

• 基础实验研究论著 •

ERG 甲基化位点检测技术在无创性产前诊断中的应用^{*}

陈熙¹,熊礼宽^{1△},曾婷¹,肖克林¹,黄艳萍¹,郭冀丹¹,麦光兴¹,郭辉²,任景慧²

(1. 宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518133; 2. 深圳市人民医院产前诊断中心, 广东深圳 518020)

摘要:目的 通过检测和分析游离胎儿 DNA 的 ERG 基因在不同孕期中浓度的变化,探讨利用 ERG 甲基化位点检测技术应用于无创性产前诊断的可行性。方法 随机选取健康妊娠妇女早孕组、中孕组、晚孕组各 30 例。采用 Hpa II、Msp I 分别对血浆中提取的游离 DNA 酶切后进行 SYBR PCR 反应,通过检测 ERG 基因甲基化位点,定量分析不同孕期的孕妇血浆中游离胎儿 DNA 浓度。结果 游离胎儿 DNA 的 ERG 基因在孕妇血浆中的浓度随着孕周的增长而升高。各孕周组的母血浆中 ERG 基因浓度(LG copies/mL)中位数分别为 5.38, 6.10 和 7.04($\chi^2 = 75.104, P < 0.01$)。结论 本研究证实了游离胎儿 DNA 的 ERG 基因序列上 CCGG 位点存在甲基化的特性。进一步确定了 ERG 基因作为胎儿 DNA 的标记物应用于无创性产前诊断的可行性。

关键词:游离胎儿 DNA; 产前诊断; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.003

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)19-2502-03

Detection of methylated ERG from maternal plasma for noninvasive prenatal testing^{*}

Chen Xi¹, Xiong Likuan^{1△}, Zeng Ting¹, Xiao Kelin¹, Huang Yanping¹, Guo Jidan¹, Mai Guangxing¹, Guo Hui², Ren Jinghui²

(1. Central Laboratory, Baoan Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China;

2. Department of Prenatal Diagnosis, the People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of the application of methylated ERG for noninvasive prenatal diagnosis, by detecting and analyzing ERG concentrations of cell-free fetal(cff) DNA in different gestation. **Methods** We randomly selected 90 healthy pregnant women, including 30 cases at each trimester of pregnancy. Using Hpa II, Msp I to digest cell-free maternal plasma DNA, we performed SYBR Green PCR to detect methylated sites of ERG sequences, and analyzed the concentrations of cff DNA in maternal plasma during different gestational trimesters. **Results** Cff DNA concentrations increased over gestational age. The median concentrations(LG copies/mL) in the three trimester groups were 5.38, 6.10 and 7.04 separately($\chi^2 = 75.104, P < 0.01$). **Conclusion** The study demonstrated the existence of methylated CCGG sites in ERG gene sequence of cff DNA. This fetal DNA biomarker may be useful for non-invasive prenatal testing.

Key words: free fetal DNA; prenatal diagnosis; polymerase chain reaction

利用孕妇外周血中游离胎儿核酸行无创性产前诊断的技术得到了越来越广泛的关注,当前采用新一代测序方法诊断非整倍体胎儿已经成功应用于临床,但该方法检测成本价高,检测仪器昂贵,操作较繁琐,检测周期长。利用表观遗传学方面的技术来检测游离胎儿 DNA 上的生物标志成为目前研究的另一热点,学者们发现母亲和胎儿 DNA 存在甲基化差异,可以将游离胎儿 DNA 从母血浆中母体 DNA 高背景的环境中区分开来^[1]。ERG 基因位于人类第 21 号染色体 21q22.3 区,是信号依赖转录调控因子 ETS 基因家族成员之一^[2],参与细胞的分化、增殖和凋亡。Old 等^[3]研究表明,ERG 基因在母体自身血细胞和绒毛组织中存在甲基化差异,可作为无创性产前诊断唐氏综合征的候选生物标记。用甲基化特异性 PCR 方法,不仅能检测父系来源的等位基因,也能检测母系来源的等位基因。因此,本研究通过甲基化敏感限制性内切酶(MSRE)酶切和 SYBR 荧光定量 PCR 方法检测 ERG 基因甲基化 CCGG 位点^[4],检测孕妇血浆中游离胎儿 DNA 浓度,探讨其在不同孕周期的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 正常组随机选取 2011 年 4 月到 2011 年 6 月来深圳市宝安区妇幼保健院门诊产检的身体健康,单胎妊娠、

