

TCRP1 基因启动子区 CpG 岛测序体系的建立^{*}

罗 凯,仇秦威,王 倩,容 毓,贺智敏[△](广州医科大学肿瘤研究所/广州医科大学附属肿瘤医院,广州 510095)

【摘要】 目的 建立可用于舌癌耐药蛋白 1(TCRP1)基因启动子区 CpG 岛测序检测的反应体系。**方法** 采用人肺癌 A549 细胞作为待测样品,以 TCRP1 启动子区 CpG 岛为靶片段设计特异扩增、测序引物,建立 TCRP1 启动子区 CpG 岛测序检测反应体系,并检测 H1299、H460、Huh-7 细胞株和 2 例患者肿瘤组织标本。**结果** 建立了以 P2-1[二甲基亚砷(DMSO)终浓度 0%,降落聚合酶链反应(PCR)条件]联合 P1-2(DMSO 终浓度 1%,常规 PCR 反应条件)为优选方案的 TCRP1 启动子区 CpG 岛测序检测体系,并成功检测了 A549、H1299、H460、Huh-7 细胞株和 2 例患者肿瘤组织标本。**结论** 成功建立可用于 TCRP1 启动子区 CpG 岛测序的反应体系。

【关键词】 舌癌耐药蛋白 1; 启动子; CpG 岛; 聚合酶链反应; 基因测序; 二甲基亚砷

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)07-0891-04

Establishment of a method for sequencing CpG islands located at the promoter region of TCRP1 gene^{*} LUO Kai, QIU Qin-wei, WANG Qian, RONG Yu, HE Zhi-min[△] (Cancer Institute/Affiliated Cancer Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

【Abstract】 Objective To establish a method for sequencing the CpG islands located at promoter region of tongue cancer-resistant protein 1 (TCRP1) gene. **Methods** A method for sequencing the CpG islands located at the promoter region of TCRP1 gene was established with specific polymerase chain reaction (PCR) and sequencing primers by using human cell line A549. Then human cell line H1299, H460, Huh-7 and 2 clinical samples were tested by using established method. **Results** An optimized sequencing system, consisted of P2-1 [with 0% dimethyl sulphoxide (DMSO), using slow-down PCR conditions] and P1-2 (with 1% DMSO, using normal PCR conditions), was successfully used in detection of human cell line H1299, H460, Huh-7 and 2 clinical samples, which could be applied for sequencing the CpG islands located at promoter region of TCRP1 gene. **Conclusion** A system for sequencing the CpG islands located at promoter region of TCRP1 gene was successfully established.

【Key words】 tongue cancer-resistant protein 1; promoter; CpG islands; polymerase chain reaction; DNA sequencing; dimethyl sulphoxide

舌癌耐药蛋白 1(TCRP1)编码基因位于人 11 号染色体,有 4 种不同剪切体,所编码的 TCRP1 蛋白在肿瘤发生、发展与治疗中的作用及其调控机制尚未完全阐明^[1-2]。有研究证实,以 TCRP1 基因 1 号外显子第 1 个碱基为+1,其+322~+709 碱基片段为启动子结合区^[2]。CpG 岛通常存在于真核生物管家基因调控区,可通过甲基化修饰调控相应基因的表达。因此对 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛进行测序确定有助于明确该基因的调控机制与功能。在线工具(<http://www.urogene.org/>)分析结果显示,在上述启动子结合区附近(-287~+566)存在 1 个长度为 854 bp 的 CpG 岛。Sanger 直接测序法以聚合酶链反应(PCR)为基础,因此采用 PCR 技术有效扩增 DNA 目的片段是进行 Sanger 直接测序的前提。然而,富集 GC 碱基的 DNA 目的片段通常由于受到链内二级结构较为复杂、引物错配位点多等因素的影响,PCR 扩增极易失败,进而无法采用 Sanger 直接测序法进行测序分析。TCRP1 基因启动子区 CpG 岛 GC 含量为 69.8%,属高 GC 含量 DNA 片段。

本研究以其为靶点,通过引物设计与筛选、辅助物添加、反应条件选择等不同层面的优化,成功完成 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛测序分析。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人肺癌细胞株 A549、H460、H1299,人肝癌细胞株 Huh-7,以及 2 例分离自非小细胞肺癌患者的新鲜肿瘤组织标本均由本研究所保藏。

