

苏慧慈 刘彦仿 著



原 位

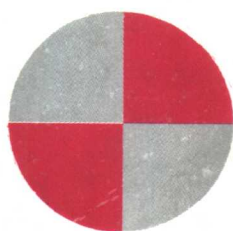
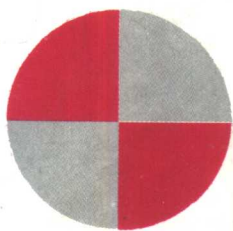
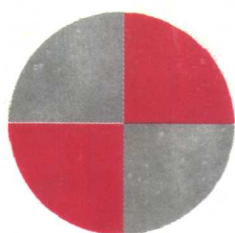
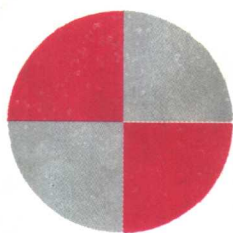
P C



R



科 学 出 版 社



100176

原位 PCR  
*In Situ* Polymerase Chain Reaction

苏慧慈 刘彦仿 著

科学出版社

1995

(京)新登字 092 号

## 内 容 简 介

原位 PCR 是一项能在组织细胞原位检测单拷贝或低拷贝特定 DNA 或 RNA 序列的新技术,本书前 2 章简明扼要地叙述了 PCR 技术和原位杂交技术的理论和实践。在此基础上,重点阐述了原位 PCR 设计及基本步骤(第 3 章),并推荐了 8 例操作程序(第 4 章)。最后,系统地介绍了原位 PCR 的应用。本书汇集了原位 PCR 技术的最新文献,具有理论性和操作性并重的特点。

本书可供生命科学相关学科的研究工作者、医学、生物学院校师生及研究生参考。

## 原位 PCR

苏慧慈 刘彦仿 著

责任编辑 王 刚 范淑琴

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1995 年 8 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

1995 年 8 月第一次印刷 印张:6 3/8 插页:2

印数:1—2 400 字数:155 000

ISBN 7-03-004820-2/Q·597

定价:18.80 元

# 序

我很高兴向读者推荐《原位 PCR》一书,相信这本书有助于对这一重要而激动人心的新技术的理解。原位 PCR 正处在初级阶段,本书的问世非常及时。由于操作时无须复杂昂贵的仪器试剂,中国同仁完全有可能掌握这一形态研究和诊断的前沿技术,并在此领域取得领先地位。

原位 PCR 是一项十分敏感的技术,能够检测单拷贝的 DNA 或 RNA 序列,并在细胞形态学上准确定位。它是 PCR 和原位杂交结合的产物。自从 1990 年首次报道以来,原位 PCR 的发展和应用已经引起了世界范围的极大关注。很多已发表的有关应用这一技术的论文,使我们对低拷贝数的 DNA 或 RNA 分布情况的认识有了重要的进展。它填补了形态学领域,尤其是病毒感染方面的空白。这一新兴技术有着巨大的发展前景和应用潜力。

目前,虽然许多实验室对这项技术很感兴趣,但做出成绩的屈指可数。所以,这本帮助研究者深入系统地理解该项技术的专著就显得举足轻重了。原位 PCR 是一项极具挑战性的技术,而阅读一本这样优秀的著作,即是赢得挑战的最佳途径之一。

我和本书作者苏慧慈博士相识多年,起初在英国伦敦,而后又在瑞典和中国。多年的相处,使我对作者的工作和论著深感钦佩。我热烈地祝贺他完成这本应时之作,并衷心地希望本书成为中国病理学、形态学和分子生物学工作者在这方面取得领先地位的阶梯。

顾江 MD, PhD

美国 Deborah 研究院学术委员会主席

纽约州立大学病理学教授

Cell Vision—Journal of Analytical Morphology

主编

## Foreword

I am very pleased to recommend this book on *In Situ* Polymerase Chain Reaction(PCR). I believe it will help the reader to understand this important and exciting new technology. This book is very timely as *in situ* PCR is at an emerging stage of its development. The technique does not require too much elaborate or expensive equipment or reagents. At this stage, it is entirely possible that our Chinese colleagues will catch up to the vanguard of morphological research and diagnosis and take the lead in this field.

