



## 原位逆转录PCR检测干细胞因子mRNA 在白血病细胞的表达

干细胞因子(stem cell factor, SCF)是一种早期阶段的多系造血刺激因子,对正常造血调控具有重要作用。SCF来源非常广泛,在人类除骨髓基质细胞外,皮肤、胎盘组织和部分起源于造血组织的癌细胞系都有表达。有文献报道骨髓基质细胞是SCF的主要来源,但其mRNA拷贝数仅为 $9 \pm 3$ [1]。推测其他细胞的表达量会更低,所以一般方法难以检测。逆转录PCR(RT-PCR)技术可检测低拷贝或单拷贝的mRNA,但不能体现细胞的形态结构特征。原位PCR技术不仅可以检测组织切片或完整细胞中的单个拷贝DNA或RNA,同时还能判断含有靶序列的细胞类型及其形态结构,结合图象分析,可以对靶序列进行定量分析。本研究旨在探索应用原位RT-PCR检测低拷贝的SCF mRNA在白血病细胞表达的可行性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞培养及骨髓单个核细胞的分离

人红白血病细胞株K562、人中幼粒白血病细胞株HL-60和小鼠成纤维细胞株NIH3T3按常规方法培养。取肝素抗凝的骨髓 $2 \sim 3$  ml,密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞。

#### 1.2 细胞离心涂片

收集培养 $2 \sim 3$  d的K562、HL-60和NIH3T3细胞各 $(1 \sim 2) \times 10^5$ ,PBS洗涤3次,1 000 r/min离心5 min,涂片,4%多聚甲醛固定20 min,10  $\mu$ g/ml蛋白酶K消化 $10 \sim 15$  min。取分离后的骨髓单个核细胞 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 离心涂片,其余步骤同上。

#### 1.3 寡核苷酸引物及探针

参考文献[2][3],由上海生工生物工程公司合成。碱基序列如下,引物A:5'-AATGCGTGGACTATCTGCG-3';引物B:5'-CCTGGTTCTGGGCTCTTGA-3'。寡核苷酸探针:5'-GGCAAAACATCCATCCCGG-3'。寡核苷酸加尾标记及检测试剂盒购自Gibco BRL公司,操作按说明书进行。

#### 1.4 原位杂交

详细步骤参见文献[4]。

#### 1.5 RT-PCR

逆转录反应根据参考文献[5]进行。将20  $\mu$ l总反应液置于原位PCR模具中并密封,37  $^{\circ}$ C孵育90 min,逆转录结束后去掉原位PCR模具,PBS洗涤2min $\times$ 4次,吹干后进行PCR反应。将液体石蜡油加满PE480型PCR仪(美国PE公司)的48个孔并用铝箔平盖于其上,载玻片平放于铝箔之上。PCR反应体系: Taq DNA聚合酶3 U,20 pmol/ $\mu$ l上下游引物各3  $\mu$ l,2 mmol/L dNTP 5  $\mu$ l(间接法),2 mmol/L dNTP 4  $\mu$ l(直接法),10  $\mu$ mol/L Dig-dUTP 5  $\mu$ l(直接法),加水至总反应体积为50  $\mu$ l。将50  $\mu$ l总反应液加入原位PCR模具内并密封。PCR程序:94  $^{\circ}$ C变性65 s,57  $^{\circ}$ C退火70 s,72  $^{\circ}$ C延伸100 s,共29个循环;第30个循环72  $^{\circ}$ C延伸10 min。间接法在PCR完成后95  $^{\circ}$ C变性8 min。将载玻片置于-20  $^{\circ}$ C预冷的无水乙醇中10 min。同时设置阴性对照、阳性对照、空白对照、探针对照。

## 1.6 原位RT-PCR的杂交及检测

1.6.1 直接法 去掉原位PCR模具。PBS洗涤2 min×3次；缓冲液 I (0.1 mol/L 顺丁烯二酸, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤1 min×1次；缓冲液 II (试剂盒提供的10%阻断剂：缓冲液 I =1:10) 孵育30 min, 抗地高辛抗体(1:2 000) 孵育60 min；缓冲液 I 洗涤10 min×2次；缓冲液 III (100 mmol/L Tris·HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) 洗涤2 min×2次；加显色液100 μl (NBT/BCIP 4 μl, 缓冲液 III 96 μl), 显色2 h；缓冲液 I 洗涤5 min×1次；缓冲液 IV (10 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗涤2 min×2次；终止显色。亲水性树脂封片, 镜下观察并拍照。

