

## 单细胞逆转录 PCR 实验方法研究

## Single cell RT-PCR: study of the experimental technique

熊杰, 夏照帆\* (第二军医大学长海医院烧伤科, 全军烧伤研究所, 上海 200433)

[关键词] 单细胞; 逆转录; PCR

[中图分类号] R-331 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)09-1028-04

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研究的热点之一。但是高等生物作为高度分化的系统,其差异基因表达分析往往需要大量纯化的同质细胞。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。用PCR方法分析单个细胞中的基因组DNA或mRNA已成为可能,自20世纪90年代Brady等<sup>[1]</sup>成功从单个血细胞中扩增出所有mRNA以来,该技术已被迅速应用于单细胞水平上的基因表达研究。本研究在上述方法基础之上对各步条件加以优化改进,建立了稳定可靠的单细胞RT-PCR实验体系,包括序列非依赖性扩增全细胞mRNA的SC-Poly(A)PCR方法和引物特异性扩增目的基因的SC-RT-PCR方法。

## 1 材料和方法

## 1.1 引物特异性扩增

1.1.1 单细胞悬液的制备 取指数期生长的人皮肤成纤维细胞,以0.25%胰酶消化后离心洗涤2次,弃上清,PBS重悬细胞。

1.1.2 细胞裂解逆转录液的配制 在冰上配制100  $\mu$ l 4 $\times$ 细胞裂解逆转录液:4  $\mu$ l NP-40,4  $\mu$ l RNasin,16  $\mu$ l dNTP,4  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>19-24</sub> (0.5  $D_{260}$ /ml),72  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。每5  $\mu$ l分装于薄壁PCR反应管中,置冰上备用。

1.1.3 单个细胞的获取与裂解 取上述单细胞悬液少许于表面皿中用PBS适当稀释,在倒置显微镜下用微吸管吸取单个细胞,吸入体积控制在5  $\mu$ l以内,分别加入至已含细胞裂解液的PCR管中,空白对照(对照I)管中加入无细胞的等量PBS。稍离心后置冰上2 h充分裂解细胞。

1.1.4 基因组DNA消化 依次加入2  $\mu$ l 10 $\times$ DNase I Buffer,1  $\mu$ l DNase I (Sigma),4  $\mu$ l 5 $\times$ Powerscript Buffer和3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O;另设置无此步骤的对照组(对照II),其中仅加入4  $\mu$ l 5 $\times$ Powerscript Buffer和6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。室温15 min后加入1  $\mu$ l Stop液,对照组加入1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O,70 $^{\circ}$ C 10 min后放回冰上冷却。

1.1.5 逆转录 向各管中加入1  $\mu$ l Powerscript 逆转录酶

(Clontech),不加逆转录酶而加入1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O的反应管设置为对照III。稍离心,42 $^{\circ}$ C 1 h,70 $^{\circ}$ C 15 min 灭活,放回冰上。

1.1.6 PCR扩增 分2轮进行。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。 $\beta$ -actin引物:1F 5'-GCT ATC CAG GCT GTG CTA TC-3',1R 5'-ACT GTG TTG GCG TAC AGG TC-3',2F 5'-TCG TGA TGG ACT CCG GTG AC-3',2R 5'-TCG TGG ATG CCA CAG GAC TC-3',目的片段长376 bp。DPH2L引物:5'-CAC CCT CAC CCA CTC TGG TG-3',R5'-GGG TTG CCA AGC CTC TGC C-3',目的片段长379 bp。第一轮PCR:向逆转录产物反应管中依次加入5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer,2、5或8  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)(反应终浓度分别为1、2、5和4 mmol/L),4  $\mu$ l dNTP,各1  $\mu$ l的 $\beta$ -actin 1F、1R引物或2F、2R引物或DPH2L的F、R引物,加H<sub>2</sub>O调整体积为27  $\mu$ l,最后加入1  $\mu$ l JumpStart<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase(Sigma),反应总体积为50  $\mu$ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min;25个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s;72 $^{\circ}$ C 5 min。第二轮PCR:取第一轮PCR产物1  $\mu$ l重建以下反应体系:10  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer,4、10或16  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>,8  $\mu$ l dNTP,各2  $\mu$ l的 $\beta$ -actin 2F、2R引物或DPH2L的F、R引物,加H<sub>2</sub>O调整体积为99  $\mu$ l,最后加入1  $\mu$ l JumpStart<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase,反应总体积为100  $\mu$ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min;30个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s;72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.1.7 结果分析 取第二轮PCR产物5  $\mu$ l,行1.5%琼脂糖凝胶(含0.5  $\mu$ g/ml溴化乙锭,EB)电泳(80 V,1 h),凝胶成像系统进行摄影记录;部分第二轮PCR产物送上海英俊生物技术公司进行DNA测序,测序结果用BLAST软件与GenBank数据库进行比对分析。

