基金项目] 国家自然科学基金(30571921)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571921)。

[作者简介] 熊杰, 博士生, E-mail: xiongjie1979@smmu.edu.cn

* Corresponding author. E-mail: xiazhaofan@hotmail.com

mRNA 或总 RNA 抽提出来之后才能进行后续步骤,单细胞 RT-PCR 显然无法进行抽提步骤,因而在获取单个细胞后,在适当体积的裂解液中将细胞裂解,然后直接以裂解产物为模板进行 RT-PCR。由于没有抽提,裂解产物中含有蛋白质、RNA 以及基因组 DNA 等各种成分,蛋白质因其量极其稀少,可以忽略对单细胞 RT-PCR 的影响,但裂解产物中的基因组 DNA 相对于 mRNA 却有可能造成极大的干扰。避免这一影响有两种处理,一是在进行逆转录之前先用 DNAase I 消化基因组 DNA,另一种方法就是在设计 PCR 引物时尽量使引物结合序列跨越相邻外显子的结合处^[9]。

由于起始模板数量很少,单细胞 RT-PCR 必须采用最适当和最有效的措施进行扩增,才能够得到理想的产物。应用传统的单对引物对单细胞中的目的 mRNA 进行一轮 RT-PCR 扩增,得到的产物并不够理想,往往不能保证扩增后得到足够的产物量,因而便会影响 PCR 扩增后检测结果的客观性,甚至有可能得不到所希望的结果。而且,在这种单对引物 RT-PCR 扩增过程中,也容易出现一些尽管少见、但稳定性很差的转录产物^[10]。如果采用嵌套设计的两对巢式 PCR 引物,进行两轮 RT-PCR 扩增,则扩增后得到的产物量和可靠性就会大大提高。嵌套式 PCR 扩增方法,需要设计两对嵌套式 PCR 引物,一对为外引物,另一对为内引物。当取得单个细胞后,先将其 mRNA 逆转录成 cDNA,然后对反转录后的 cDNA 进行先后两轮的扩增。即先扩增外引物所包含的 cDNA 片段,然后再将此第一轮扩增产物,依内引物所包含的 cDNA 片段进行增量扩增,这样便会使非常少量的模板,得到足够量的产物。两轮 PCR 扩增反应完成之后,对产物进行凝胶电泳检测,从而便可依电泳结果,判断明确待测基因是否在单个细胞中表达。嵌套 PCR 方法扩增后产物的稳定性明显提高,并且还用来分析同源基因的位点和亚位点。然而,嵌套 PCR 方法有时也会出现扩增产物失败的情况,并且设计有效和协调的嵌套 PCR 引物也存在一定困难。此外,在大多数情况下,嵌套 PCR 扩增后,所取得的分析结果一般仅限于待测基因中相当局限的下游片段,而基因其他区域潜在的多种特征性信息则有可能丢失^[11]。

如果要完整地获得单个细胞中表达的基因信息,则应该对细胞中所有表达的 mRNA 进行分析,这就需要对包括加尾在内的所有 mRNA 进行整体扩增,Brady 等^[12]创立的 Poly(A)PCR 方法通过序列非依赖性扩增全细胞 cDNA 得以实现这一目的。该法以含有 Poly(A)的 mRNA 为模板,以 Oligo(dT)₁₉₋₂₄ 为引物合成 cDNA 第一链,在第二步中用末端转移酶加上一个 3' Oligo(dA)尾,这样产生出的 DNA 其两端都已确定并且可用含有 Oligo(dT)的单一引物进行扩增。第一个 PCR 循环扩增合成 cDNA 第二链,随后进行标准的 PCR 程序。PCR 引物除含有 Oligo(dT)₂₄ 外,还有一额外碱基序列以提高退火的特异性并且为以后克隆提供方便的限制性酶切位点。在将扩增得到的 cDNA 池用于其他目的之前,验证其代表性是非常重要的。通常可用 Southern 印迹法或 PCR 检测一个普遍高表达基因(如 β -actin)和一个普遍低表达基因(如 DPH2L),由此判断 Poly(A)PCR 是否对高低表达的基因均进行了有效的扩增,另外还需检测在目的细胞