1.2 仪器与试剂 Veriti 型梯度 PCR 扩增仪、3130xl 型遗传分析仪购自美国 ABI 公司。DNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂、DNA 测序试剂和二甲基亚砷(DMSO)分别购自天根生化科技(北京)有限公司、美国赛默飞世尔科技公司、美国 ABI 公司和美国 SIGMA 公司。DNA 分子标记物 DNA Marker I、1 kb DNA ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 以 GeneBank 数据库中人 TCRP1 基因上游启动子区序列(AC_000143.1)为靶序列,采用 Primer5.0 软

^{*} 基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20124423110003);广东省自然科学基金资助项目(S2012010008995)。

作者简介:罗凯,男,副主任检验师,硕士,主要从事肿瘤靶向治疗分子标志物筛选与检测研究。

[△] 通讯作者,E-mail:hezhimin2005@yahoo.com。

件设计扩增及测序引物,引物序列见表 1。其中,P1、P2 系统采取两段式设计,首先扩增并测序 CpG 岛上、下游部分,然后拼合获得 CpG 岛全序列。P3 系统的 PCR 扩增部分采用一段

式设计,一次性扩增整个 CpG 岛区域,再采用多条测序引物分段进行测序,最后拼合获得 CpG 岛全序列。所有引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛段扩增及测序引物序列(5'~3')

引物编号	扩增引物	测序引物
P1-1	TTG GCT TTA TTC CAT TGT CC	GGC TTT ATT CCA TTG TCC G
	AGT CCT CCT CCC TTG TCG	AGT CCT CCT CCC TTG TCG
P1-2	CCA TCC GCC ACC CTA CT	GGC TTT ATT CCA TTG TCC G
	CTC CTG CCA CCT CCA TC	TGC CAC CTC CAT CAT CC
P2-1	TGG AGA CGC TGC GAG TA	CGG CGC TCT GAG GCT GTG
	TCG CCC GTG TCC AGT A	CGC CCG TGT CCA GTA GGG
P2-2	CCT TCC CTG CCC TTC TG	TTC CCT GCC CTT CTG AGC G
	GTT GGG TTA TTC TCC ATC AAA A	CCA GCC CGC CGT TCC
P3	TAA CAT GGA GGA AGA ACC G	AGG AAG AAC CGA GAA CTC CAT CT
	TAA CAT GGA GGA AAA ACC G*	GGT TGG CTT TAT TCC ATT GTC C
	GCC AAA CCC AAA TCA CC	CGC CAC CCT ACT GGA CAC G

注: * 表示该引物为上游引物的简并引物,使用时与上游引物以 1:2 比例配制为混合液。

1.3.2 PCR 反应 (1)常规 PCR 反应:以 A549 细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应最佳退火温度的筛选。反应体系: Taq Green mix 试剂 10 μL、上游引物(10 μmol/L)1 μL、下游引物(10 μmol/L)1 μL、纯水 6 μL、DNA 模板 2 μL,总体积 20 μL。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s、退火 25 s、72 ℃ 50 s 循环 35 次(退火温度包括 50、53、56、59、62、65 ℃);72 ℃ 7 min。(2)添加 DMSO 的 PCR 反应:分别向常规 PCR 反应体系中添加 DMSO 至其终浓度分别为 0%、1%、3%、5%、8%、10%,相应 DMSO 溶液体积自纯水中扣减。利用筛选所得的各对扩增引物的最佳退火温度依常规反应条件进行 PCR 扩增。观察 DMSO 对 PCR 扩增效率及特异性的影响。(3)降落 PCR 与 Slow-down PCR 反应:利用降落 PCR 反应条件同时扩增常规 PCR 反应体系和含 1% DMSO 的 PCR 反应体系。降落 PCR 反应条件如下。预变性:95 ℃ 3 min;降落循环反应:95 ℃ 30 s、68~51 ℃ 25 s(自第 2 个循环起每个循环下降 1 ℃)、72 ℃ 50 s 循环 18 次;固定退火温度循环反应:95 ℃ 30 s、各引物对最佳退火温度(P1-1 62 ℃,P1-2 62 ℃,P2-1 62 ℃,P2-2 59 ℃,P3 56 ℃)25 s、72 ℃ 50 s 循环 25 次;延伸:72 ℃ 7 min。利用降温速率为 33%和 66%的 Slow-down PCR 反应条件同时扩增常规 PCR 反应体系和含 1% DMSO 的 PCR 反应体系。Slow-down PCR 反应条件与降落 PCR 基本一致,区别在于 Slow-down PCR 在“降落循环反应”和“固定退火温度的循环反应”阶段由变性温度 95 ℃降低至相应退火温度的降温速率更为缓慢,分别设置为 33%或 66%。(4)PCR 产物鉴定:2%琼脂糖电泳鉴定 PCR 扩增产物。