1.6.2 间接法 变性后去掉载玻片上的原位PCR模具。PBS洗涤2 min×3次, 预杂交37 °C 孵育5 h, 42 °C 杂交过夜。6×SSC/45% 甲酰胺洗涤10 min×1次, 2×SSC 37 °C 洗涤10 min×2次, 0.2×SSC 37 °C 洗涤10 min×2次, 其余步骤同直接法。

## 2 结果

### 2.1 原位杂交

K562、HL-60、NIH3T3及慢性粒细胞性白血病患者的单个核细胞的原位杂交均为阴性。

### 2.2 直接法原位RT-PCR

用直接法原位RT-PCR分别对K562、HL-60和慢性粒细胞性白血病患者骨髓单个核细胞表达SCF进行了检测。结果上述3种细胞均呈阳性, 而作为阴性对照的NIH3T3细胞和设置的空白对照均为阴性。细胞膜完整, 部分细胞胞膜呈瘤状突起, 核大, 细胞核约占4/5以上, 核仁不清楚, 阳性产物较均匀地分布在胞质内, 但背景不甚理想, 有许多散在阳性细颗粒分布于无细胞结构区域。

### 2.3 间接法原位RT-PCR

K562细胞、HL-60细胞和慢性粒细胞性白血病患者的外周血细胞均呈阳性, 设置的对照为阴性。阳性产物几乎全部局限在胞质内, 背景上偶有几个细颗粒。

## 3 讨论

原位PCR技术是20世纪90年代发展起来的一种相当敏感的基因诊断技术, 自1990年Haase等[6]首先报道后, 已应用于病毒感染、基因突变、染色体易位和基因低水平表达等方面的研究[7][8][9]。原位杂交是分子杂交与组织化学技术的成功结合, 在显示阳性杂交信号的同时, 还能判别含有靶序列的细胞类型以及组织细胞的形态结构特征与病理变化。但有时候原位杂交的应用受到其敏感性限制, 细胞内单拷贝DNA序列和低于10~20拷贝的RNA序列, 往往不能被原位杂交检出[10]。原位PCR反应在由细胞膜组成的“囊袋”内进行, 既能检出细胞内单拷贝或低拷贝的DNA或RNA序列, 同时还可对含靶序列的组织细胞进行形态学分析。原位PCR通常分为直接法和间接法两种, 前者是使扩增产物直接携带标记分子, 后者则是用带有标记分子的探针与组织细胞内PCR扩增产物杂交。

我们首先用地高辛加尾标记的寡核苷酸探针对K562、HL-60和慢性粒细胞性白血病患者的骨髓单个核细胞进行了原位杂交, 结果均为阴性, 说明由于被检测的mRNA拷贝数低, 原位杂交不能检测出K562和HL-60细胞内SCF mRNA序列。在原位杂交阴性的情况下, 为证实这两种细胞株及慢性粒细胞性白血病患者的白血病细胞确有SCF mRNA的表达, 我们进行了原位RT-PCR检测。直接法原位RT-PCR结果显示, K562、HL-60和慢性粒细胞性白血病患者骨髓白血病细胞均呈强阳性。K562和HL-60细胞质内有多个空泡, 部分细胞膜呈瘤状突起, 深蓝色阳性颗粒较均匀地分布在细胞浆内, 但细胞外有较多弥散的细颗粒, 考虑一是退化细胞胞膜通透性增加, mRNA外漏, PCR扩增在细胞外进行; 二是地高辛标记的dUTP与玻片上的多聚赖氨酸粘附, 冲洗不充分, 显色后出现细颗粒。直接法原位RT-PCR虽然过程比较简单, 容易掌握, 所需时间短, 影响因素相对少, 但缺点是特

