

甲基化特异性 PCR 的评价与优化*

付祥胜¹, 张亚丽², 李 丽¹, 肖岚月¹, 邱 野¹, 周 贤¹, 张 巍¹ (1. 四川省泸州医学院附属医院
消化内科 646000; 2. 南方医科大学南方医院消化疾病研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 探讨甲基化特异性 PCR(MSP)在 DNA 甲基化检测中的应用价值。**方法** 以 *SHH* 基因启动子区全甲基化克隆和全非甲基化克隆(质粒)为模板, 评价 MSP 的敏感性和特异性。**结果** MSP 能检测出样本中低含量的甲基化 DNA 模板, 提高 MSP 退火温度能克服假阳性或假阴性结果的产生。**结论** MSP 检测甲基化具有高灵敏度的优点, 适当提高退火温度能保证 MSP 结果的特异性。
【关键词】 甲基化特异性 PCR; 甲基化检测; 敏感性; 特异性
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)15-1862-02

The evaluation and optimization of methylation-specific polymerase chain reaction* FU Xiang-sheng¹, ZHANG Ya-li², LI Li¹, XIAO Lan-yue¹, QIU Ye¹, ZHOU Xian¹, ZHANG Wei¹ (1. Department of Digestive, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Sichuan 646000, China; 2. Institute for Digestive Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】 Objective To preliminarily assess the value of methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) for DNA methylation measurement. **Methods** Plasmids derived from hypermethylated clone and unmethylated clone for *SHH* gene promoter were served as template to assess the sensitivity and specificity of MSP. **Results** MSP could detect low content of methylated DNA template. False positivity and false negativity could be overcome by elevating annealing temperature of MSP. **Conclusion** MSP has the advantage of high sensitivity for methylated sequences. The specificity of MSP can be warranted by properly elevating annealing temperature.
【Key words】 methylation-specific polymerase chain reaction; methylation measurement; sensitivity; specificity

DNA 甲基化在维持细胞功能中有重要作用, 甲基化模式的改变在人类疾病中有广泛的病理意义^[1]。因此, 可靠地检测各种来源 DNA 甲基化状态的分析技术显得非常重要, 且有着广泛的应用前景^[2-3]。目前, 应用较为广泛的甲基化检测方法多为基于亚硫酸氢盐修饰的方法。甲基化特异性 PCR(Methylation specific PCR, MSP)是近年来 DNA 甲基化研究中最常用的分析技术之一, 具有设计简单、操作简便、费用低廉的优点, 但其应用中也存在一些问题, 目前国内尚缺乏对这种方法的系统评价, 本研究以 *SHH* 基因启动子为目的基因, 对 MSP 法进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 DNA 的亚硫酸氢盐修饰 采用基因组 DNA 提取试剂盒, 提取大肠癌细胞株 SW480 基因组 DNA, 取 2 μg DNA 进行亚硫酸氢盐修饰后测序 (Bisulfite sequencing, BSP), 采用 Methyl Detector 甲基化修饰试剂盒, 按试剂盒说明书操作。修饰后 DNA 采用半巢式 PCR 扩增 *SHH* 启动子区, 见表 1 和图 1。
1.2 克隆测序 采用 pGM-T 克隆试剂盒, 将 PCR 产物连接到 pGM-T 载体, 并随机挑取 10 个克隆进行测序, 测序分析采用 ABI 3730 DNA 测序仪 (Applied Biosystems 公司), 用下游引物测序, 结果分析使用 BiQ Analyzer 软件^[4]。
1.3 MSP 从测序结果中挑选出 *SHH* 基因启动子区全甲基化克隆和全非甲基化克隆, 提取质粒后, 紫外分光光度计测其

浓度, 稀释成终浓度为 0.5 ng/μL, 并按甲基化克隆/非甲基化克隆不同比例混合: 1:99; 10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 80:20; 90:10; 99:1。并以此含不同比例甲基化序列的质粒混合物作为模板, 检测 MSP 方法对甲基化检出的敏感性(表 1)。另外, 用 *SHH* 启动子全甲基化克隆和全非甲基化克隆(质粒)作为模板, 评价不同退火温度对 MSP 结果的影响。

