

基因甲基化聚合酶链反应检测体系的优化^{*}

揣征然,黄 庆,黄君富,府伟灵(第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

【摘要】 目的 优化甲基化敏感限制性内切酶的聚合酶链反应(PCR)检测体系。**方法** 用甲基化敏感限制性内切酶-PCR 技术对 10 例健康未孕女性的 RASSF1A 基因进行甲基化检测,并对反应的缓冲体系进行优化。**结果** 未经纯化的酶切产物直接进行 PCR 时,PCR 反应特异性降低,出现众多非特异 PCR 产物;纯化酶切产物或用 PCR 缓冲液替代酶切缓冲液后,PCR 反应特异性变高。**结论** 酶切缓冲液可影响后续 PCR 反应的特异性,采取纯化措施或以 PCR 缓冲液替代酶切缓冲液能够有效提高后续 PCR 特异性,首选 PCR 缓冲液替代更为简便。

【关键词】 限制性内切酶缓冲液; 聚合酶链反应缓冲液; 纯化; 基因甲基化检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)21-2945-02

Optimization for PCR detection system of gene methylation^{*} CHUAI Zheng-ran, HUANG Qing, HUANG Jun-fu, FU Wei-ling (Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To optimize the methylation sensitive restriction enzyme(MSRE) polymerase chain reaction(PCR) detection system. **Methods** Methylation of RASSF1A gene from 10 healthy non-pregnant women was detected by MSRE-PCR. The buffer system of reaction was optimized. **Results** In directly conducting PCR with non-purified digested products, the specificity of PCR was decreased and many non-specificity PCR products appeared; by purifying digested products or using PCR buffer instead of digested buffer, the specificity of PCR was increased. **Conclusion** The digested buffer could affect the specificity of subsequent PCR. The purification of digested products or the replacement of digested buffer with PCR buffer can effectively improve the specificity of following PCR. In both, PCR buffer is first choice due to its more convenient.

【Key words】 endonuclease reaction buffer; PCR buffer; purification; gene methylation detection

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶的作用下,基因 DNA 序列 CpG 双核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价键结合一个甲基基团^[1]。DNA 甲基化是调控基因功能的重要修饰手段,在发生多种重大疾病(如恶性肿瘤、感染性疾病、遗传性疾病及出生缺陷等)时,DNA 甲基化水平会出现明显异常^[2-6]。因此,检测基因甲基化水平有助于多种重大疾病的早期诊断或疗效监测。目前,甲基化敏感限制性内切酶(MSRE)-聚合酶链反应(PCR)技术是检测基因甲基化水平最常用的手段之一^[7-8]。本文在检测健康未孕女性的 RASSF1A 基因甲基化水平过程中,初步探索了酶切反应体系对后续 PCR 反应的影响,并对体系进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 标本收集 选取 2013 年 1 月至 3 月在本院体检中心参加健康体检的 10 例未孕女性,年龄 24~34 岁,平均 28 岁,入选者签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 DNA 提取采用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Kit 试剂盒;酶切反应在 My Gene Series Peltier Thermal Cycler 中进行;酶切产物的纯化采用 TF Filter Tips (Purification Filter TrimGen 试剂盒)进行;PCR 扩增采用 BIO-RAD CFX96TM Real-Time System;BstU I 购自 New England Biolabs 公司;Ex Taq HS DNA Polymerase 试剂盒、DL2000 Marker 购于大连宝生物有限公司;Quant-iTTM PicoGreen dsDNA Assay Kit 购自 Invitrogen 公司。

1.3 方 法

1.3.1 标本采集 在严格无菌条件下抽取肘静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。

1.3.2 基因组 DNA 提取及测定 按试剂说明书,采用 QIAamp DNA Blood Kit 试剂盒提取基因组 DNA,最后用 200 μ L 洗脱液溶解,以 Quant-iTTM PicoGreen dsDNA Assay Kit 精确定量 DNA 浓度。