中特异表达的两个基因以进一步鉴定所挑取的细胞是否为需要的^[13]。

也有研究者建立了一种三元尾端 PCR 扩增方法(three-prime-end amplification, TPEA),先对单个细胞中表达的所有 mRNA 的大多数 3' 尾端进行整体性扩增,然后再对待测基因进行一次传统的 PCR 扩增,以测定任何基因的表达或缺失。TPEA 方法相对比较容易操作,并且能够测定单个细胞中所有基因的表达信息^[14]。

3 单细胞 RT-PCR 的注意事项

由于研究对象是单个细胞,因而要严格防止污染。PCR 的敏感性极高,微量的 DNA 污染也会导致假阳性,为此应当采取以下措施:(1)进入单细胞操作室前进行风淋,在准备室内换上专用制服和工作鞋,戴上手套。除必要器材外,其他实验室的物品不得带入单细胞室;(2)吸头、移液器、试剂等所有物品为单细胞室专用,并且要经过严格的除 RNA 酶处理;(3)吸取单细胞时所需的微吸管必须经高温消毒,每挑选一个细胞更换一次微吸管;(4)PCR 反应前各种试剂的配制、加模板、PCR 反应、电泳检测 PCR 产物分别在不同房间进行;(5)全部反应应尽可能的减少反应管的用量,并且无任何抽提过程,以减少样本的丢失和外源性污染。其他措施还包括经常更换手套(尤其是在接触 DNA 模板的 PCR 产物后),采用防止气溶胶的一次性吸头等。此外还必须平行设立不吸取细胞的空白对照和不加逆转录酶的内对照,以检测外源性 DNA 和基因组 DNA 的污染。

4 单细胞 RT-PCR 的应用

单细胞 RT-PCR 方法的应用前景非常广阔。首先,单细胞 RT-PCR 方法可用于对混合细胞性的实体组织中,研究具体某种类型细胞的基因和其基因的表达。血液中细胞成分的种类很多,但由于血液中各种细胞原本便是分散的,因此现已有各种方法,将具体种类的血液细胞分离,对特定种类的血细胞进行研究。而实体组织细胞,尤其是有多种类型细胞混合的实体组织细胞的分离比较困难,因此采用单细胞 RT-PCR 方法,明确地研究鉴定实体组织中具体类型的细胞,其意义自然非常重大。

第二,单细胞 RT-PCR 方法在受体研究方面也有非常重要的意义。运用单个细胞进行其受体的细胞生物学或分子生物学研究,则较之传统的多细胞研究方法,可获得更多的受体信息。在对亲离子性谷氨酰胺受体(GluR)的研究中,选择性采用多个谷氨酰胺受体亚型基因,设计嵌套 PCR 引物进行单细胞 RT-PCR 扩增,证实海马神经元中皆表达 GluR6 亚单位 mRNA,而 GluR5 只在部分神经元细胞中表达,GluR7 则不在海马神经元表达。还有学者报道,以不同的烟碱样乙酰胆碱受体类似剂作用于大鼠大脑新皮质神经元,可选择性激活共表达血管活性肠肽和胆囊收缩素的中间神经元,并通过单细胞 RT-PCR 发现,接受受体类似剂作用的中间神经元,具有包含 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 和 $\beta 2$ 亚单位的烟碱样受体,从而阐明了由乙酰胆碱介导的、调节皮质血流的分子结构基础^[15]。

第三,单细胞 RT-PCR 方法在离子通道研究方面亦是意义十分重大的工具。目前,对于细胞电生理研究的广度和深度都在不断加大,脑研究方面的许多神经元细胞或非神经元细胞,都是通过离子通道研究来获取其功能性认识的。如细胞中 K^+ 通道的类型较多,而且不同类型的 K^+ 通道都存在多种亚型。因此,研究具体神经元细胞中相应通道蛋白的存在与否,以及研究不同处理因素作用于细胞,所引起的离子通道蛋白的改变,都可很好地借助于单细胞 RT-PCR 方法,从而准确地鉴别特定细胞中表达的各种离子通道和其亚型^[16]。

