

• 检验技术与方法 •

IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化检测方法的探讨*

陈玲¹, 严世荣^{2△}, 张吉才¹, 陈炜¹, 陈永梅¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院检验科, 湖北十堰 442000; 2. 湖北医药学院基础医学院生化教研室, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨人和小鼠的 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区 DNA 甲基化检测的方法。方法 用亚硫酸氢钠处理人外周血白细胞基因组 DNA 及小鼠骨骼肌组织中 DNA 标本, 以修饰后的 DNA 为模板, 对人和小鼠两个不同基因分别设计合适的引物对启动子区进行 Touch-Down PCR 扩增, PCR 产物进行克隆测序。结果 在利用合适的引物对修饰后 DNA 模板进行扩增时均能扩增出目的片段, 克隆测序结果显示 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化的胞嘧啶碱基 C 不变, 而非甲基化的胞嘧啶碱基 C 转变为胸腺嘧啶碱基 T。结论 成功的建立了人和小鼠 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化的检测方法, 为进一步探讨这两种基因启动子区甲基化与相关疾病的关系奠定基础。

关键词:胰岛素样生长因子-1; 蛋白激酶 C; 甲基化; 聚合酶链反应**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.040**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)21-2876-03

启动子 CpG 岛高甲基化是抑癌基因失活的重要机制之一, 对于肿瘤的早期诊断、分子分型、预后判断等均具有较大的价值^[1-2]。目前较常用的 DNA 甲基化检测技术是亚硫酸氢盐修饰法, 该技术使用强碱对 DNA 进行处理, 导致绝大多数 DNA 分子发生断链, 同时由于 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后会将胞嘧啶全部转化成尿嘧啶而造成碱基分布不平衡, 大大增加了引物设计及 PCR 扩增的难度。因此, 在寻找相关疾病易感基因有意义的甲基化位点时如何设计合适的引物, 采用合理得方案扩增出目的片段成为科研工作者前期挑战之一。本实验以胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin like growth factor 1 receptor, IGF-1R)、蛋白激酶 C ξ 亚型 (Protein kinase C/z, PRKCZ) 为目的基因, 成功地建立了人和小鼠 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化的检测方法, 为后续科研工作者探讨这 2 个基因的甲基化改变在相关疾病发病机制中的作用提供了可靠的方法学保障。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 主要试剂: 血液组织细胞基因组提取试剂盒 (北京天根生化科技公司)、引物 (上海生工生物公司)、2 $\times$ Taq platinum PCR Master Mix (北京天根生化科技公司)、对苯二酚 (Sigma 公司)、亚硫酸氢钠 (Sigma 公司); 主要仪器: Biometra PCR 仪 (Biometra 公司)、DNA 琼脂糖凝胶电泳仪 (北京东方仪器厂)、凝胶成像分析仪 (美国 BIO-RAD 公司)、紫外分光光度计 (重庆光学仪器厂) 等。

1.2 标本 选择十堰市太和医院体检中心正常人群, 标本为外周血白细胞 DNA; 健康的 C57BL 小鼠 (购买于南京大学模式动物研究所) 标本为骨骼肌组织 DNA。

1.3 方法

1.3.1 人外周血白细胞 DNA 和小鼠骨骼肌组织 DNA 的提取 使用全基因组 DNA 提取试剂盒按照说明书步骤进行 DNA 提取, 然后用紫外分光光度计检测 DNA 质量, 并于 260 nm 处测吸光度值进行定量, 同时通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。选取纯度高, 完整性好的 DNA 样品, 为后续实验操作提供良好的 DNA 模板。