## 1.2 序列非依赖性扩增

1.2.1 单细胞悬液的制备 同1.1.1方法。

1.2.2 细胞裂解逆转录液的配制 在冰上配制100  $\mu$ l 2 $\times$ 细胞裂解逆转录液:40  $\mu$ l 5 $\times$ Powerscript Buffer,2  $\mu$ l NP-40,4  $\mu$ l RNasin,8  $\mu$ l dNTP,2  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>19-24</sub>,44  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。每5  $\mu$ l分装置冰上备用。

[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@sohu.com

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

1.2.3 单个细胞的获取与裂解 同 1.1.3 方法。

1.2.4 逆转录 PCR 管置 70℃ 10 min 后,放回冰上,加入 1  $\mu$ l Powerscript 逆转录酶,对照组仅加入 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。稍离心,42℃ 1 h,70℃ 15 min 灭活,放回冰上。

1.2.5 加尾 加入 9  $\mu$ l 新配制的 2 $\times$ 加尾缓冲液和 1  $\mu$ l TDT 末端转移酶(Promega)。37℃ 15 min,70℃ 10 min 灭活。(每 100  $\mu$ l 的 2 $\times$ 加尾缓冲液配制:40  $\mu$ l 5 $\times$ TDT Buffer,20  $\mu$ l dATP,40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O)。

1.2.6 PCR 扩增 向逆转录产物反应管中依次加入 10  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer,16  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>,40  $\mu$ l dNTP,10  $\mu$ l Poly(A) PCR 引物(5'-TTT TGT ACA AGC T(T)<sub>24</sub>-3',0.01 D<sub>260</sub>/ $\mu$ l,上海生工生物工程技术有限公司合成),1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O,最后加入 2  $\mu$ l JumpStart™ Accutaq™ DNA 聚合酶(Sigma),反应总体积为 100  $\mu$ l。反应条件:94℃ 3 min;25 个循环:94℃ 1 min,45℃ 2 min,72℃ 5 min;向各管中再加入 1  $\mu$ l 的 JumpStart™ Accutaq™ DNA 聚合酶,按相同程序再扩增 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。

1.2.7 PCR 扩增效果分析 (1)核酸定量:取 2  $\mu$ l PCR 产物稀释至 100  $\mu$ l,于核酸定量仪中进行定量。(2)全细胞 cDNA 电泳:10  $\mu$ l PCR 产物上样行 1.5% 琼脂糖/EB 凝胶电泳,凝胶成像系统摄影记录结果。(3)代表性检测:用 PCR 检测  $\beta$ -actin 和 DPH2L 基因的表达水平来测定扩增代表性。分别取 0.5  $\mu$ l PCR 产物,加入 5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer,4  $\mu$ l dNTP,各 1  $\mu$ l  $\beta$ -actin 2F、2R 引物或 DPH2L 的 F、R 引物,38  $\mu$ l H<sub>2</sub>O,最后加入 0.5  $\mu$ l Taq 酶,反应总体积为 50  $\mu$ l。反应条件:94℃ 3 min;30 个循环:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s;72℃ 5 min。取 PCR 产物 10  $\mu$ l 行 1.5% 琼脂糖/EB 凝胶电泳,凝胶成像系统摄影记录结果。