无妊娠期高血压病、恶性肿瘤等疾病,年龄在 20~40 岁的孕妇,并对其追踪分娩结果均为染色体正常胎儿。其中早孕组 30 例,孕周为 10~13 周;中孕组 30 例,孕周为 18~26 周;晚孕组 30 例,孕周为 30~37 周。选取的所有孕妇签署知情同意书。另外选择无生育史健康女性 2 例,绒毛组织标本 2 例,分别作为对照标本。

1.2 研究方法

1.2.1 样本的制备 抽取孕妇外周血 5 mL,采用 EDTA 抗凝。所有收集的标本在 2 h 内处理,采用两步离心法。先以 4 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,小心吸取上清液于 EP 管中;再以 14 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,吸取上清液于 EP 管中,放置 -80 ℃ 冻存待用。抽取无生育史健康女性外周血 2 mL 作为阴性对照,采用 EDTA 抗凝,于 4 ℃ 保存待用。取新鲜绒毛组织作为阳性对照,用生理盐水浸泡,于 4 ℃ 保存待用。

1.2.2 绒毛组织、全血细胞和血浆游离 DNA 的提取 采用柱分离法提取 DNA。胎儿游离 DNA 从 1 mL 孕妇血浆中提取,阴性对照基因组 DNA 从无生育史健康女性 200 μL 外周血中提取,两者均使用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒(Qiagen 公司);阳对照基因组 DNA 从 25 mg 绒毛组织中提取,使用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(Qiagen 公司)。提取

* 基金项目:广东省科技厅社会发展基金资助项目(2011B031800384);深圳市科技计划项目(201103047);宝安区科技计划资助项目(20110617)。作者简介:陈熙,女,主治医师,主要从事产前筛查及诊断的研究。△ 通讯作者,E-mail:xionglk@sina.cn。

DNA 的流程严格按照说明书操作,最后将每份血浆 DNA 溶解于 50 μL 的 AE 洗脱液中,全血细胞 DNA 和绒毛组织 DNA 分别溶解于 200 μL 的 AE 洗脱液中,-20 ℃冻存。

1.2.3 限制性内切酶消化 采用 MSRE Hpa II 和其同工酶 Msp I (NEB 公司) 分别对绒毛组织、全血细胞和血浆游离 DNA 进行消化。酶切体系:取血浆游离 DNA 10 μL、绒毛组织 DNA 2 μL、全血细胞 DNA 2 μL 分别与内切酶 1 μL, 10 × NE 缓冲液 2 μL 混匀, 加 ddH₂O 补足至 20 μL 反应体系。于恒温水箱中 37 ℃ 酶切 3 h。

1.2.4 引物设计及合成 根据 ERG 基因上包含甲基化 CCGG 位点的序列片段设计 PCR 扩增引物:上游引物 5'-ACC TTT GCA TGT GAG AGG CAT T-3';下游引物 5'-TTT TGT CGA GCC AGG CTT-3',扩增产物片段长度为 124 bp。引物序列由宝生物工程公司合成。

1.2.5 标准品制备 根据设计引物的扩增片段序列将 ERG 基因克隆于 pMD-18T 载体中,构建重组质粒。测序结果表明插入的基因片段与已知的 ERG 基因扩增片段序列完全一致(宝生物工程公司)。取重组质粒标准品依次做 10 倍梯度稀释,选取其中 10⁴~10⁸ 5 个稀释度的质粒作为绘制标准曲线的模板。

1.2.6 SYBR PCR 反应 SYBR PCR 反应在 MJ Opticon 2TM 荧光定量 PCR 仪进行。扩增反应体系总体积为 25 μL,其中 SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μL,上下游引物各 1 μL(10 pmol/μL),酶切后 DNA 模板 5 μL,ddH₂O 5.5 μL。反应液在冰上配置。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;然后以 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s 进行 40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s;随后缓慢升温,从 60 ℃ 到 95 ℃ 每上升 0.5 ℃ 检测一次荧光值,连续监测荧光信号的变化情况,最后生成 PCR 产物融解曲线。取 SYBR PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。多组比较采用 Kruskal-Wallis 检验,两组间比较采用 Mann-Whitney 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鉴定 ERG 基因的甲基化位点 MSRE Hpa II 可以将 CCGG 序列中第 1 个 C 和第 2 个 C 之间切开,当第 2 个 C 发生甲基化时,Hpa II 受 CG 甲基化的影响,不能将此序列切开。而 Msp I 为 Hpa II 的同工酶,不受 CG 甲基化的影响,即无论 CCGG 是否有甲基化位点,Msp I 都能将序列中第 1 个 C 和第 2 个 C 之间切开。因此当同一份标本的 DNA 在 Hpa II 酶切后进行 PCR 可以扩增出目的片段,而在 Msp I 酶切后进行 PCR 无法扩增出目的片段,则认为该份标本的 DNA 目的基因片段包含了发生甲基化 C 的 CCGG 序列。作者用琼脂糖凝胶电泳方法检测 SYBR PCR 产物,扩增片段如图 1 所示。