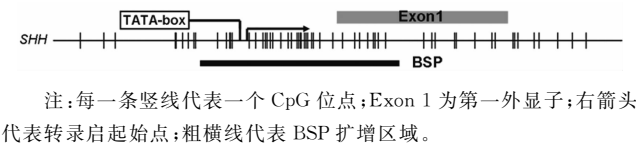


图 1 *SHH* 启动子区示意图

2 结 果

2.1 BSP 法分析每一个克隆的甲基化状况 每一个克隆均能成功测序, 并能精确分析每一个 CpG 位点的甲基化状况, 见图 2。
2.2 MSP 检测甲基化优点 用 MSP 法检测含不同比例甲基化序列的质粒模板, 当甲基化序列含量仅为 1% 时, 仍可出现明显的甲基化条带(图 3), 提示 MSP 方法检测甲基化具有高敏感性的优点。
2.3 提高 MSP 退火温度的优点 用 *SHH* 启动子全甲基化克隆和全非甲基化克隆(质粒)作为模板, 评价 *SHH* 启动子的

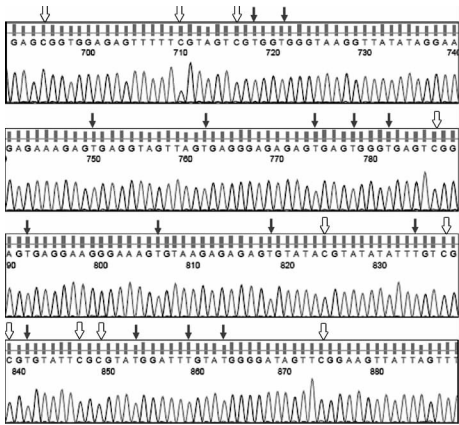
* 基金项目: 泸州医学院自然科学基金资助课题(2010-108)。

MSP 引物,结果发现,当退火温度为 56℃ 时,PCR 扩增出现了非特异性产物,即假阳性和假阴性。而把退火温度提高到 61℃ 时,非特异性扩增产物消失(图 4)。实验结果提示,较高的退火温度能保证 MSP 扩增的特异性。

表 1 SHH 启动子甲基化检测引物序列

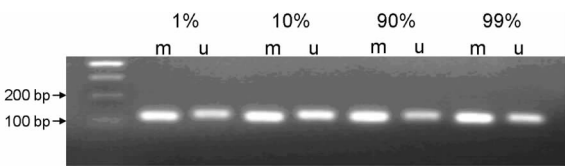
方法		上游引物(5'~3')	下游引物(5'~3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)	CpGs 含量
BSP	第一轮	TTT TTT TGT TTT TTG ATT GTT GTT T	TCA ACT TTT TAA AAT ACC TCC TCT TC	56	—	—
	半巢式	GTT ATT TTA GTT TTT GTT TGG GTG G	—	56	352	34
MSP	U	GGT GGA GAG TTT TTT GTA GTT GT	ACA TAT ACA CTC TCT CTT ACA CTT	56 或 61	131	—
	M	GGA GAG TTT TTC GTA GTC GC	CGT ATA CGC TCT CTC TTA CGC	36 或 61	127	—