*In situ* PCR is an extremely sensitive technique that is capable of detecting a single copy of DNA or RNA and pinpointing its location in cell morphology. It is derived from a combination of PCR and *in situ* hybridization. Since first reported in 1990, there has been tremendous interest worldwide in its development and applications. Most of the published articles reporting on applications of this technique have led to important advances in our understanding of the distribution of low copy numbers of DNA or RNA. It has filled a knowledge gap in the field of morphology, particularly of virus infections. There is still tremendous potential for the development and application of this emerging technology.

At the present time, there are many laboratories that are interested in this technique but only a few have made it work. This further stresses the importance of this book to enable the investigators to have a deeper and systematic understanding of the tech-

nology. *In situ* PCR is quite a technically challenging endeavor and reading an excellent book such as this, is one of the best approaches to overcoming the challenge.

I have known and interacted with the author of this book, Huici Su, MD, PhD, for many years, first in London, England, and subsequently in Sweden and China. Over the years, I have developed a high level of respect and admiration for his work and writings. I warmly congratulate him on the timely completion of this book. I hope that it will serve as a stepping stone for Chinese pathologists, morphologists, and molecular biologists alike to take a lead in this fast evolving field.

November, 1994



Jiang Gu, MD, PhD

Chairman, Scientific Affairs, Deborah Research Institute, USA  
Professor of pathology—State University of New York, USA  
Editor-in-Chief, "Cell Vision—Journal of Analytical Morphology"

## 写在前面

1992年,我应国际著名内分泌病理学家 Lars Grimelius 教授之邀,赴瑞典 Uppsala 大学病理研究所访问交流。其间正值 PCR 技术在生物医学领域迅速推广应用,并发挥着革命性的影响。与此同时,在组织细胞原位进行特定核酸序列扩增的原位 PCR 技术也处在新生阶段。作为科学工作者应具备的敏锐,使我对此产生浓厚的兴趣。怀着探求新知的强烈愿望,我专赴斯德哥尔摩瑞典皇家理工学院生物化学与生物技术研究室学习 PCR 技术。当时,Uppsala 大学病理所的 Ingeberg Zehbe 博士正用原位 PCR 技术研究 HPV,并与奥地利 Salzburg 医学院病理研究所的 Gerhard Hacker 博士共同研究将胶体金-银检测系统引入原位 PCR 中。我密切注视并参与他们的工作。1993年回国后,Cell Vision 杂志主编,美国新泽西州 Deborah 研究所学术委员会主席顾江教授和 Uppsala 大学中国留学生任志平医生不断寄赠有关原位 PCR 的最新资料,使我能一直跟踪着该项技术的发展动态。所有这些经历和工作,是本书得以成文的基础。

原位 PCR 技术自 1990 年首次报道至今,时经近四年的发展、完善,现已趋于成熟。此项新技术给生物医学科学研究增添了一对强有力的翅膀,使其能在更广阔的天地里翱翔。将该项技术及时地介绍给国内学术界,使我国生物医学工作者能够把握科学发展的新方向,并在此前沿领域有所作为,是撰写本书的目的。

我的合作者,刘彦仿教授是我国著名的病理学家,也是我的大学老师。学生时代,我承蒙老师悉心教诲,受益终生。毕业之后,仍在学习、工作乃至生活诸方面不断得到老师无微不至的关怀。师恩似海,无以回报。1994年初夏,我向刘彦仿教授表达了撰写《原位 PCR》专著的意向,得到老师的热情鼓励和支持。每与老师促膝相

坐,学习文献资料,讨论写作提纲,切磋文词字句,使学生再次受教于恩师。但看师已年入古稀,我亦霜染鬓发,难抑万端感慨却上心头,唯有这部书作可做崇高师生情谊之鉴证,尚觉欣慰尔。

本书写作过程中,王成济教授曾予指导和帮助,我的学生张成岗同志参与了部分文献和索引的整理工作,张洒洒同志为本书绘制插图,Dr. Ingeborg Zehbe, Dr. Gerhard W. Hacker 及胡敏、褚桂珍和蒋明德等同道为本书惠赠精美的照片,作者在此一并致以衷心感谢。

审慎严谨,深入浅出,理论性与操作性并重是本书的写作原则,如有不尽完善之处,期盼各位同仁不吝赐教。

苏慧慈 Ph. D. (London Univ. RPMS)