酶切前,孕妇血浆游离 DNA 和对照组绒毛组织 DNA、未怀孕女性全血细胞 DNA 的 PCR 产物均出现与预期扩增片段(124 bp)相符的条带;Msp I 酶切后,上述三者均未见目的基因扩增条带;Hpa II 酶切后,未怀孕女性全血细胞 DNA 的 PCR 产物未见目的基因扩增条带,但孕妇血浆游离 DNA 和绒毛组织 DNA 出现与预期扩增片段相符的条带。鉴定结果表明未怀孕女性全血细胞 DNA 中 ERG 基因该片段序列未发生甲基化,孕妇血浆游离 DNA 与绒毛组织 DNA 在 ERG 基因序列上发生了甲基化。该甲基化游离 DNA 即为与绒毛组织 DNA 同源的胎儿 DNA,而孕妇血浆中含量极少的母体自身游

离 DNA 因未甲基化已被 Hpa II 切段。



M: DL500; 2,5,8 分别为酶切前的孕妇血浆游离 DNA、绒毛组织 DNA、未怀孕女性全血细胞 DNA 的扩增片段;3,6,9 分别为 Hpa II 酶切后孕妇血浆游离 DNA、绒毛组织 DNA、未怀孕女性全血细胞 DNA 的扩增;4,7,10 分别为 Msp I 酶切后孕妇血浆游离 DNA、绒毛组织 DNA、未怀孕女性全血细胞 DNA 的扩增。

图 1 Hpa II、Msp I 酶切前后孕妇血浆游离 DNA 和对照组绒毛组织 DNA、未怀孕女性全血细胞 DNA 的 ERG 基因片段扩增

2.3 定量分析孕妇血浆中游离胎儿 DNA 早孕、中孕和晚孕组的孕妇血浆中 ERG 基因浓度(LG copies/mL)中位数分别为 5.38, 6.10 和 7.04, 见表 1。三组比较差异有统计学意义($\chi^2=75.104, P<0.01$),早孕组和中孕组、晚孕组比较,差异有统计学意义(Z 分别为 -5.937 和 -6.655, P<0.01),中孕组和晚孕组比较,差异有统计学意义(Z = -6.655, P<0.01)。

表 1 Hpa II 酶切后各组孕妇血浆游离胎儿 DNA 浓度(LG copies/mL)

组别	n	孕周	中位数	下四分位数	上四分位数	最小值	最大值
早孕组	30	10~13	5.38	5.24	5.60	4.94	6.17
中孕组	30	18~26	6.10	5.88	6.18	5.57	6.35
晚孕组	30	30~37	7.04	6.96	7.09	6.75	7.38

3 讨 论

产前诊断是降低出生缺陷的重要手段,传统的产前诊断方法如绒毛取样和羊膜腔、脐静脉穿刺等具有创伤性,对胎儿和孕妇都有一定的危险性。而母血浆中相对丰富的游离胎儿 DNA 促进了无创性产前诊断的临床应用。以往多数学者以 Y 染色体上性别决定因子如 SRY (sexdetermine region of Y chromosome) 等基因序列为标记进行胎儿 DNA 的检测^[5],该方法虽然特异性高,但仅限于对男性胎儿 DNA 的检测,因此,受胎儿性别限制程度大。也有学者通过分析胎儿来源于父方与母方不同的核苷酸序列的遗传多态性来鉴别胎儿 DNA^[6],但需要有多重遗传标志来保证母体和胎儿 DNA 的区别,实验复杂程度高,难以应用于临床。

表观遗传学进展拓宽了通过母体血浆中存在的胎儿 DNA 诊断疾病的领域,DNA 甲基化作为一种潜在的检测胎儿表观遗传学标记物,越来越受到重视。国外研究发现,位于 18 号染色体上的 Maspin 基因在胎盘细胞中处于低甲基化^[7],在母亲自身细胞中处于高甲基化,母血浆中低甲基化的 MspI 序列中存在胎儿 SNPs 基因型。在 3 号染色体上发现,在胎盘细胞中处于高甲基化而在母血细胞中处于低甲基化的 RASSF1A 基因^[8~9];在 21 号染色体上发现的差异甲基化序列有:AIRE、SIM2 和 HLCS 基因^[10~11]。作者对文献报道的几个候选基因分别做理论和实验研究,选择出甲基化状态差异性较为理想的检测基因 ERG。由于该基因序列位于 21 号染色体,因此,对于今后应用于唐氏综合征的无创性产前诊断具有重要