另外,在基因表达研究方面,从群体细胞水平转向单细胞水平研究的深入发展也有着独特意义。由于细胞异质性的影响,采用常规方法获取的细胞,其研究结果只能说明一个细胞群中基因表达的大致情况,而那些导致了细胞分型甚至细胞间惟一差别的表达特性却不能得知,这在神经生物学和分子免疫学研究方面尤其常见。单细胞 RT-PCR 特别是近年来实现的单细胞荧光定量 PCR 技术无疑为这一水平上的研究提供了强有力的工具^[17]。

一般来说,在研究基因表达的实验中,得到阴性结果没有太大意义。然而,由于单细胞 RT-PCR 能将表达的一个拷贝 mRNA 检测出来,因此,如果通过设立适当的对照性对照,则可得到真正在单细胞中表达的阴性结果。对于单细胞 RT-PCR 方法来说,不足之处在于它必须是对于已知序列的基因进行检测,即使将来明确了人类所有的基因,仍旧需要对成百上千个基因进行检测。因此,希望未来能开发出有效检测海量信息的 cDNA 基因芯片,以最大限度地获得细胞中基因表达的复杂信息^[18]。

[参考文献]

- [1] Xu L, Enyeart J J. Properties of ATP-dependent K^+ channels in adrenocortical cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280:C199-C215.
- [2] Gyllensten L H, Cui X, Saiki R K, et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells[J]. *Nature*, 1988, 335:414-417.
- [3] Rappolee D A, Wang A, Mark D, et al. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells[J]. *J Cell Biochem*, 1989, 39:1-11.
- [4] Nissant A, Lourdel S, Baillet S, et al. Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287:F1233-F1243.
- [5] Hewitt Z, Forsyth N R, Waterfall M, et al. Fluorescence-activated single cell sorting of human embryonic stem cells[J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8:225-834.
- [6] Wang K, Lau T Y, Morales M, et al. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus DNA in human trigeminal ganglia at the single-cell level[J]. *J Virol*, 2005, 79:14079-14087.
- [7] Keays K M, Owens G P, Ritchie A M, et al. Laser capture microdissection and single-cell RT-PCR without RNA purification[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 302(1-2):90-98.
- [8] 熊杰, 韩玲, 高伟, 等. ^{60}Co γ 射线照射对人脆性组胺酸基因表达的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26:471-475.
- [9] Brady G. Expression profiling of single mammalian cell-small is beautiful[J]. *Yeast*, 2000, 17:211-217.
- [10] Volgin D V, Swan J, Kubin L. Single-cell RT-PCR gene expression profiling of acutely dissociated and immunocytochemically identified central neurons[J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 136:229-236.
- [11] Grabs D, Bergmann M. Differential appearance of dynamin in constitutive and regulated exo-endocytosis: a single-cell multiplex RT-PCR study[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 322:237-244.
- [12] Brady G, Barbara M, Iscove N N. Representative *in vitro* cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies[J]. *Methods Mol Cell Biol*, 1990, 2:17-25.
- [13] Brady G, Iscove N N. Construction of cDNA libraries from single cells[J]. *Method Enzymol*, 1993, 225:611-622.
- [14] Hanna M C, Calkins D J. Expression and sequences of genes encoding glutamate receptors and transporters in primate retina determined using 3'-end amplification polymerase chain reaction[J]. *Mol Vis*, 2006, 12:961-976.
- [15] Ruano D, Lamblez B, Rossier J, et al. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing[J]. *Neuron*, 1995, 14:1009-1017.
- [16] Porter J T, Cauli B, Tsuzuki K, et al. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors[J]. *J Neurosci*, 1999, 19:5228-5235.
- [17] Wagatsuma A, Sadamoto H, Kitabashi T, et al. Determination of the exact copy numbers of particular mRNAs in a single cell by quantitative real-time RT-PCR[J]. *J Exp Biol*, 2005, 208(Pt 12):2389-2398.
- [18] Lin S L, Ji H. cDNA library construction using *in vitro* transcriptional amplification[J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 221:93-101.

[收稿日期] 2006-10-31

[修回日期] 2007-02-01

[本文编辑] 曹静