注:U 为非甲基化引物;M 为甲基化引物;—为无数据。



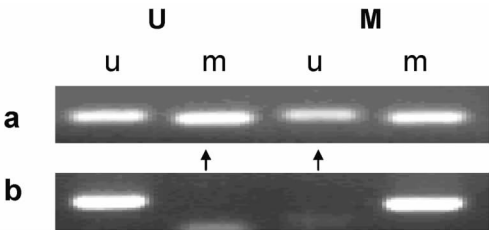
注:实心箭头为非甲基化 CpG 位点;空心箭头为甲基化 CpG 位点。

图 2 BSP 法分析目的序列中每个 CpG 位点的甲基化状况



注:m 为甲基化条带;u 为非甲基化条带。

图 3 MSP 检测不同含量甲基化序列的结果



注:U 为非甲基化对照;M 为甲基化对照;u 为非甲基化引物;m 为甲基化引物;a 为退火温度 56℃;b 为退火温度 61℃;箭头位非特异扩增产物。

图 4 MSP 退火温度对结果的影响

3 讨 论

近年来,DNA 甲基化研究的重要性受到人们越来越广泛的重视^[5],已开发出一系列检测 DNA 甲基化的方法。在目前所有的甲基化检测方法中,亚硫酸氢盐修饰后测序法因为能揭示单一克隆每个 CpG 位点的甲基化状态,是一种可靠性及精

确度很高的方法,因而被认为是甲基化检测的金标准。但是这种方法过程较为繁琐、昂贵,因此在大规模检测中较少应用。而甲基化特异性 PCR 具有设计简单、操作简便、费用低廉的优点,因而在研究基因的甲基化状态中应用最为广泛^[6]。但这种方法的可靠性及特异性仍有待评价^[7]。

在甲基化检测中,阳性对照非常重要,目前常用的甲基化阳性对照方法是用甲基化酶处理 DNA 得到高甲基化 DNA,再经过亚硫酸氢盐修饰^[8]。这种对照方法的缺点是容易产生不全甲基化及修饰不全,从而影响阳性对照的可靠性。为了评价 MSP 方法的可靠性,采用了一种全新的甲基化和非甲基化对照。将经过 BSP 测序证实来自高甲基化克隆的质粒作为甲基化阳性对照,而将来自非甲基化克隆的质粒作为非甲基化对照。直接采用来自全甲基化和全非甲基化的质粒序列作为对照,为 MSP 法的评价提供了一种更加客观、可靠的对照方法。

本实验结果发现,MSP 方法的确具有高敏感性的优点,能检出样本中占极小比例的甲基化 DNA 链,从而提高对样本 DNA 甲基化检测的敏感性。但是,实验结果还发现,当 PCR 退火温度较低时,容易发生非特异性扩增,出现假阳性或假阴性结果,从而影响结果的可靠性,不能反映模板 DNA 甲基化的真实水平。而适当提高退火温度能克服假阳性或假阴性结果的产生。应用 MSP 法检测基因甲基化状态时,应该注意优化 PCR 条件,尤其是应当注意退火温度,以防止产生假阳性或假阴性结果。

参考文献

[1] 付祥胜,张亚历. 结直肠锯齿状癌变途径的分子基础[J]. 胃肠病学,2008,13(9):559-561.

[2] Fu X,Li J,Li K,et al. Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas[J]. Histopathology,2009,55(5):554-563.

[3] Fu X,Yang X,Li J,et al. Opposite expression patterns of sonic hedgehog and Indian hedgehog are associated with aberrant methylation status of their promoters in colorectal cancers[J]. Pathology,2010,42(6):553-559.

[4] Bock C,Reither S,Mikeska T,et al. BiQ Analyzer:visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing [J]. Bioinformatics, 2005, 21 (21): 4067-4068.

[5] 周颀,董耀. 抑癌基因 RASSF1A 及其甲(下转第 1865 页)

表 1 试剂携带污染确认实验结果(%)

A 偏差	B									
	TG	TCHO	GLU	UA	CHE	α -HBDH	CRE	CK	ALT	ALP
Mg	250.6	171.4	—	—	—	—	—	144.7	—	124.1
P	—	228.5	116.6	336.3	154.7	146.7	—	565.0	—	—
TBA	112.5	227.6	—	867.2	—	—	142.9	—	—	—
LDH	—	—	—	—	—	—	—	—	435.5	—
TG	—	—	105.3	—	—	—	—	103.7	105.6	—
ALP	—	—	—	—	—	—	—	94.3	—	—