1.3.3 测序反应 (1)PCR 产物纯化:将 2 μL 虾碱性磷酸酶混合物加入 5 μL PCR 产物中,37 ℃放置 1 h,80 ℃放置 15 min。(2)测序反应:测序反应体系包括纯化后 PCR 产物 2 μL、Bigdye3.1 试剂 1 μL、测序引物(10 μmol/L)1 μL、纯水 2 μL。反应条件:96 ℃ 1 min;96 ℃ 10 s、50 ℃ 5 s、60 ℃ 4 min,循环 25 次。测序反应产物经醋酸乙酯纯化后上机测序。采用 Chromas2.23 软件读取测序结果,并与标准序列进行比对

分析。

1.3.4 样品检测 采用上述方法建立的 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛测序体系检测所收集的细胞株与临床标本。

2 结 果

2.1 常规 PCR 反应结果 P2-1 体系 PCR 产物电泳鉴定可见长度为 451 bp 的目的条带,退火温度为 62 ℃时的目的条带最为清晰、明亮,故选择 62 ℃为最佳退火温度。P1-2 与 P2-2 体系电泳图分别可见长度为 667、526 bp 的目的条带,退火温度分别为 62、59 ℃时,二者的目的条带最为清晰、单一,故分别选择 62、59 ℃为最佳退火温度。P1-1 与 P3 体系电泳图未见目的条带,综合考虑引物解链温度,分别选择 62、57 ℃为后续实验退火温度。

2.2 添加 DMSO 的 PCR 反应结果 添加不同比例 DMSO 的 P1-1 体系 PCR 产物电泳图未见任何扩增条带。DMSO 终浓度为 0%、1%、3%的 P1-2 体系电泳图可见目的条带。DMSO 终浓度为 0%、1%、3%、5%的 P2-1 体系电泳图可见单一目的条带。DMSO 终浓度为 0%、1%的 P2-2 体系电泳图可见单一目的条带。DMSO 终浓度为 1%的 P3 体系电泳图可见微弱的长度为 1 174 bp 的单一目的条带。添加 DMSO 的 PCR 反应产物电泳图见图 1。

2.3 降落 PCR 与 Slow-down PCR 结果 (1)采用降落 PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 0%、1%的 P1-2、P2-1、P2-2 体系 PCR 产物电泳图均可见目的条带,仅 DMSO 终浓度为 1%的 P3 体系 PCR 产物电泳图可见目的条带,P1-1 体系 PCR 产物电泳图未见任何扩增条带。降落 PCR 产物电泳图见图 2。(2)采用 66%降温速率 Slow-down PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 0%、1%的 P1-2、P2-1、P2-2 体系 PCR 产物电泳图均可见目的条带,但非特异性条带增多;仅 DMSO 终浓度为 1%的 P3 体系 PCR 产物电泳图可见目的条带,但同时伴随 1 条非特异性条带;P1-1 体系 PCR 产物电泳图未见任何扩增条带。(3)使用 33%降温速率 Slow-down PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 0%、1%的 P2-1 体系 PCR 产物电泳图可见目的条带,其