1.3.2 亚硫酸氢盐修饰并纯化 (1) 将 2 μ g 的 DNA 置于

1.5 mL EP 管中使用双蒸水稀释至 50 μ L, 加入 5.5 μ L 新鲜配制的 3 mol/L NaOH, 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。(2) 加入 30 mL 10 mmol/L 对苯二酚 (氢醌) 至上述水浴后的混合液中, 轻轻混匀溶液变成淡黄色后, 加 520 μ L 3.6 mol/L 亚硫酸氢钠至上述水浴后溶液中 (溶液 pH 值用 NaOH 准确滴定至 pH 值 5.0, 此步中 pH 值是否准确至 5.0 关系到甲基化修饰是否完全)。EP 管外裹铝箔纸, 避光, 轻柔颠倒混匀溶液。(3) 置于国产水浴锅 53 $^{\circ}$ C 避光水浴 10~16 h。修饰后 DNA 的纯化回收, 使用 Promega Wizard Cleanup DNA 纯化回收试剂盒 (Promega, A7280), 并自备注射器; 具体步骤按照说明书要求进行。(4) 去硫酸化和沉淀 DNA。将纯化好的样本加入 5.5 μ L 新鲜配制的 3 mol/L NaOH, 室温放置 15 min。(5) 加 33 μ L 10 mol/L 乙酸铵, 以中和 NaOH 溶液, 使溶液最终 pH 值在 7.0 左右; 加 4 μ L 10 mg/mL 糖原, 加 270 μ L 事先预冷的冰无水乙醇, 置于 -20 $^{\circ}$ C, 过夜沉淀。(6) 次日, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 30 min, 倒去上清液, 收集沉淀, 加 500 μ L 70% 乙醇, 轻柔倾斜 EP 管, 旋转一圈, 再次离心, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min 后倒掉上清液, 再加同量乙醇, 再次洗涤。(7) 弃上清液, 并常温短暂离心后, 将, 室温干燥 10 min, 加入 15~30 μ L 双蒸水溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区 CpG 岛的确定及引物设计 利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 UCSC 数据库 (<http://www.Genome.ucsc.edu/>) 分别查找人和小鼠 IGF1R、PRKCZ 的基因启动子序列。引物设计使用 MethPrimer 在线分析软件 (<http://www.urogene.org/methprimer/index.html>), 该软件主要针对基因的 CpG 岛进行引物设计, 并结合 Primer 5.0 进行优化。优化事项: (1) 尽量避免 CG 位点; (2) 对于含有 CG 位点的碱基序列用兼并碱基代替, 下面列出的序列中 Y(C、T)、R(A、G) 均为兼并碱基; (3) 为提高引物的 Tm 值, 在保证普通引物设计原则正确的前提下, 适当延长引物长度。各组引物序列见表 1。本实验均采用相同降落 PCR 反应体系及循环条件, 50 μ L 体系的配制: 模板 3 μ L 引物, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, dNTPmixture 1 μ L; Taq Buffer (μ L) 10 $\times$ PCR Buffer (加 Mg²⁺): 100 mmol/L Tris-

* 基金项目: 湖北省教育厅重点项目 (D20122408)。△ 通讯作者, E-mail: graceyan@163.com。

HCl(pH 8.8, 25 ℃), 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.8%(v/v)Nonidet P40, 5 μL, *Taq* 酶 5 U/μL, 0.8 μL, 无菌的双蒸水 38.2 μL。循环参数: 95 ℃预变性 4 min, 95 ℃变性 45 s, 65 ℃退火(−1 ℃/1 c) 45 s(即每 1 个循环后退火温度降低 1 ℃), 72 ℃延伸 1 min, 经 20 个循环后改为 95 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 20 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。

表 1 IGF-1R、PRKCZ 引物序列和扩增片段长度

引物名称	引物序列(5'-3')	目的片段
人 IGF1R-F	TTYGGGTTTGAAAAATGGAG	216 bp
人 IGF1R-R	CAAACCAATCTTCRCTCCC	
小鼠 IGF1R-F	YGTGTGTGTGTGTTTTTAATGAAGT	407 bp
小鼠 IGF1R-R	CACACTCCAAACRACCTACAACC	
人 PRKCZ-F	TTTTTGTTTAGGTTGGAGTGTAGTG	206 bp
人 PRKCZ-R	CCACTTAAAAATCAAAAATTTAAACCC	
小鼠 PRKCZ-F	GTAATTGAAGATGATTAGGTGGTTG	458 bp
小鼠 PRKCZ-R	CCCCRTACTTCTAAATCTACTAAATC	