1.3.3 MSRE-PCR MSRE-PCR 的基本反应过程如下:首先以 MSRE BstU I 酶切基因组 DNA,然后 PCR 扩增酶切位点所在基因片段,根据扩增片段的有无判断是否甲基化(BstU I 只识别并切割未甲基化的特定 DNA 序列,若 DNA 未发生甲基化时,不会产生特异的 PCR 产物)^[9-10]。具体步骤如下。

1.3.3.1 DNA 酶切 酶切反应体系为 1 $\times$ NE 缓冲液 4(以下简称 NE Buffer 4),BstU I 50 U,基因组 DNA 50 ng,双蒸灭菌水补足 20 μ L。60 $^{\circ}$ C 酶切反应 16 h。

1.3.3.2 PCR 反应 取酶切产物 4 μ L 作为模板进行 PCR 扩增,PCR 体系为 1 $\times$ ExTaq HS DNA Polymerase 缓冲液(以下简称 ExTaq Buffer),2.5 μ mol/L 的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP),各 4 pmol/L 的上下游引物,0.5 U 的 ExTaq HS DNA Polymerase,其余用双蒸灭菌水补足 20 μ L 反应体系。PCR 反应参数:95 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ (68 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 30 s)40 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。

^{*} 基金项目:国家 863 重大专项基金资助项目(2011AA02A121,213AA020204);国家自然科学基金资助项目(81071429)。

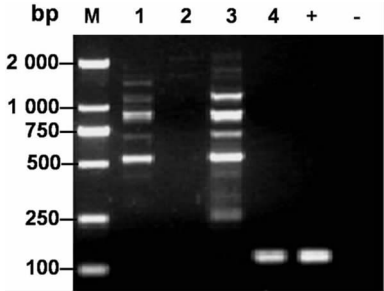
作者简介:揣征然,女,硕士研究生,初级技师,主要从事临床分子诊断方面研究工作。 Δ 通讯作者,E-mail:weilingfu@yahoo.com。

1.3.3.3 改良步骤-纯化 取 10 μ L 酶切产物采用 TF Filter Tips 进行纯化,以纯化产物进行后续 PCR。

1.3.3.4 改良步骤-缓冲液 以 ExTaq Buffer 代替 NE Buffer 4 进行酶切及 PCR 检测。

2 结 果

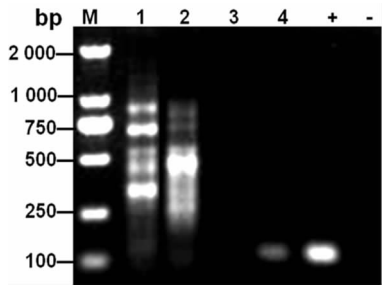
2.1 纯化步骤改善了 NE Buffer 4 对 PCR 反应的影响 在 NE Buffer 4 中,DNA 经 BstU I 酶切后,以酶切产物直接进行 PCR 扩增,结果发现大量非特异性条带(见图 1 的 1 号泳道);仅含有 NE Buffer 4、无 BstU I 的内切酶的对照组在 PCR 扩增后,出现类似的大量非特异性条带(见图 1 的 3 号泳道),表明 NE Buffer 4 存在会降低 PCR 扩增的特异性。酶切产物经纯化后,排除了 NE Buffer 4 的影响,PCR 扩增所产生的非特异条带明显减少(见图 1 的 2、4 号泳道)。



注:1 为 BstU I + 未纯化组;2 为 BstU I + 纯化组;3 为无 BstU I + 未纯化对照组;4 为无 BstU I + 纯化对照组;+ 为阳性对照;- 为阴性对照;M 为 DL2000 Marker;以上各组均以 NE Buffer 4 作为缓冲液。

