

亚硫酸氢盐测序法检测上皮钙黏蛋白甲基化的优化探讨^{*}

廖 静¹, 鲁文清², 刘 渠¹, 谢显清¹, 李小峰^{3△} (1. 广东省深圳市龙岗区疾控中心 518172; 2. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 武汉 430030; 3. 广东省深圳市龙岗区人民医院 518172)

【摘要】 目的 探讨改进的亚硫酸氢盐测序法在上皮钙黏蛋白甲基化检测中的可行性。**方法** 提取雄性 F344 大鼠肾脏组织基因组 DNA, 亚硫酸氢盐化学转化, 通过 PCR 扩增上皮钙黏蛋白基因启动子区特定的序列, 以蓝白克隆斑筛选和测序。**结果** 雄性 F344 大鼠肾脏上皮钙黏蛋白基因启动子区 CpG 岛的 26 个 CpG 位点均未发生甲基化。**结论** 改进后亚硫酸氢盐测序法能明显减少非特异性扩增, 提高 PCR 效率, 更适于基因甲基化状态的检测。

【关键词】 DNA 甲基化; 大鼠; 上皮钙黏蛋白; 肾脏

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 06. 007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)06-0741-02

Study on optimization of E-cadherin methylation detection by modified bisulfite sequencing^{*} LIAO Jing¹, LU Wen-qing², LIU Qu¹, XIE Xian-qing¹, LI Xiao-feng^{3△} (1. Longgang District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518172, China; 2. College of Public Health, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China; 3. Longgang District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518172, China)

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of the modified bisulfite sequencing method in the E-cadherin methylation detection. **Methods** The genomic DNA was extracted from the kidney tissues of male F344 rats and chemically converted with bisulfite sodium. Then the specific sequence in the E-cadherin promoter region was amplified by PCR. The screening and sequencing were performed by the blue-white spot screening. **Results** No methylation change occurred at 26 CpG sites in the CpG islands of E-cadherin gene promoter in the kidney of male F344 rats. **Conclusion** The modified bisulfite sequencing method can obviously reduce the non-specific amplification, improves the efficiency of PCR and is more suitable for the detection of gene methylation status.

【Key words】 DNA methylation; rats; E-cadherin; kidney

目前, 亚硫酸氢盐测序法是国内外学者公认的 DNA 甲基化位点检测金标准, 可准确而灵敏地检测出特定 DNA 序列不同胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)位点的甲基化状态, 但是在实验过程中频繁出现的 PCR 扩增效率低下是该研究停滞不前的重要原因之一^[1-3]。本研究借鉴文献中报道的 PCR 引物, 通过摸索基因组 DNA 浓度和 Mg²⁺ 浓度来探讨如何在抑制非特异性扩增的同时提高扩增效率, 成功鉴定了雄性 F344 大鼠肾脏上皮钙黏蛋白基因启动子区 CpG 岛 26 个 CpG 位点的甲基化状态^[4-6]。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 选用无特异病原体(SPF)级 6~7 周龄的雄性 F344 大鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠饲养于华中科技大学同济医学院动物实验中心的 SPF 级动物房。实验动物室温度控制在 22~25 ℃, 湿度控制在 30%~40%, 光线控制在 12/12-h 循环。常规饲料和饮用水由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。以股动脉放血法处死大鼠, 收集肾脏, 剪除结缔组织, 取肾皮质剪碎成 50~100 mg 小块组织, 液氮速冻, 保存于一 80 ℃ 冰箱。组织基因组 DNA 提取试剂盒和 TA 克隆试剂盒分别购自中国北京市天根生物有限公司和中国北京市全式金生物科技有限公司; 正常熔点琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司; 热启动 Taq 酶、DNA

甲基化转化试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒分别由美国 Fermentas 公司、美国天漠公司和美国 Omega 公司提供; 甲基化 PCR 引物由上海大连宝生物工程公司提供; 其余试剂为国产分析级的试剂。

1.2 基因组 DNA 的制备 采用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 用核酸定量仪测量基因组 DNA 的浓度和纯度, 通过 0.5%~1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。对检测合格的 DNA 样本置于一 20 ℃ 冰箱备用。

1.3 基因组 DNA 亚硫酸氢盐转化 采用甲基化转化试剂盒修饰基因组 DNA, 用核酸定量仪测量修饰好的基因组 DNA 浓度, 再将其置于一 20 ℃ 冰箱备用。