## 2 结果

### 2.1 引物特异性扩增目的基因

2.1.1 琼脂糖凝胶电泳结果 电泳显示预期位置处可见特异性条带, $\beta$ -actin 产物大小为 376 bp(图 1),DPH2L 产物大小为 379 bp(图 2),未见非特异性条带,表明 SC-RT-PCR 对目的基因的扩增具有很好的特异性;空白对照(对照 I)中未见任何条带,表明实验未受到外源性 DNA 污染,对照 III 亦未见任何条带,表明基因组 DNA 在该程序中不能被扩增。

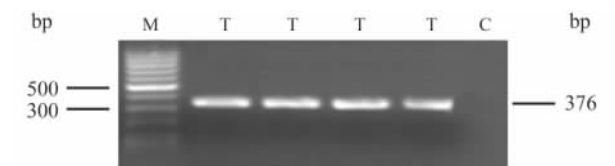


图 1  $\beta$ -actin 的 SC-RT-PCR 扩增结果

M:100 bp 梯度 DNA marker ; T: 实验组;C:对照组

2.1.2 DNA 序列分析  $\beta$ -actin 和 DPH2L 的 PCR 产物经测序分别测出序列 376 bp 和 379 bp,测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行比对分析均为 100% 吻合,表明 SC-RT-PCR 对目的基因的扩增具有很好的忠实性。

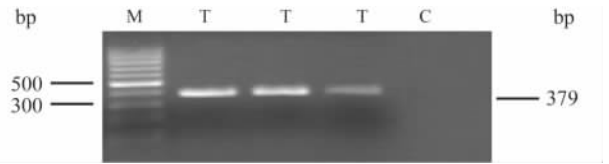


图 2 DPH2L 的 SC-RT-PCR 扩增结果

M:100 bp 梯度 DNA marker ; T:实验组;C:对照组

2.1.3 实验条件的优化 (1)基因组 DNA 消化:经 DNaseI 消化的实验组未见基因组 DNA 扩增条带,对照 II 中亦未见基因组 DNA 扩增条带;(2)MgCl<sub>2</sub> 反应终浓度:Mg<sup>2+</sup> 为 1.0 mmol/L 时, $\beta$ -actin 和 DPH2L 片段的扩增成功率分别为 30% 和 40%,Mg<sup>2+</sup> 为 2.5 mmol/L 时,两种片段的扩增成功率均为 60%,Mg<sup>2+</sup> 为 4.0 mmol/L 时,两种片段的扩增成功率分别为 90% 和 80%,表明提高 Mg<sup>2+</sup> 反应浓度有利于提高 SC-RT-PCR 的扩增成功率;本研究中 Mg<sup>2+</sup> 浓度优化结果为 4.0 mmol/L,除特别说明外均同此。(3)巢式引物与单对引物的比较: $\beta$ -actin 片段采用巢式引物进行两轮 PCR 扩增的成功率为 90%,采用单对引物进行两轮扩增的成功率为 80%;DPH2L 片段采用单对引物进行两轮扩增的成功率为 80%。

### 2.2 序列非依赖性扩增全细胞 mRNA

2.2.1 琼脂糖凝胶电泳结果 从图 3 中可以看出,单个细胞中的全部 mRNA 均得到了扩增,扩增成功率为 75%,扩增得到的 cDNA 主要分布于 0.2~2 kb 之间,空白对照中未见任何条带,表明实验未受到外源性 DNA 污染,未加逆转录酶的对照组亦未见任何条带,表明基因组 DNA 在该程序中不能被扩增。

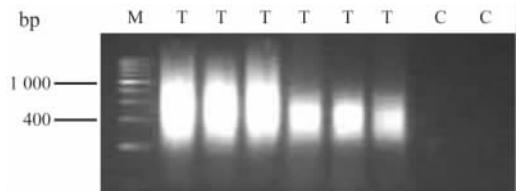


图 3 SC-Poly(A)PCR 扩增结果

M:200 bp 梯度 DNA marker ; T:实验组;C:对照组

2.2.2 PCR 产物核酸定量结果 扩增成功组的 PCR 产物经核酸定量检测发现均可达  $\mu$ g 水平,足够常规分子生物学实验之用。

2.2.3 代表性检测结果  $\beta$ -actin 和 DPH2L 来自单个细胞的 cDNA 池中均可得到有效的扩增(图 4,图 5),表明 SC-Poly(A)PCR 对于单个细胞中的高表达和低表达基因均能进行有效的扩增。