图 1 DNA 酶切产物的 PCR 电泳结果

2.2 PCR 缓冲液可替代酶切缓冲液 以 ExTaq Buffer 代替 NE Buffer 4,进行酶切以及 PCR 反应后,结果没有检测到任何条带(见图 2 的 3 号泳道);而 ExTaq Buffer+无内切酶对照组的 PCR 结果仅仅显示 1 个条带(见图 2 的 4 号泳道);以上两个结果均与预期相符,说明用 ExTaq Buffer 代替酶切体系中的 NE Buffer 4 后,BstU I 同样可以彻底酶切 DNA,而且也不影响后续 PCR 的特异性。加入 NE Buffer 4 的两个对照组,PCR 产物均含有大量非特异性条带(见图 2 的 1、2 号泳道)。



注:1 为 NE Buffer 4+BstU I 对照组;2 为 NE Buffer 4+无 BstU I 对照组;3 为 ExTaq Buffer+BstU I 组;4 为 ExTaq Buffer+无 BstU I 组;+ 为阳性对照,- 为阴性对照;M 为 DL2000 Marker。

图 2 同 Buffer 未纯化酶切扩增产物电泳结果

3 讨 论

近年来,DNA 甲基化的相关研究受到广泛重视^[11],与之相应出现了一系列 DNA 甲基化水平的检测方法^[12-13]。而 MSRE 法是最经典的一种方法^[14]。该方法利用 MSRE 不切割甲基化位点的特性,特异性地切断未发生甲基化的区域,将 DNA 消化为大小不等的片段,再进行特异性的 PCR 扩增,根据 PCR 产物的有无来分析判断 DNA 是否发生了甲基化。

在未孕女性中,RASSF1A 基因的甲基化水平通常很低,

因此在 MSRE 法检测中,基因将被切断,后续特异性 PCR 反应无法进行,检测结果也不能检测到 PCR 产物。但在本研究中,发现酶切体系的缓冲液 NE Buffer 4 会影响后续 PCR 反应的特异性,使 PCR 产物出现大量的非特异性条带。究其原因,可能是 NE Buffer 4 中含有乙酸钾、二硫苏糖醇(DTT)等成分,这些成分被引入 PCR 反应后,可降低引物与模板结合的特异性,引发大量错配,从而降低了 PCR 的特异性。

为去除 NE Buffer 4 对后续 PCR 反应的影响,本研究在酶切实验之后,对酶切产物进行纯化处理,结果比较理想,PCR 产物的非特异性条带消失,目的条带单一。但纯化步骤可能会带来某些潜在影响,譬如因为技术原因,部分短链 DNA 可能会在纯化过程中丢失,若丢失的 DNA 包含了目标 DNA,则会造成假阴性结果;此外,即使是长链 DNA,在纯化后也会丢失一部分,若 DNA 起始浓度很低时,将会因为 DNA 的丢失而影响 PCR 的敏感度,造成假阴性。同时纯化步骤比较繁琐、费时费力。所以本研究进一步探索了省略纯化步骤的改良方法。

经验证,以 ExTaq Buffer 代替 NE Buffer 4 进行酶切时,BstU I 同样可以彻底酶切 DNA,其原因可能是 ExTaq Buffer 的离子浓度、pH 等关键成分与 NE Buffer 4 比较相似,因此基本可以保障 BstU I 发挥酶切功能,而且后续 PCR 反应初期的 95 $^{\circ}$ C 变性步骤可以高温灭活内切酶,因而内切酶对 PCR 反应基本不会造成影响。此种方法较上述纯化改良方法更为简便,对后续反应的影响也很小。

虽然本研究中 ExTaq Buffer 可以代替 NE Buffer 4 进行酶切,但这种改良并非普遍适用,取决于 PCR Buffer 的离子浓度、pH 等成分和酶切 Buffer 是否相近,若相差较远则不可相互替代,否则会出现酶切不完全或者不能酶切的情况。此时建议通过纯化的方法去除酶切 Buffer 的影响。