1.3.4 克隆后测序 把回收的 PCR 产物与 PGM-T 载体相连具体步骤见北京天根 PGM-T 克隆试剂盒说明书。挑取氨苄阳性的固体培养基上单克隆菌落通过菌落 PCR 快速检测,对确定为阳性克隆的单克隆菌落,接种于 LB 液体培养基内进行摇菌,按质粒 DNA 提取试剂盒说明书提取质粒 DNA 后送上海英俊生物工程公司测序。

2 结 果

2.1 甲基化处理后 PCR 结果 以亚硫酸氢钠和对苯二酚修饰后的基因组 DNA 为模板,对人和小鼠 IGF-1R、PRKCZ 启动子区部分序列进行降落 PCR 扩增,PCR 产物经 2% 琼脂糖初步鉴定为目的条带,人和小鼠的 IGF-1R 目的片段长度分别为 216 bp、407 bp,人和小鼠的 PRKCZ 目的片段长度分别为 206 bp 和 458 bp,见图 1~4。



图 1 亚硫酸氢钠处理后人 IGF-1R 基因启动子区的 PCR 产物

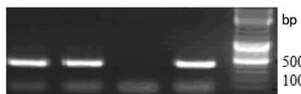


图 2 亚硫酸氢钠处理后小鼠 IGF-1R 启动子区的 PCR 产物

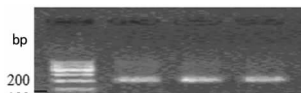


图 3 亚硫酸氢钠处理后人 PRKCZ 基因启动子区的 PCR 产物

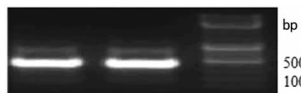


图 4 亚硫酸氢钠处理后小鼠 PRKCZ 基因启动子区的 PCR 产物

2.2 测序结果

PRKCZ 基因启动子区甲基化的胞嘧啶碱基 C 保持不变,而非甲基化的胞嘧啶碱基 C 转变为胸腺嘧啶碱基 T。以人的 IGF-1R 基因测序结果为例见图 5。

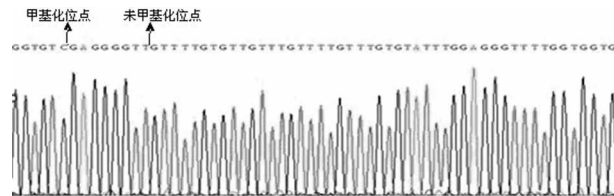


图 5 人的 IGF-1R 基因扩增后测序结果

3 讨 论

DNA 甲基化是一种重要的表现遗传学标记,异常的 DNA 甲基化与许多疾病的发生密切相关尤其是癌症。Levenson^[3]曾提到运用循环 DNA 分析 DNA 甲基化可以促进肿瘤相关生物标志物在肿瘤中检测、诊断、治疗的预期效果及预后的发展。随着人们对甲基化在疾病发生中作用的重视,检测基因是否发生甲基化的方法也在不断的丰富与完善,目前主要有甲基化敏感的限制性内切酶法、限制性分析、单核苷酸引物延伸、单链构象分析法、高液相色谱法^[4]与基因芯片结合的快速高通量分析法^[5],在众多的甲基化检测方法中亚硫酸氢钠修饰后测序(bisulfite-modified sequencing-PCR, BSP)是一种可以覆盖多位点甲基化分析的全面而准确的方法,在寻找 DNA 序列有意义基因甲基化位点时具有其它方法无法比拟的优点。该方法原理简单的来说根据核酸序列 CpG 位点中 C-T 转化情况来判断被检测的样本中甲基化状态,并与未经亚硫酸氢钠处理的原始序列进行比对,如果没有发生 C-T 的转变,则表明该 CpG 位点发生了甲基化,反之则说明未发生甲基化。