余体系 PCR 产物电泳图均未见目的条带。

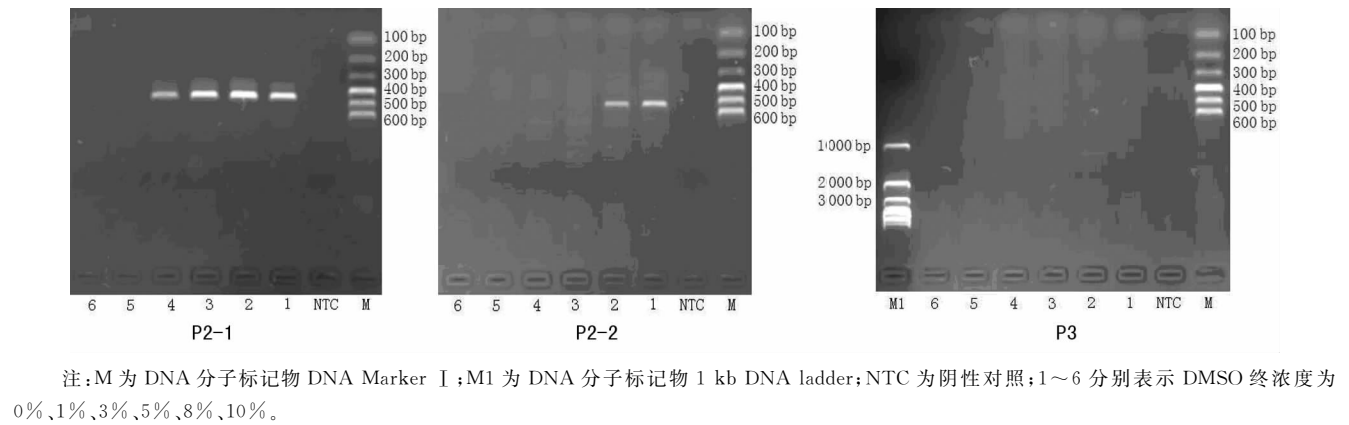


图 1 添加 DMSO 的 PCR 反应产物电泳图

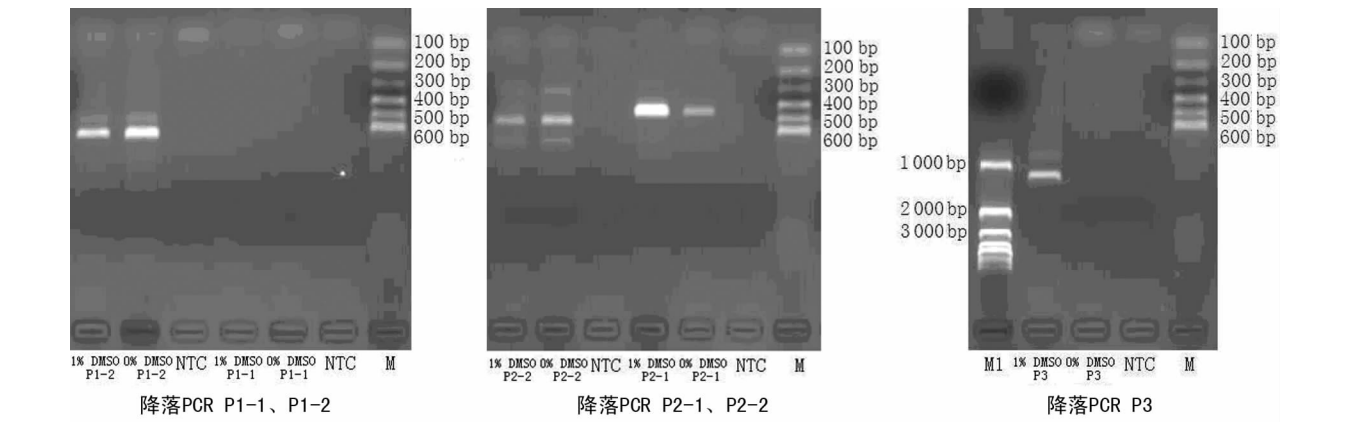


图 2 降落 PCR 产物电泳图

2.4 测序反应结果 采用常规 PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 1%的 P2-1、P2-2 体系 PCR 产物正、反向测序均成功,所得序列与标准序列完全相符。采用降落 PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 0%、1%的 P1-2、P2-1、P2-2 体系 PCR 产物正、反向测序均成功,所得序列与标准序列完全相符。采用降落 PCR 反应条件时,DMSO 终浓度为 1%的 P3 体系 PCR 产物正、反向测序均成功,所得序列与标准序列基本相符,片段实测长度为 1 174 bp,较设计片段长 16 bp,增加的片段序列为 GGG AGA GAG GGA GAG A,位于设计片段正向 160~183 bp。以上结果表明 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛测序体系(P1-2、P2、P3 体系)已初步建立。确定以 P1-2(DMSO 终浓度 0%,降落 PCR 反应条件)、P2(DMSO 终浓度 1%,常规 PCR 反应条件)和 P3(DMSO 终浓度 1%,降落 PCR 反应条件)测序检测体系作为后续样品的检测体系。