参考文献

- [1] 府伟灵. 临床检验学实用技术与新进展[M]. 北京:人民军医出版社,2005.
- [2] 韩竟男,鲁昊骋,梁静. DNA 甲基化与癌症[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2012,28(2):108-114.
- [3] 吕斌斌,彭剑雄. DNA 甲基化与基因沉默及肿瘤[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(1):52-54.
- [4] 宋长山,杨光,谭家驹. DNA 甲基化与食管癌的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志,2007,14(1):71-74.
- [5] 景坤玉,薛乐勋,郭明洲. DNA 甲基化在结直肠癌诊疗中的应用前景[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(3):201-205.
- [6] 黄钧,蒋小青,蒋犁. DNA 甲基化与胚胎发育的研究进展[J]. 国外医学:妇产科学分册,2007,34(1):8-11.
- [7] 黄留玉. 生物实验室系列-PCR 最新技术原理,方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2011:12-13.
- [8] Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A Universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Clin Chem,2006,52(12):2211-2218.
- [9] 府伟灵,徐克前. 临床生物化学检验[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2012:21-22.
- [10] 潘娜,郭会君,赵世荣,等. 小麦 TILLING 分析中 CEL I 酶切及 PCR 反应体系的优化[J]. 植物(下转第 2949 页)

本研究发现,38 例新生黄疸患儿和 46 例早产低体质量儿原血片中 12 种相同氨基酸水平(Ala、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro)较召回血片升高($P<0.05$);新生黄疸患儿原血片中 Gln 及 Arg 水平偏低($P<0.05$)。本文对以上氨基酸水平变化的影响因素进行分析,新生儿黄疸能导致不同程度的神经系统损害,同时能引起心、肝、肾等器官的脂质过氧化损伤^[4];早产低体质量儿因机体各器官发育不成熟,机体的正常代谢机制亦尚未完善。原血片中 Ala、Thr、Leu、Val、Tyr、Pro 均明显升高,主要是由于这些氨基酸均与肝脏的受损和修复相关^[5]。肝脏蛋白质分解产生的支链氨基酸如 Val、Leu,经血液运往肌肉,与肌肉的支链氨基酸一起进行分解代谢,脱氨基以合成 Ala。新生黄疸患儿及早产低体质量儿原血片中 Val、Leu 水平明显升高,提示机体可能存在有助于 Ala 生成的机制,而 Ala 对肝脏损伤有很强的修复作用^[6]。因此,新生黄疸患儿及早产低体质量儿血液中 Ala、Thr、Leu、Val、Tyr、Pro 氨基酸水平的升高反映机体处于自我调节从而达到自我修复的状态,待召回复查时,机体处于稳定状态,各种氨基酸的水平相对下降。

Phe、Met、Gly、Orn、Sern、Trp 水平升高考虑是由于新生黄疸患儿及早产低体质量儿肝脏功能发育不完全或肝损伤,其相对应的代谢酶活性低或合成酶不足,正常代谢模式尚未完全建立引起的一过性升高,如 Phe 羟化酶活性轻度延迟,会引起一过性的 Phe 升高^[7]。