由于 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后将胞嘧啶全部转化成尿嘧啶而造成碱基分布不平衡,增加了引物设计及 PCR 扩增的难度,如何合理的设计引物及选择合适的 PCR 扩增方法是本实验中的关键,尽管有专门针对 BSP 法及 MSP 法设计甲基化引物的软件如 Methprimer 免费在线软件,但是不能机械的依靠,必要时需结合 Premier5.0 进行合理优化。遵循 BSP 法甲基化引物设计原则^[6]:(1)为了区别甲基化 DNA 和非甲基化 DNA,引物不应含有 CpG 位点;(2)引物扩增的产物应包含尽可能多的 CG 位点。在引物设计时用兼并碱基代替 CG 位点上的个别碱基便于快速找到合适的引物进行扩增。本试验在进行普通 PCR 扩增时由于退火温度不确定较难快速获得扩增产物,经过不断地探索,笔者最终探讨出采用降落 PCR 这一最佳方案,也就是说在 PCR 扩增时采用的退火温度是 65℃ 到 45℃ 这样一个梯度范围,每个循环降低 1℃ 最后以 45℃ 为退火温度继续扩增 20 个循环,较容易地扩增出目的片段而且抑制了非特异性扩增。同时本研究还发现对于退火温度相差不大的几个不同基因同时扩增,大大减少了 PCR 扩增的次数和时间,借助于降落 PCR 方法对 DNA 甲基化亚硫酸氢钠测序法进行改进,极大地提高了甲基化位点检测效率。

试验中笔者研究的目的是基因是 IGF-1R 和 PRKCZ, 其中 IGF-1R 是 IGF 信号系统的重要组成部分, 属于酪氨酸激酶受体, 主要与配体 IGF-1 结合, 两者结合后能通过改变肿瘤细胞周期、细胞凋亡以及与周围环境的相互作用, 在恶性肿瘤的持续生长中起着重要作用^[7-8]。

由于 IGF-1R 的信号转导可以引起细胞的恶性化及细胞粘附性的改变^[9], IGF-1R 被认为是治疗肿瘤的有效靶点。IGF-1R 表达持续增高是乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、肺癌发生的

危险因子^[10]。PRKCZ 基因在对细胞的生长、发育、蛋白质的表达具有重要的调节作用;其中在 Fas/FasL 凋亡途径中, PRKCZ 通过与死亡诱导信号复合物作用(death-inducing signaling complex, DISC),对 FasL 引起的细胞凋亡起到了逆向的调节作用^[11]。PRKCZ 在活化的细胞中定位于胞膜,能够诱导肌动蛋白的聚合、细胞结构的形成及转化和骨架的重排,参与细胞极化、细胞黏附作用、细胞分化、细胞趋化和肿瘤转移。例如在胰腺癌发生转移时 PRKCZ 能够很好的控制细胞的分化方向^[12]。尽管 IGF-1R 和 PRKCZ 基因与许多疾病的发生密切相关,但是目前关于它们的研究多局限在基因多态性上,要想彻底弄清楚这两个基因在疾病发病机制中的作用,不仅要明确经典的遗传学分子机制,也同样需要明确表观遗传致病的分子机制,甲基化是表观遗传学重要的内容之一,但这两个基因在疾病中甲基化状态的研究国内尚未报道。试验中对 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化的研究方法进行了一定程度的探索,明确了 IGF-1R、PRKCZ 基因的某些区域发生了甲基化现象,下一步本课题组将利用此方法,继续探讨这两个基因启动子区甲基化与某一类疾病发生的相关性奠定基础。

参考文献

[1] Dehan P, Kustermans G, Guenin S, et al. DNA methylation and Cancer diagnosis: new methods and applications[J]. Expert Rev Mol Diagn. 2009, 9(7): 651-657.

[2] McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications[J]. Clin Cancer Res. 2009, 15(12): 3927-3937.