2.5 样品检测结果 P1-2、P2 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛测序体系均成功检测 3 株细胞和 2 例临床标本,所得序列与标准序列相符。P3 体系成功检测 2 株细胞和 2 例临床标本,H460 细胞未检出。在获得测序结果的细胞和样品中,Huh-7 细胞和 2 例临床标本所测序列与标准序列相符,H1299 细胞所测序列与标准序列相比多出 16 bp,序列为 GGG AGA GAG GGA GAG A。

3 讨 论

在人类基因组中,仅约 3%的 DNA 片段属于高 GC 富集区,但有 28%的基因位于这些区域^[3]。与此同时,很多基因的

重要调控区域(如启动子、增强子等的结合区)也位于高 GC 富集区。CpG 岛是 DNA 上一段富含由磷酸酯键相连的胞嘧啶、鸟嘌呤二核苷酸的区域,常位于真核生物管家基因的调控区,通过甲基化修饰调控相应基因的表达,也属于高 GC 富集区^[4]。TCRP1 基因上游存在 1 个 854 bp 的 CpG 岛,GC 含量达 69.8%,对该片段进行测序分析对于了解基因的调控机制与功能具有重要意义。

成功扩增目的片段是对其进行测序分析的前提,但对 GC 富集区的 DNA 片段进行有效的 PCR 扩增较为困难。直接影响扩增成功与否的因素包括合理的引物设计,以及反应体系和反应条件的优化。

相关研究显示,高 GC 含量的 DNA 片段二级结构较为复杂,且存在较多的错配位点,影响引物的有效、正确结合和 DNA 聚合酶的推进,导致 PCR 扩增失败^[5]。此外,如果所设计的引物正好位于二级结构区,则会直接导致扩增失败。故本研究采取了以下设计策略:(1)设计两套扩增引物,各分两段扩增 TCRP1 基因启动子区的 CpG 岛,而每对引物仅有 1 条位于 CpG 岛内的 GC 富集区,以此降低引物位于高 GC 片段二级结构区的概率,同时也实现了最佳扩增引物对的筛选。(2)另设计 1 对分别位于 CpG 岛两侧的引物,以避免引物位于高 GC 片段的二级结构区,有利于引物和模板的结合。在本研究中,P2、P3 体系最终成功扩增目的片段,提示上述引物设计策略是可行的,但 P1 体系中仅 P1-2 引物对成功扩增目的片段,提示 P1-1 引物对中的引物可能位于目的片段的二级结构区。同

时,本研究发现相比参考序列,P3 体系扩增的目的片段多出了含有 16 个碱基的片段,提示在该区域可能存在基因多态性,如引物位于该区域,有可能导致扩增失败,因此根据实际测序结果适当调整引物设计位点也是必要的。

相关研究报道,DMSO、甘油、甜菜碱等物质有助于高 GC 模板解链,从而促进 PCR 的有效扩增,有助于扩增高 GC 片段的成功率和特异性^[6-9]。另有研究显示,PCR 反应体系中含有浓度为 5% 的 DMSO 有助于高 GC 片段的扩增^[10]。本研究结果显示,在 P1、P2 体系中加入 DMSO 并未提高扩增的成功率和特异性,但在 P3 体系中,加入 DMSO 并使其终浓度达到 1%,是目的片段成功、特异扩增的必需条件。然而随着 DMSO 终浓度的增加,表现出对 PCR 反应的抑制效应。以上结果提示在 PCR 反应体系中加入 DMSO 仅可提高部分高 GC 片段的扩增效率和特异性,考虑可能与目的片段是否具有二级结构有关。此外,本研究结果所显示的 DMSO 最佳终浓度(1%)与其他研究报道存在一定的差异,可能与使用的 DNA 聚合酶及反应体系设置不同有关。因此,在设计优化的高 GC 片段扩增体系时,必须结合自身实验条件。