第四军医大学组织学与胚胎学教研室主任、教授

1994 年岁末于西安



## 缩略词表

简写	英文全称	中文全称
A	Adenine	腺嘌呤
ABC	Avidin-biotin-peroxidase complex	卵白素-生物素- 过氧化物酶复合物
ADP	Adenosine diphosphate	二磷酸腺苷
AKP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
AMV	Avian myelo-blastosis virus	禽类成髓细胞性白血 病病毒
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-endo- lyl phosphate	5-溴-4-氯-3- 吲哚磷酸盐
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
C	Cytosine	胞嘧啶
CD	Cluster of differentiation	分化簇
cDNA	Complementary DNA	互补DNA
cRNA	Complementary RNA	互补RNA
DAB	Diaminobenzidine	联苯胺
DEPC	Diethylpyrocarbonat	焦碳酸二乙酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核苷酸
DNase	Deoxyribonuclease	DNA酶
dsDNA	Double-stranded DNA	双链DNA
DTT	Dithiothreitol	二巯苏糖醇
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate	脱氧三磷酸胸腺嘧啶
dUTP	deoxyuridine 5'-triphosphate	脱氧三磷酸尿嘧啶
EBV	Epstein-Barr virus	E-B病毒

EDTA	Ethylenediamine tetra- acetic acid	乙二胺四乙酸
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
G	Guanine	鸟嘌呤
HbA	Hemoglobin A	血红蛋白 A
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HbS	Hemoglobin S	血红蛋白 S
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HLA	Human leukocyte antigen	人类白细胞抗原
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSV	Herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
HTLV	Human T-cell lymphotropic virus	人 T 细胞淋巴瘤病 毒
IL	Interleukin	白细胞介素
ISH	<i>In situ</i> hybridization	原位杂交
LCA	Leukocyte common antigen	白细胞共同抗原
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合 体
MMTV	Mouse mammary tumor virus	小鼠乳腺肿瘤病毒
MO-MLV	Moloney murine leukemia virus	莫洛尼鼠类白血病病 毒
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NBT	Nitro-blue tetrazolium	硝基四氮唑蓝
NTP	Nucleosides triphosphates	三磷酸核苷(混合物)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PHA	Phytohemagglutinin	植物血凝素
PISH	PCR <i>in situ</i> hybridization	PCR 原位杂交
PLL	Poly-L-lysine	多聚赖氨酸
PPE	Preproenkephalin	前脑啡肽原

PVP	PolivinyI pyrolidone	聚乙烯吡咯酮
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	Ribonuclease	RNA 酶
RNasin	RNase inhibitor	RNA 酶抑制剂
rRNA	Ribosomal RNA	核糖体 RNA
RT	Reverse transcription	反转录
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
SILs	Squamos intraepithelial lesions	鳞状上皮内病变
3SR	Self-sustained sequence replication-based reaction	再生式序列 复制反应
SSC	Standard saline citrate	标准柠檬酸盐-氯化钠液
ssDNA	Single-stranded DNA	单链 DNA
T	Thymine	胸腺嘧啶
Taq	Thermus aquaticus	水生栖热菌
TBS	Tris-hydrochloric acid buffer solution	Tris-盐酸 缓冲液
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
Tm	Melting temperature	融解温度
TNF	Tumor necrose factor	肿瘤坏死因子
Topt	Optimate temperature	最适温度
Tris	Trishydroxymethylaminome- thane	三羟甲基氨基 甲烷
Tss	Strand-separation temperature	解链温度
U	U racil	尿嘧啶

# 目 录

序(Foreword)

写在前面

缩略词表

第 1 章 ✓	聚合酶链反应(PCR)概述·····	(1)
第 2 章 ✓	原位杂交的理论和实践·····	(39)
第 3 章 ✓	原位 PCR 设计及基本步骤·····	(82)
第 4 章 ✓	原位 PCR 操作程序·····	(116)
第 5 章	原位 PCR 的应用·····	(138)
附录 1 ✓	常用试剂配方·····	(162)
附录 2 ✓	·····	(166)
汉英索引	·····	(168)
英汉索引 ✓	·····	(177)