## 3 讨论

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<sup>6</sup> 以上,这无形中就增加了研究难度,特别是对于那些来源极其有限的珍贵样本就更为明显。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唯一差别的表达特性却不能得知<sup>[2-3]</sup>。要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。单细胞 RT-PCR 的出现则为该水平上的基因研究提供了有力的工具<sup>[4]</sup>。

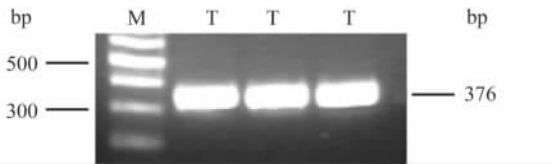


图 4  $\beta$ -actin 代表性检测结果

M:100 bp 梯度 DNA marker; T:实验组 cDNA 池中扩增的  $\beta$ -actin 条带

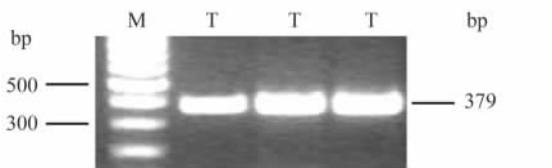


图 5 DPH2L 代表性检测结果

M:100 bp 梯度 DNA marker; T:实验组 cDNA 池中扩增的 DPH2L 条带

单细胞 RT-PCR 与常规 RT-PCR 相比,在各个环节上都有着显著差异。由于研究对象是单个细胞,要求严格无菌操作以防止污染。此外还必须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。本研究中各对照组在电泳上均呈空白结果,显示实验过程未受到外源性 DNA 和基因组 DNA 的污染,证明在实验过程中严格无菌操作和设立对照是能够有效避免污染。

常规 RT-PCR 首先要将组织中的 mRNA 或总 RNA 抽提出来之后才能进行后续步骤,而单个细胞中的 mRNA 一般在 1 pg 左右,显然无法抽提,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,再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 DNase 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。本研究在设计人  $\beta$ -actin 和 DPH2L 基因的 PCR 引物时就特别考虑使引物结合位置跨越相邻外显子交界处,另外我们在细胞裂解后也使用 DNase I 消化基因组 DNA,同时也设立了不进行基因组 DNA 消化的对照组,PCR 产物电泳显示对照组为空白,表明我们的实验设计确实避免了基因组 DNA 的影响。

由于起始模板数量很少,单细胞 RT-PCR 必须采用最适当的措施进行扩增,才能够得到理想的产物。应用传统的单对引物对单细胞中目的基因进行一轮 PCR 扩增,其产物的量、稳定性和扩增成功率往往并不够理想。如果采用嵌套设计的两对巢式引物,进行两轮 PCR 扩增,则扩增产物的量

和可靠性就会大大提高<sup>[5-6]</sup>。本研究中,我们以  $\beta$ -actin 的巢式引物进行两轮 PCR 扩增,同时分别以  $\beta$ -actin 的内引物和 DPH2L 的单对引物进行两轮 PCR 扩增,结果发现采用巢式引物进行两轮扩增得到的产物在稳定性与特异性上与采用单对引物进行两轮 PCR 扩增得到的产物相比并无差异,只是在扩增成功率上略显优势(90% vs 80%)。尽管未如文献所说的巨大差异,但我们仍然推荐以巢式引物进行两轮扩增为佳。

如果要完整地获取单个细胞中基因表达的全部信息,就需要对所有 mRNA 进行整体扩增,我们采用的 Poly(A)PCR 方法是通过序列非依赖性扩增全细胞 cDNA 实现的,其原理见图 6。

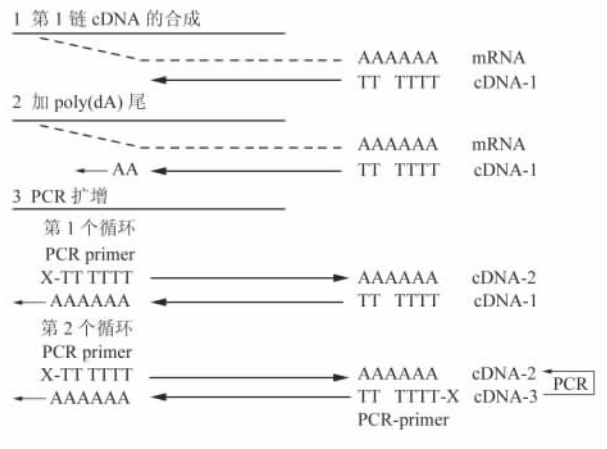


图 6 序列非依赖性扩增全 cDNA 示意图

PCR 引物含有 Oligo(dT)<sub>24</sub> 和一个 13 碱基序列(以 X 代表)