注:—为无数据。

表 2 纯水冲洗后试剂携带实验结果

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Mg	Mg	Mg	P	P	P	P	TBA	TBA	LDH
B	TG	TCHO	CK	TCHO	UA	CHE	CK	TCHO	UA	ALT
A 偏差(%)	205.5	141.0	128.1	180.8	269.7	125.6	458.3	168.9	620.3	320.4

表 3 经酸碱清洗后试剂携带实验结果

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Mg	Mg	Mg	P	P	P	P	TBA	TBA	LDH
B	TG	TCHO	CK	TCHO	UA	CHE	CK	TCHO	UA	ALT
A 偏差(%)	106.1	101.8	99.6	103.2	104.0	102.5	108.2	103.0	107.1	107.4

3 讨 论

全自动生化分析仪试剂携带污染主要与仪器的冲洗效率及检测试剂的成分和方法有关。如果上一测试项目的试剂中含有下一测试项目的待测成分或试剂成分,可能对下一测试项目产生严重的污染^[1]。反应方法相同或相似的两种测试项目,标本中上一测试成分的浓度远远大于下一测试成分的浓度时,也会产生严重的污染。因此,在测试顺序设定时,充分地了解各测试项目的反应原理、试剂成分、中间产物等,合理安排测试顺序,可降低试剂携带污染对化学分析结果的影响程度。仪器的冲洗效率下降、黏附率增加,试剂携带污染会加重^[2]。

对多种试剂可能存在干扰的成分进行测定,经分析确定 TG、TCHO、CK、ALP 试剂中均含有大量的镁离子;TCHO、GLU、UA、CHE、 α -HBDH、CK 试剂中均含有大量的磷成分;TG、TCH、UA、CRE 试剂中含有大量的胆酸盐,对循环酶法测

定 TBA 会产生严重的干扰。

试剂携带污染有很多种处理措施^[3-6]:(1)增加纯水、碱性洗液、酸性洗液冲洗量;(2)调整检测顺序;(3)固定试剂探针、比色杯的使用范围;(4)换用相互污染小的试剂或方法;(5)综合处理措施。

总之,全自动生化分析仪的试剂携带污染及污染来源可以通过实验进行检测,采用适当的处理措施可有效地降低试剂携带污染,增加分析结果的重复性和准确性。

参考文献

[1] 李清祥,雷震,钟以文. 临床化学检测系统比色杯携带污染检测及其处理措施[J]. 实用临床医学,2010,11(4):7-8.

[2] 顾光煜,张葵. 临床化学自动分析的携带污染与解除[J]. 临床检验杂志,2007,25(6):401-403.

[3] 邱玲,程歆琦,刘茜,等. 自动生化分析仪携带污染来源检出及处理[J]. 医学研究杂志,2007,36(6):64-67.

[4] 沈振亚,李智,左玫,等. Modular-PPI 全自动生化分析仪试剂携带污染及其解决措施[J]. 临床检验杂志,2008,26(3):219-220.

[5] 宋莲芳,颜景祥. 自动生化分析仪试剂探针污染携带率对检测结果影响的探讨[J]. 现代检验医学杂志,2003,18(2):61.

[6] 丁昊. 生化分析仪试剂探针污染对检测结果的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2005,25(3):214-215.

(收稿日期:2012-02-16)

(上接第 1863 页)

基化的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志,2007,6(3):155-157.

[6] Herman JG, Graff JR, Myohanen 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.

[7] Shen L,Guo Y,Chen X,et al. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation a-

nalysiss[J]. Biotechniques,2007,42(1):48,50,52.

[8] Narayan G,Freddy AJ,Xie D,et al. Promoter methylation-mediated inactivation of PCDH10 in acute lymphoblastic leukemia contributes to chemotherapy resistance[J]. Genes Chromosomes Cancer,2011,50(12):1043-1053.

(收稿日期:2012-02-11)