# 第 1 章 聚合酶链反应(PCR)概述

- 1.1 基本原理
- 1.2 反应体系
  - 1.2.1 模板 DNA
  - 1.2.2 引物
  - 1.2.3 4×dNTPs
  - 1.2.4 DNA 聚合酶
  - 1.2.5 缓冲液及其他成分
- 1.3 循环参数
  - 1.3.1 变性温度和时间
  - 1.3.2 引物退火
  - 1.3.3 引物延伸
  - 1.3.4 循环次数
- 1.4 PCR 扩增仪
- 1.5 实验操作
  - 1.5.1 DNA 扩增系统 A
  - 1.5.2 DNA 扩增系统 B
  - 1.5.3 DNA 扩增系统 C
  - 1.5.4 以石蜡包埋组织进行 PCR 扩增
- 1.6 几种 PCR 模式
  - 1.6.1 热起动 PCR
  - 1.6.2 套式引物 PCR
  - 1.6.3 反转录 PCR
  - 1.6.4 再生式序列复制反应
- 1.7 应用领域
  - 1.7.1 分子生物学研究
  - 1.7.2 病原体检测
  - 1.7.3 基因病诊断
  - 1.7.4 肿瘤研究
  - 1.7.5 其他领域

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR)技术诞生于 1985 年<sup>[1-3]</sup>,它是根据生物体内 DNA 复制的某些特点而设计的在体外对特定 DNA 序列进行快速扩增的一项新技术。随着热稳定性 Taq DNA 聚合酶的应用和自动化热循环仪的设计成功,PCR 技术的操作程序大大简化<sup>[4,5]</sup>,并且很快在世界各国被广泛地应用于基因研究的各个领域。它对分子生物学及其相关学科的基础研究和诊断应用等方面正产生着革命性的影响。PCR 技术的发明者,美国 Cetus 公司人类遗传室的 Kary Mullis,因此而与开创了“寡核苷酸基因定点诱变”方法的加拿大籍英国科学家 Michael Smith 共获 1993 年度诺贝尔化学奖。

1.  
 5'...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'  
 3'...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↓ 加热

2.  
 5'...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'  
 3'...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↓

3.  
 5'...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'  
 3'CCACTTGCACCTACTTCAAC5'

5'ACACAACTGTGTTCACTAGC3'  
 3'...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↓

4.  
 5'...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'  
 3'←TTCCACTTGCACCTACTTCAAC5'

5'ACACAACTGTGTTCACTAGCAA→3'  
 3'...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↓

图1-1 DNA聚合酶引物作用示意图

1. 用以扩增的靶序列——110bp的一段珠蛋白基因片段。中间虚线代表60个核苷酸序列。带有下划线的20个核苷酸为PCR寡核苷酸引物。
2. DNA加热后解链。
3. 引物与靶序列3'端的互补序列结合。
4. 在DNA聚合酶的作用下，以靶序列为模板，从引物的3'端延伸，合成一条互补的新链。

## 1.1 基本原理

PCR 有两个重要特性,一是能合成 DNA 的特定序列,二是特定序列的大量扩增。

DNA 聚合酶能以单链 DNA 为模板,合成一个与其互补的新链。将双链 DNA 加热至接近 $100^{\circ}\text{C}$ 时,DNA 变性,形成两条单链 DNA。此单链 DNA 即可用于合成互补链的模板。然而,新链合成的起始点必须有一小段双链 DNA。PCR 反应中,两条人工合成的寡核苷酸引物与单链 DNA 模板中的一段互补序列结合,形成部分双链。在适宜的温度下,DNA 聚合酶即将 dNTP 中的脱氧单核苷酸加到引物 $3'-\text{OH}$ 末端,并以此为起始点,沿模板以 $5' \rightarrow 3'$ 方向延伸,合成一条新的互补链。引物的位置将决定合成的 DNA 序列(图1-1)。