此外,研究中发现新生黄疸患儿原干血滤纸片中 Gln 及 Arg 水平明显偏低,主要原因是血清胆红素水平对新生儿免疫功能产生不同程度影响^[8]。胆红素具有细胞毒作用,可导致患儿免疫性淋巴细胞凋亡增加^[9]。新生黄疸患儿肝脏功能不全,Gln 合成酶活性低,Gln 合成不足,且小肠上皮细胞内 Gln 池贮量小,进行蓝光治疗时,机体处于抗氧化的应激状态,谷胱甘肽(GSH)又作为人体内最强的抗氧化剂,肠黏膜细胞将大量摄取 Gln 以合成 GSH,以维持机体的抗氧化作用;新生黄疸患儿肠肝循环的增加时,Gln 能刺激肠道黏膜改善血流状态,肠上皮细胞中 Gln 酶活性升高,增加对 Gln 的利用,以减少肠道的损伤并进行修复。Gln 作为肠道黏膜细胞及各种快速生长细胞的代谢氧化燃料,同时调控许多有关代谢、细胞防卫和细胞修复的基因表达^[10-11],而 Arg 同样具有扩张组织血管,维持血流通畅并调节机体免疫反应的作用^[12]。Gln 及 Arg 作为免疫营养氨基酸,在提供能量的同时增强机体免疫功能、减轻有害或过度的炎性反应、保护肠黏膜屏障功能完整性、促进修复,使机体恢复稳定状态^[13-14]。患儿处于黄疸时期,机体对 Gln 及 Arg 的需求量超过其产出量,从而导致了体内 Gln 及 Arg 水平均处于低水平状态,待召回复查时,黄疸时期已过且机体处于稳定状态,故体内 Gln 及 Arg 含量升高。

由此可见,新生儿黄疸及早产低体质量严重地影响了新生儿多种氨基酸水平变化,实验室对在氨基酸遗传代谢病检测结

果进行判断时,应结合新生儿病史,排除假阳性,从而减轻新生儿筛查工作者的压力及家长的精神负担。

参考文献

- [1] Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport; characteristics, regulation, and metabolic significance[J]. Nutrition, 2002, 18(9): 761-766.
- [2] 王洪允, 江骥, 胡蓓. 串联质谱在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 质谱学报, 2011, 32(1): 24-30.
- [3] 顾学范, 韩连书, 高晓岚, 等. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(6): 401-404.
- [4] 黄健瑜, 肖昕. 高胆红素血症新生儿血浆 8-异-前列腺素 F(2 α)水平与心肌酶谱和肝肾功能的相关性[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(2): 121-123.
- [5] Rasul CH, Hasan MA, Yasmin F. Outcome of neonatal hyperbilirubinemia in a tertiary care hospital in Bangladesh[J]. Malays J Med Sci, 2010, 17(2): 40-44.
- [6] Chadalavada R, Biyyani RS, Maxwell J, et al. Nutrition in hepatic encephalopathy[J]. Nutr Clin Pract, 2010, 25(3): 257-264.
- [7] Arnopp JJ, Lorey FW, Currier RJ, et al. Results of screening for phenylketonuria using a lower cutoff value in early collected specimens[J]. Screening, 1995, 3(4): 193-199.
- [8] 纪凤英, 兰鹏华. 光疗对高胆红素血症新生儿细胞免疫状态的影响[J]. 护理实践与研究, 2009, 6(24): 8-10.
- [9] 叶中绿, 沈丹, 柯宇华, 等. 思连康对高胆红素血症新生儿免疫功能和细胞因子水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(2): 179-181.
- [10] Chwals WJ. Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine[J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(8): 833-838.
- [11] Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, et al. Molecular mechanisms of glutamine action[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(2): 392-401.
- [12] Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010, 13(1): 97-104.
- [13] Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients[J]. Br J Nutr, 2007, 98(Suppl 1): 133-139.
- [14] Santora R, Kozar RA. Molecular mechanisms of pharmacutrients[J]. J Surg Res, 2010, 161(2): 288-294.

(收稿日期: 2014-03-02 修回日期: 2014-05-08)

(上接第 2946 页)

- 遗传资源学报, 2012, 13(5): 830-837.
- [11] 吕建新, 尹一兵. 分子诊断学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 62-63.
 - [12] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9821-9826.

- [13] 朱燕, 武淑兰, 屈晨雪, 等. 限制性内切酶结合竞争聚合酶链反应定量检测在多药耐药基因甲基化状态中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 409-411.
- [14] 宋美华, 唐金海, 吴建中, 等. 乳腺癌组织 CCNA1 启动子区甲基化与肿瘤转移的相关性[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1321-1323.

(收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-04-12)