[3] Levenson VV. DNA methylation as a Universal biomarker[J]. Expert Rev Mol Diagn. 2010, 10(4): 481-488.

• 检验技术与方法 •

[4] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques[J]. Biogerontology. 2003, 4(4): 233-235.

[5] Lan X, Bonneville R, Apostolos J, et al. W-ChIPeaks: a comprehensive web application tool for processing ChIP-chip and ChIP-seq data[J]. Bioinformatics. 2011, 27(3): 428-430.

[6] Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease[J]. J Pathol. 2001, 195(1): 97-110.

[7] Lorch JH, Posner MR, Wirth LJ, et al. Seeking alternative biological therapies: the future of targeted molecular treatment[J]. Oral Oncol. 2009, 45(4/5): 447-453.

[8] Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine Kinase and targeted Cancer therapeutics[J]. Bio Pharm Bull. 2011, 34(12): 1774-1780.

[9] Molinari F, Martin V, Saletti P, et al. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal Cancer and related metastatic sites May be clinically relevant[J]. Br J Cancer. 2009, 100(7): 1087-1094.

[10] Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia[J]. Nat Rev Cancer. 2004, 4(7): 505-518.

[11] Leroy I, de Thonel A, Laurent G, et al. Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis[J]. Cell Signal. 2005, 17(9): 1149-1157.

[12] Della Peruta M, Giagulli C, Laudanna C, et al. RHOA and PRKCZ control different aspects of cell motility in pancreatic cancer metastatic clones[J]. Mol Cancer. 2010, 9: 61.

(收稿日期: 2013-05-24)

水浴消解-碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法测定全血中重金属元素^{*}

刘裕婷, 张志荣, 于秋红, 赵建忠[△], 李 洁, 张 玲, 张来颖
(北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071)

摘 要:目的 建立水浴消解-八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱仪(ORS-ICP/MS)测定全血中 Cr、Ni、As、Se、Cd、Hg、TL、Pb 8 种金属元素含量的方法。方法 血液样本中加入硝酸,经水浴消解后,制备成测试液;采用八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法同时测定 8 种金属元素含量,应用标准曲线法和内标校正定量。结果 8 种金属元素在测定范围内线性良好,相关系数均大于 0.999;灵敏度高,各元素的方法检出限为 0.01~0.30 μg/L;重现性好,相对标准偏差小于 10%;准确度高,加标回收率为 90%~110%,对标准物质小牛血清成分进行分析测定,分析结果与标准值吻合。结论 水浴消解-八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法测定全血中重金属元素简便、快速,样品用量少,为人血浆中金属元素正常值范围的确定提供了参考依据。

关键词:质谱分析法; 全血; 金属元素; 水浴消解; 八极杆碰撞反应池

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)21-2878-03

生物样品的前处理方法目前文献报道较多的有直接稀释法^[1-6]、干灰化法^[7]、湿法消解^[8]、微波消解^[9]等。直接稀释法虽然简单,但是稀释后某些元素的检出能力变差,样品与标准溶液的黏度差异可能成为影响方法准确度的因素。应该指出,由于血液和尿液中碳及 NaCl 浓度较高,由此产生⁴⁰Ar¹²C、³⁵Cl¹⁶O、³⁵Cl¹⁶O¹H、⁴⁰Ar³⁵Cl 等多原子离子干扰,直接稀释法不宜测定 V、Cr、As 等元素^[10]。干灰化法可使 Cd、Pb、Sn、Zn 等元素部分损失,As、Hg、Se 等全部损失^[10]。湿法消解操作繁

琐,需要大量的酸,对环境和人体都造成影响,且对易挥发元素的测定不适用。而微波消解所需仪器成本高,对于批量样品的测定不适用。本文采用水浴消解的前处理方法,利用八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱技术,建立测定全血中多种重金属元素的分析方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 7500 系列电感耦合等离子体质谱仪(ICP/

^{*} 基金项目:卫生部行业科研专项项目(201002001)。 [△] 通讯作者, E-mail: zhaojzh@126.com。