的意义。

本研究利用 MSRE Hpa II 对甲基化位点不能切割的特性,将所提取的 DNA 做 MSRE Hpa II 酶切处理后,再进行 SYBR PCR 检测,分析孕妇外周血中游离胎儿 DNA 浓度在不同组之间的差异,分别对早孕组、中孕组和晚孕组进行组间比较。结果发现早孕、中孕和晚孕各组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),孕妇外周血中游离胎儿 DNA 浓度随孕周的增加而增加,与之前文献报道的相符^[12]。这一结果非常有助于无创性产前诊断唐氏综合征的研究^[13]。

本研究进一步确定了甲基化 ERG 基因作为胎儿 DNA 的标记物应用于无创性产前诊断唐氏综合症的可行性。后续研究中作者希望通过焦磷酸测序或质谱分析等技术方法来获得游离胎儿 DNA 上更多的甲基化位点信息,最终能够利用孕妇外周血中的游离胎儿 DNA 建立早期、快速、准确、无创伤性的产前诊断方法。

参考文献

- [1] 陈熙,熊礼宽.无创性产前诊断研究进展及甲基化技术的应用[J].国际检验医学杂志,2012,33(4):427-430.
- [2] Kruse EA,Loughran SJ,Baldwin TM,et al. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage[J]. PNAS,2009,106(33):13814-13819.
- [3] Old RW,Crea F,Puszyk W,et al. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome[J]. Reprod Biomed Online,2007,15(2):227-235.
- [4] Zejskova L,Jancuskova T,Kotlabova K,et al. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma—next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics[J]. Exp Mol Pathol,2010,89(3):241-247.
- [5] Miura K,Higashijima A,Shimada T,et al. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant car-
- riers of X-linked genetic disorders[J]. J Hum Genet,2011,56(4):296-299.
- [6] Vodicka R,Vrtel R,Dusek L,et al. Refined fluorescent STR quantification of cell-free fetal DNA during pregnancy in physiological and Down syndrome fetuses[J]. Prenat Diagn,2008,28(5):425-433.
- [7] Tong YK,Ding C,Chiu RW,et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ration analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations[J]. Clin Chem,2006,2(3):2194-2202.
- [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(2):2211-2218.
- [9] Bellido ML,Radpour R,Lapaire O,et al. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma[J]. Biol Reprod,2010,82(4):745-750.
- [10] Tong YK,Jin S,Chiu RW,et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromo some-dosage approach [J]. Clin Chem,2010,56(1):90-98.
- [11] Tong YK,Chiu RW,Akolekar R,et al. Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker[J]. PLoS One,2010,5(12):e15244.
- [12] Lo Y,Tein MS,Lau TK,et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet,1998,62(4):768-775.
- [13] Lee T,LeShane ES,Messerlian GM,et al. Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum[J]. Am J Obstet Gynecol,2002,187(5):1217-1221.

(收稿日期:2013-06-15)

(上接第 2501 页)

- obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2007,292(1):E92-E100.
- [5] Nistala R,Stump CS. Skeletal muscle insulin resistance is fundamental to the cardiometabolic syndrome[J]. J Cardiometab Syndr,2006,1(1):47-52.
- [6] Kurtz TW,Pravene M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists:beyond the renin-angiotensin system[J]. J Hypertens,2004,22(12):2253-2261.
- [7] Pessin JE,Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action:molecular targets of insulin resistance[J]. J Clin Invest,2000,106(2):165-169.
- [8] 高春林,赵亚萍,陈小慧,等.不同浓度葡萄糖和游离脂肪酸对大鼠骨骼肌细胞株 L6 细胞胰岛素敏感性和细胞内活性氧的影响[J].中国糖尿病杂志,2011,19(3):221-224.
- [9] Jones A,Woods DR. Skeletal muscle RAS and exercise performance[J]. Int J Biochem Cell Biol,2003,35(6):855-866.
- [10] Lowell BB,Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes[J]. Science,2005,307(5708):384-387.

- [11] Kelley DE,He J,Menshikova EV,et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes[J]. Diabetes,2002,51(10):2944-2950.
- [12] Anello M,Lupi R,Spampinato D,et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients[J]. Diabetologia,2005,48(2):282-289.
- [13] Chen KH,Guo X,Ma D,et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nat Cell Biol,2004,6(9):872-883.
- [14] Debard C,Laville M,Berbe V,et al. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients[J]. Diabetologia,2004,47(5):917-925.
- [15] Lastra G,Habibi J,Whaley-Connell AT,et al. Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression[J]. Endocrinology,2009,150(6):2561-2568.

(收稿日期:2013-02-05)