1.4 PCR 扩增 上皮钙黏蛋白基因的 PCR 引物序列为 F: 5'-GGAATAAGGAAGTAAGGAAGTT-3' 和 R: 5'-CCACAT-ACCTACAACAAAAACA-3', 扩增产物长度为 365 bp。PCR 采用 50 μL 反应体系, 改变转化后基因组 DNA 和 Mg²⁺ 的终浓度, 引物序列及其他组分终浓度均不变, 详见表 1。PCR 反应条件: 94 ℃ 预加热 10 min; 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s; 重复上述循环 30 次。72 ℃ 保持 60 s 后, 4 ℃ 保存。产物均采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察、拍照。也可根据琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书的操作步骤回收目的 PCR 产物。将回收完毕的目的 PCR 产物置于 4 ℃

^{*} 基金项目: 深圳市卫生技术系统科研项目(201402126)。

作者简介: 廖静, 女, 博士, 主管医师, 主要从事职业病防治工作及尘肺病的研究。 △ 通讯作者, E-mail: 28904884@qq.com。

待用。

1.5 目的基因的克隆及筛选 纯化回收 PCR 产物后于载体连接、转化入 Trans1-T1 感受态细菌中,行蓝白克隆筛选;以通用引物 M13F 和 M13R 做 PCR 扩增确认阳性克隆,产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统观察、拍照。

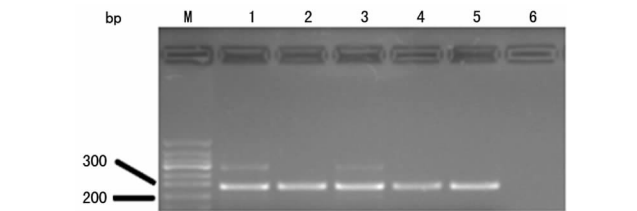
表 1 甲基化 PCR 反应体系

成分	试剂使用量(μL)
10×热启动缓冲液	5
10 mmol/L dNTP 混合物	1
25 mmol/L MgCl ₂	调节
5 U/μL 热启动酶	0.4
前引物(10 μmol/L)	1
后引物(10 μmol/L)	1
DNA 模板	调节
双蒸水	加适量双蒸水至总体积 50 μL

1.6 测序 选取阳性克隆斑中的菌体,37℃恒温震荡培养 12 h 后,取变浑浊的样本送武汉华大基因测序部进行测序。

2 结 果

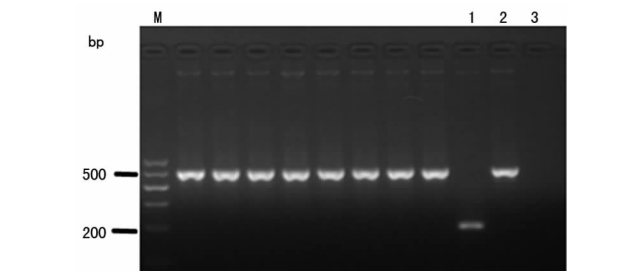
2.1 不同浓度 MgCl₂ 和模板扩展效果比较 如图 1 所示,反应体系中加入 5、10 μL 的 25 mmol/L MgCl₂ 和 25、50、100 ng 基因组 DNA 后,在约 365 bp 处均可见明亮的目的条带,其大小与预期结果一致,未见引物二聚体;但是 10 μL 25 mmol/L MgCl₂ 可观察到非特异性扩增。鉴于此,确定实验条件为 5 μL 的 25 mmol/L MgCl₂ 和 50 ng 基因组 DNA。



注:M 为 DNA 标记物;1 为 10 μL 25 mmol/L MgCl₂+100 ng 基因组 DNA;2 为 5 μL 25 mmol/L MgCl₂+100 ng 基因组 DNA;3 为 10 μL 25 mmol/L MgCl₂+50 ng 基因组 DNA;4 为 5 μL 25 mmol/L MgCl₂+50 ng 基因组 DNA;5 为 5 μL 25 mmol/L MgCl₂+25 ng 基因组 DNA;6 为空白对照。

图 1 甲基化 PCR 扩增产物电泳图

2.2 PCR 筛选阳性克隆 阳性重组子的 PCR 产物长度应为插入目的 DNA 和部分 T 载体序列之和,长度应为 564 bp,琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 500 和 600 bp 之间出现明亮而清晰的目的条带,见图 2。



注:M 为 DNA 标记物;1 为载体;2 为上皮钙黏蛋白 PCR 产物;3 为空白对照。

图 2 重组子 PCR 扩增产物电泳图

2.3 测序结果 测序结果与数据库大鼠上皮钙黏蛋白基因

CpG 岛 DNA 序列比对,目的片段无突变,26 个 CpG 位点的胞嘧啶均被亚硫酸氢盐修饰,最后显示为胸腺嘧啶,表明雄性 F344 大鼠肾脏基因启动子 CpG 岛所有 CpG 位点低甲基化。