异性较差,背景高,容易出现假阳性,因此设置严格的对照意义重大,可以最大程度减少假阳性。在我们的实验中设置了多种对照,更重要的是我们随后的间接法原位RT-PCR与直接法结果相同,这基本上排除了假阳性的可能。间接法原位RT-PCR结果更清晰,背景低,特异性强,更适合进行图象分析,其缺点是需要事先标记探针,PCR完成后需进行预杂交、杂交过夜,随后进行多次洗脱,全过程繁琐。

以往的原位PCR要求在专用的原位PCR仪上进行,我们在普通的PE480型PCR仪平台上铺一张铝箔,将载玻片置于铝箔之上进行原位PCR,也取得了满意的效果,一方面节省资金,另一方面更容易使原位PCR技术得到普及推广。

#### 参考文献:

[1] Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG, et al. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(10): 1104-14.

[2] Pietsch T, Kyas U, Steffens U, et al. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors[J]. *Blood*, 1992, 80(5): 1199-206.

[3] 柳柏林, 李彬, 靳卫东, 等. 人及小鼠干细胞因子的cDNA克隆及其序列分析[J]. *中华血液学杂志*, 1995, 16(6): 283-7.

Liu BL, LI B, Jin WD, et al. cDNA cloning and sequencing of human and mouse stem cell factor[J]. *Chin J Haematol*, 1995, 16(6): 283-7.

[4] 苏慧慈. 原位杂交[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 59-72.

[5] 郑维扬, 周淑芸, 王小琪, 等. 筑巢式PCR检测白血病微量残留bcr/abl mRNA[J]. *中华血液学杂志*, 1994, 15(5): 227-9.

Zheng WY, Zhou SY, Wang XQ, et al. Detection of leukemia residual bcr/abl mRNA with nested polymerase chain reaction[J]. *Chin J Haematol*, 1994, 15(5): 227-9.

[6] Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(13): 4971-5.

[7] Liu X, Giambrone JJ, Hoerr EJ. In situ hybridization, immuno-histochemistry, and in situ reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of infectious bursal disease virus[J]. *Avian Dis*, 2000, 44(1): 161-9.

[8] Athanasiou E, Kotoula V, Hytioglou P, et al. In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction for cyclin D1 mRNA in the diagnosis of mantle cell lymphoma in paraffin-embedded tissues[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(2): 62-71.

[9] Koltai H, Bird DM. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections[J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(4): 1203-12.

[10] 苏慧慈. 原位PCR[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 94-118.

#### 参考文献:

[1] Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG, et al. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(10): 1104-14.

[2] Pietsch T, Kyas U, Steffens U, et al. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors[J]. *Blood*, 1992, 80(5): 1199-206.

[3] 柳柏林, 李彬, 靳卫东, 等. 人及小鼠干细胞因子的cDNA克隆及其序列分析[J]. *中华血液学杂志*, 1995, 16(6): 283-7.

Liu BL, LI B, Jin WD, et al. cDNA cloning and sequencing of human and mouse stem cell

factor[J]. Chin J Haematol, 1995, 16(6): 283-7.

[4] 苏慧慈. 原位杂交[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 59-72.

[5] 郑维扬, 周淑芸, 王小琪, 等. 筑巢式PCR检测白血病微量残留bcr/abl mRNA[J]. 中华血液学杂志, 1994, 15(5): 227-9.

Zheng WY, Zhou SY, Wang XQ, et al. Detection of leukemia residual bcr/abl mRNA with nested polymerase chain reaction[J]. Chin J Haematol, 1994, 15(5): 227-9.

[6] Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(13): 4971-5.

[7] Liu X, Giambone JJ, Hoerr EJ. In situ hybridization, immuno-histochemistry, and in situ reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of infectious bursal disease virus[J]. Avian Dis, 2000, 44(1): 161-9.

[8] Athanasiou E, Kotoula V, Hytiroglou P, et al. In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction for cyclin D1 mRNA in the diagnosis of mantle cell lymphoma in paraffin-embedded tissues[J]. Mod Pathol, 2001, 14(2): 62-71.

[9] Koltai H, Bird DM. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections [J]. Plant Physiol, 2000, 123(4): 1203-12.

[10] 苏慧慈. 原位PCR[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 94-118.

---

[回结果列表](#)