Bachmann 等^[3]利用 Slow-down PCR 成功扩增了 GC 含量大于 83% 的目的片段,并发现其扩增效果优于降落 PCR。本研究也利用两种方法扩增了 TCRP1 基因启动子区的 CpG 岛,结果显示采用降落 PCR 反应条件可促进 P3 体系(DMSO 终浓度 1%)的扩增效率和特异性,但在其他体系中未观测到相关效应。降温速率 66% 的 Slow-down PCR 反应条件促进了 P3 体系的扩增效率,但并未促进其特异性。在其他反应体系中,Slow-down PCR 未体现出促进 PCR 扩增效率和特异性的功能。分析其原因可能是由于反应条件仅为保证 PCR 成功扩增高 GC 片段的重要条件之一,不同的反应条件需与不同的引物对、反应体系及添加物相配合,方能提高 PCR 的扩增效率和特异性。

本研究还利用错位设计模式将各测序引物的 3' 端设计在扩增引物的 3' 端内侧,以此提高测序反应的特异性。因此,虽然 P1-2、P2-2 体系的 PCR 扩增产物中存在非特异性条带,但在测序时仅目的片段的序列可被检测,由此提高了测序反应的特异性。

在本研究中,H460 细胞未能被 P3 体系成功检测,同时在 P3 体系检出的细胞和组织样品中,TCRP1 基因 CpG 岛的上游也存在多态性现象,提示 P3 体系的上游扩增引物可能位于多态性区域,从而导致 H460 细胞检测失败。虽然 P1-2、P2 体系均可检出所有细胞与组织样品,但 P2-1 联合 P1-2 方案却是检出率最高且所覆盖的 CpG 岛范围最为完整的方案,因此该联合检测方案可作为 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛扩增、测序的优选方案。但本研究所检测的细胞种类和组织样品例数相对较少,有待后续更大规模的实验验证。

综上所述,在对 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛进行测序

时,可通过合理设计引物、选择添加物和优化反应条件实现目的片段的扩增、提高扩增反应的特异性,而提高测序反应的特异性需要设计 3' 端内移的特异性测序引物。本研究成功建立了 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛扩增、测序体系,其中以 P2-1 联合 P1-2 检测方案为优选方案。

参考文献

[1] 郑国涛,易思思,贾小婷,等. C-myc 上调 TCRP1 表达与舌癌细胞对顺铂耐受相关[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(3):272-278.

[2] 易思思. 舌癌耐药相关基因 TCRP1 启动子克隆及转录调控研究[D]. 长沙:中南大学,2011.

[3] Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique[J]. Pharmacogenetics, 2003, 13 (12):759-766.

[4] Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. Genes Dev, 2011, 25(10):1010-1022.

[5] Pratyush D, Tiwari S, Kumar A, et al. A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification[J]. Gene, 2012, 497(2):269-272.

[6] Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences[J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(3):1048-1054.

[7] Farell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates [J/OL]. BMC Res Notes, 2012-05-24 [2014-12-10], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624992>.

[8] Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis[J/OL]. PLoS One, 2010-06-11 [2014-12-10], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883997/>.

[9] Wei M, Deng J, Feng K, et al. Universal method facilitating the amplification of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA[J]. Anal Chem, 2010, 82(14):6303-6307.

[10] Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, et al. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence[J]. J Clin Labor Anal, 2013, 27(6):487-493.

(收稿日期:2014-11-05 修回日期:2014-12-22)

(上接第 890 页)

染结合流式细胞分选方法构建稳定过表达 CUEDC2 的 MCF-10A 细胞系[J]. 科学技术与工程, 2012, 12(24):6148-6151.

[9] Moussavi M, Moshgabadi N, Fazli L, et al. Fibroblast growth factor and ornithine decarboxylase 5'UTRs enable preferential expression in human prostate cancer cells and in prostate

tumors of PTEN(-/-) transgenic mice[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(1):19-29.

[10] 刘建军,张茂雷,朱芳芳. 实时荧光定量 PCR 筛选有效 RNA 干扰方法的建立[J]. 检验医学与临床, 2010, 7 (10):903-905.

(收稿日期:2014-11-22 修回日期:2014-12-28)