3 讨 论

由于 DNA 甲基化与肿瘤发生发展密切相关,针对特定基因异常 DNA 甲基化位点的检测是目前肿瘤生物标志物研究的热点领域之一^[7-10]。待检的基因组 DNA 经亚硫酸氢盐转化后,未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而 5-甲基化胞嘧啶则保持不变^[11]。即绝大多数甲基化检测方法就是将修饰前后化学分子的细微变化转化为碱基改变并通过 PCR 扩增直观地显示出来。但过量的基因组 DNA 容易引起亚硫酸氢盐修饰不完全,从而导致部分未甲基化的胞嘧啶无法有效地转变为尿嘧啶而出现假阳性结果^[12]。经亚硫酸氢盐修饰后,DNA 链因碱基发生改变而不再互补,相当于以单链为模板扩增,同时 DNA 大量减少,不稳定性增加;且引物与模板易发生错配,而造成大量非特异性扩增,在此条件下 MgCl₂ 浓度过高使 PCR 反应特异性降低,导致非特异性扩增的出现。

传统的亚硫酸氢盐测序法未明确基因组 DNA 浓度及完整性,可导致后续 DNA 修饰不彻底和甲基化 PCR 非特异性扩增而造成实验失败^[2]。为解决这方面的难题,本研究改良了传统方法,调整基因组 DNA 浓度确保每次进行转化的基因组 DNA 为 50 ng,并以琼脂糖凝胶电泳确认基因组 DNA 完整性;在保证模板质量和数量的基础上,在 PCR 实验体系中适当调整 MgCl₂ 的浓度,既增加了扩增的敏感性,又有效地降低非特异性扩增。采用该方法反复进行了多次研究,均可获得理想的扩增产物。测序结果表明,亚硫酸氢盐转化完全,大鼠肾脏上皮钙黏蛋白基因启动子区 CpG 岛的 26 个 CpG 位点均为非甲基化,这与国外的报道一致^[4-6]。

所以,改进后的亚硫酸氢盐测序法,不仅能有效减少 PCR 反应中的非特异性扩增,而且降低假阳性结果出现的可能性,更适于检测特定基因位点 DNA 甲基化状态,尤其提高了传统的亚硫酸氢盐测序法对 CpG 岛胞嘧啶鸟嘌呤富集区甲基化状态检测的特异性和敏感性。

参考文献

[1] Frommer M, Mcdonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1992, 89(5):1827-1831.

[2] 孙贝娜. DNA 甲基化检测方法的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4):11-14.

[3] 任洪波, 刘海南, 刘承, 等. 肾癌尿沉渣中人端粒酶逆转录酶基因启动子区甲基化检测的临床意义[J]. 山东大学学报:医学版, 2015, 53(1):73-76.

[4] Kato A, Shimizu K, Shimoichi Y, et al. Aberrant DNA methylation of E-cadherin and p16 genes in rat lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine[J]. Mol Carcinogen, 2006, 45(2):106-111.

[5] Tsujiuchi T, Shimizu K, Itsuzaki Y, et al. CpG site hypermethylation of E-cadherin and Connexin26 genes in hepatocellular carcinomas induced by a choline-deficient L-Amino Acid-defined diet in rats[J]. Mol Carcinogen, 2007, 46(4):269-274.

[6] Blanco D, Vicent S, Elizegi E, et al. Altered(下转第 745 页)

白癜风通常与其他自身免疫性疾病并存,最为多见是自身免疫性甲状腺疾病^[8]。除了甲状腺疾病,其他自身免疫性疾病也与白癜风有关。阳性血清中自身抗体的存在,特别是高滴度的抗核抗体,对自身免疫性疾病的诊断是很重要的。本研究结果表明,仅有 13 例患儿抗核抗体阳性,但滴度较低。女性抗核抗体阳性率明显高于男性,这可能是因为女性在青春期由于雌激素的大幅波动,更易导致机体内抗核抗体滴度出现阳性^[9]。对 13 份标本进行 12 种特异性抗体检测发现,出现频率较高的抗体分别是 anti-SSA/Ro-60、anti-SSA/Ro-52 和 anti-dsDNA 抗体。研究表明,抗-Ro-52、抗-Ro-60 是自身免疫性疾病患者血清中检出频率较高的自身抗体,可出现于多种自身免疫性疾病患者血清中。近年国外有学者研究证实抗-Ro-52、抗-Ro-60 和 anti-dsDNA 抗体,可在系统性红斑狼疮临床诊断前多年即存在,其对系统性红斑狼疮的预测价值是其他自身抗体所不能替代的^[10]。将以上结果与对照组进行比较发现,病例组阳性率高于对照组,虽然差异无统计学意义,但本次研究针对抗核抗体滴度大于 1:40 患儿所检出的 3 项特异性抗体应高度重视,拟在后期的治疗过程中分别进行相关阳性患儿回访及相关检查,并对其进行了自身免疫性疾病防御知识的宣教及追踪档案的建立。