以含有 PolyA 的 mRNA 为模板,以 Oligo(dT)<sub>19-24</sub> 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 循环合成 cDNA 第二链,随后进行标准的 PCR 程序。PCR 引物除含有 Oligo(dT)<sub>24</sub> 外,还有 13 个碱基(在图 6 中以 X 表示),这一额外序列是为了提高退火的特异性并且为以后克隆提供方便的 *Rsa* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点<sup>[7]</sup>。本研究中,单个细胞中的全部 mRNA 经过 Poly(A)PCR 的两轮扩增,均得到了有效扩增,扩增成功率为 75%,扩增得到的 cDNA 主要分布于 0.2~2 kb 之间,各对照显示实验过程未受到外源性 DNA 和基因组 DNA 的污染。同时核酸定量检测发现,扩增成功组的 PCR 产物均可达  $\mu$ g 水平,足够常规分子生物学实验之用。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 印迹或 PCR 检测一个普遍高表达基因(如  $\beta$ -actin)、普遍低表达基因(如 DPH2L,白喉酰胺生物合成蛋白 2 样蛋白)及目的细胞特异表达的两个基因(以进一步鉴定所挑取的细胞是需要的。不过在本实验中我们是从均一的细胞株培养物开始,所以无需检测这一指标)。本研究通过 PCR 扩增  $\beta$ -actin 和 DPH2L 的方法进行了代表性检测,结果符合我们的要求。以上结果说明单细胞 RT-PCR 能够对单个细胞的全部 mRNA 进行有效的扩增,扩增成功率可达 75% 以上,扩增产物

也可供其他研究所用。

本研究通过各个环节的优化,建立了稳定可靠的单细胞 RT-PCR 实验体系,该法灵敏度极高,对于单个细胞中的特定靶基因和全部 mRNA 均能进行有效的扩增,扩增成功率可达 75%~90%,对目的基因的扩增具有很好的特异性与忠实性,对单细胞全部 mRNA 的扩增产量亦可达  $\mu\text{g}$  水平,足够其他常规研究所用。本方法为解决分化系统的异质性和基因表达模式分析需要大量纯化细胞之间的矛盾提供了一条途径。从不同细胞中扩增的 cDNA 可进一步用于构建消减文库,或在构建 cDNA 文库后继而进行差异杂交,以筛选不同细胞或组织间差异表达的基因。随着基因组计划的顺利完成,应用这种方法可产生少到 1 个细胞的细胞类型/组织类型特异的或发育阶段特异的全细胞 cDNA,并以此为探针来筛选微排列于 DNA 芯片上的 cDNA 文库,从而能够鉴定在这些细胞中所有基因的表达状态<sup>[8]</sup>。这对于在高度分化系统中很难获取足够同质细胞进行基因表达分析的领域如胚胎发育、干细胞生物学、神经分化或从生物活检标本入手的体内肿瘤研究都有着广阔的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Brady G, Barbara M, Iscove N N. Representative in vitro cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies [J]. *Meth Mol Cell Biol*, 1990, 2:17-25.
- [2] Xu L, Enyeart J J. Properties of ATP-dependent K(+) channels in adrenocortical cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280:C199-C215.
- [3] 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.
- [4] Hewitt Z, Forsyth N R, Waterfall M, et al. Fluorescence-activated single cell sorting of human embryonic stem cells [J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8:225-234.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Botero L M, D'Imperio S, Burr M, et al. Poly(A) polymerase modification and reverse transcriptase PCR amplification of environmental RNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71:1267-1275.
- [8] 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] 2007-02-07

[修回日期] 2007-05-27

[本文编辑] 曹静