PCR 反应中,双链 DNA 的高温变性、引物与模板的低温退火和适温下引物延伸三个步骤反复循环(图1-2)。每一循环中所合

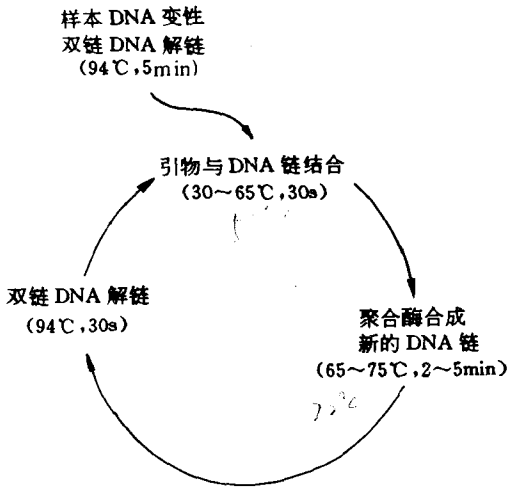


图1-2 PCR 循环示意图

成的新链,又都可以作为下一循环中的模板(图1-3)。PCR 的特定 DNA 序列产量随着循环次数呈指数增加,达到迅速大量扩增的目的(表1-1)。

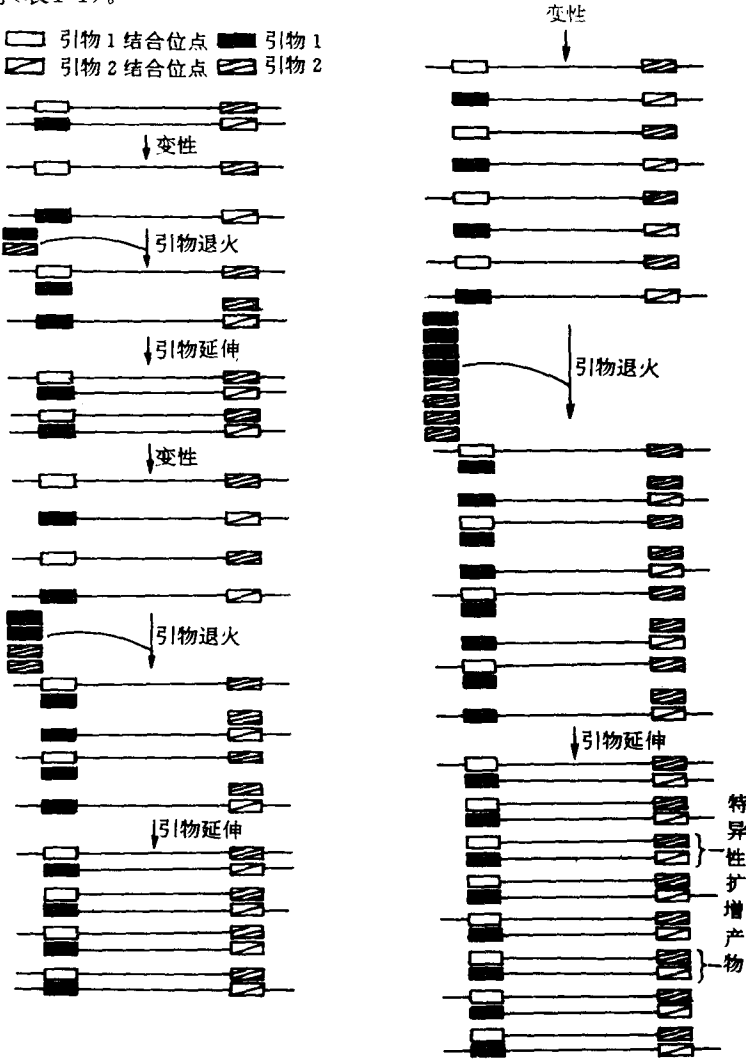


图1-3 PCR 扩增原理示意图



表1-1 DNA 片段的 PCR 扩增

循环次数	双链靶分子数扩增倍数
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1 024
13	2 048
14	4 096
15	8 192
16	16 384
17	32 768
18	65 536
19	131 072
20	262 144
21	524 288
22	1 048 576
23	2 097 152
24	4 194 304
25	8 388 608
26	16 777 216
27	33 554 432
28	67 108 864
29	134 217 728
30	268 435 456
31	536 870 912
32	1 073 741 824

扩增倍数( $Y$ )可用  $Y = (1 + X)^{n-2}$  公式表示。其中“ $X$ ”为扩增效率,“ $n$ ”为循环次数。由于在第3次扩增时,特异性靶序列增加了1倍(图1-3),所以用此公式计算扩增产物时应取  $n \geq 3$ 。

## 1.2 反应体系

PCR 反应体系中的基本成分应包括模板 DNA、引物、4种脱

5种