本研究结果显示,白癜风患者血清中的 IgG 和 IgA 水平明显高于对照组,但 IgM 水平与对照组差异无统计学意义($P>0.05$),C4 水平明显低于对照组,而 C3 水平与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。Ali 等^[11]发现在 30 例白癜风患者 IgG 和 IgA 水平下降远高于对照组人群,但 IgM 水平的变化是微不足道的。Venneker 等^[12]分析了 42 例进展期白癜风患者的补体水平,发现其中 7 例患者存在明显的 C4 降低,与对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。通过进一步对病例组患儿按照病程、型别、是否进展期及是否有家族史进行分组比较,发现不同型别、是否有家族史及处于进展期患儿出现不同程度 IgG 水平和 C4 水平紊乱的现象,但不同病程的患儿之间体液免疫各项指标差异无统计学意义($P>0.05$),原因有待进一步研究。

目前国内外许多学者虽然对白癜风进行了大量的研究,其覆盖面较为广泛,但对体液免疫与白癜风发病的关系的研究甚少,没有取得很大的进展。白癜风的免疫学因素仍是当前的研究热点,但是确切的发病机制还不是很清楚。本研究结果再次证明白癜风患儿的发病与体液免疫功能的异常状态密切相关,进一步支持了自身抗体与黑素细胞膜抗原结合后,通过补体溶解作用和抗体依赖性细胞毒性作用两条途径实现对黑素细胞的破坏的学说。同时结果表明散发型白癜风患者、进展期患儿和有家族史的患儿更容易出现体液免疫功能紊乱,容易引起疾病的发生发展。

参考文献

- [1] 周晖,唐旭华,陈木开,等. 白癜风并发甲状腺疾病 24 例临床分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(3): 297-298.
- [2] Lin X, Tang LY, Fu WW, et al. Childhood vitiligo in China: clinical profiles and immunological findings in 620 cases[J]. Am J Clin Dermatol, 2011, 12(4): 277-281.
- [3] Sandoval-Cruz M, García-Carrasco M, Sánchez-Porras R, et al. Immunopathogenesis of vitiligo [J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(12): 762-765.
- [4] Teulings HE, Willemsen KJ, Glykofridis I, et al. The antibody response against MART-1 differs in patients with melanoma-associated leucoderma and vitiligo [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2014, 27(6): 1086-1096.
- [5] 朱元文. 白癜风与黄褐斑[M]. 南京: 东南大学出版社, 2002: 262.
- [6] Yaghooi R, Omidian M, Bagherani N. Vitiligo: a review of the published work[J]. J Dermatol, 2011, 38(5): 419-431.
- [7] Harris JE, Harris TH, Weninger W, et al. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8⁺ T-cell accumulation in the skin[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(7): 1869-1876.
- [8] 任小丽, 陈晋广. 白癜风患者血清中甲状腺自身抗体水平变化的探讨[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2012, 28(11): 782.
- [9] 郭亚平, 王春光, 刘欣, 等. 健康体检人群不同性别抗核抗体随年龄分布规律探讨[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(3): 212-215.
- [10] Yoshimi R, Ueda A, Ozato K, et al. Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system[J]. Clin Dev Immunol, 2012: 606195.
- [11] Ali R, Ahsan MS, Azad MA, et al. Immunoglobulin levels of vitiligo patients[J]. Pak J Pharm Sci, 2010, 23(1): 97-102.
- [12] Venneker GT, Westerhof W, De Vries IJ, et al. Molecular heterogeneity of the fourth component of complement (C4) and its genes in vitiligo[J]. J Invest Dermatol, 1992, 99(6): 853-858.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-21)

(上接第 742 页)

- expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis [J]. Lab Invest, 2004, 84(8): 999-1012.
- [7] 张英杰. DNA 甲基化及其在癌症中的作用研究进展[J]. 航空航天医学杂志, 2014, 25(10): 1433-1434.
 - [8] 赵娜, 赵翠萍. DNA 甲基化的相关研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(8): 1359-1361.
 - [9] Brower V. Epigenetics: unravelling the cancer code[J]. Nature, 2011, 471(7339): 12-13.

- [10] 陈佳, 梁蓼荔, 倪培华. 肿瘤表观遗传学研究进展及临床应用[J]. 诊断学理论与实践, 2015, 14(2): 185-189.
- [11] 张莉君, 王先良, 孙晞, 等. 改进的亚硫酸氢钠测序法检测 HepG2 RASSF1A 基因 CpG 岛甲基化状态[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(3): 411-412.
- [12] 吴炯, 郭玮, 潘柏申. DNA 甲基化检测方法的进展[J]. 检验医学, 2010, 25(10): 822-825.

(收稿日期: 2015-09-17 修回日期: 2015-11-12)