文章编号:1000-5404(2006)18-1915-03

技术方法

石蜡包埋组织中DNA甲基化特异性PCR技术

高丽莉,胡义德,刘洪旗 (第三军医大学新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 以石蜡包埋组织提取的DNA为模板进行DNA甲基化特异性PCR(MSP)检测,研究其可行性。**方法** 35例石蜡包埋肺癌组织DNA样品制备和亚硫酸氢盐修饰后进行MSP扩增检测。**结果** 石蜡包埋组织MSP检出率与文献采用新鲜组织标本报道一致。**结论** MSP通过选择合适的实验条件,可适用于石蜡包埋组织DNA甲基化分析。

近年来有关DNA甲基化与肿瘤发生的关系日益受到人们的重视,成为肿瘤分子生物学研究热点之一。研究表明,肿瘤抑制基因的CpG序列易发生甲基化,其高度甲基化可能与基因的失活和肿瘤的发生有关。对于DNA甲基化的检测现在多采用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP),其基本原理是通过亚硫酸氢盐对DNA样品的修饰,非甲基化的胞嘧啶发生脱氨基反应而成为尿嘧啶,而发生甲基化的胞嘧啶却不能发生脱氨基反应,碱基不发生转变。再运用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行PCR扩增,从而对DNA的甲基化状态予以检测。以往实验多采用新鲜组织,使研究样本来源受到很大的局限,而本实验是以石蜡包埋组织为材料,对INK4a/ARF基因启动子区的甲基化情况进行MSP检测,取得了初步的经验和较好的效果。

1 材料与方法

1.1 标本采集

35例非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)石蜡标本由新桥医院病理科提供。

1.2 主要试剂

EZ DNA Methylation Kit为Zymo公司产品,Sss Ⅰ甲基转移酶为NEB公司产品,Ex-*Taq* DNA聚合酶为TaKaRa公司产品,蛋白酶K、SDS、二甲苯、乙醇、氯仿等均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

PTC200型梯度PCR仪(MJ RESEARCH, U.S.A),凝胶成像系统(alpha Innotech),恒温水浴锅(北京市医疗设备厂),TGL-16G高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),电泳仪(北京六一仪器厂),DU800核酸/蛋白检测仪(beckman coulter)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170293)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170293)
作者简介:高丽莉(1970-),女,山西省垣曲县人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤学基础与临床方面的研究。电话:(023)68755424
通讯作者:胡义德,电话:(023)68774701
收稿日期:2005-07-11;**修回日期**:2006-04-25

1.4 引物

INK4a/ARF基因引物设计参考文献[1,2],由上海博亚公司合成。见表1。

表1 INK4a/ARF基因的MSP引物

引物名称	正义链	反义链	引物大小(bp)
P14 w	GTGCCAAAGGGCGGCGCAGC	AAAACCCTCACTCGCGGCGG	122
P14 m	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCCTCACTCGCGACGA	122
P14 u	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	132
P16 w	CAGAGGGTGGGGCGGACCGC	CGGGCCGCGGCCGTGG	140
P16 m	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150
P16 u	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151

w:野生型;m:甲基化;u:未甲基化

1.5 方法

1.5.1 从经甲醛固定、石蜡包埋组织中提取DNA 将石蜡包埋的组织块切成10 μm厚,取7~8片放入1.5 ml Ep管中,每管加1.0 ml二甲苯振摇30 min,10 000×*g*离心5 min,去上清,沉淀用二甲苯重复洗1次,加1.0 ml无水乙醇,轻轻翻转混匀3 min,10 000×*g*离心5 min,去上清,加无水乙醇再洗1次,沉淀在室温中干燥。

每管加TE 0.5 ml,20% SDS 25 μl及蛋白酶K(20 mg/ml)5 μl,混匀。55 ℃水浴24 h,等体积饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提2次,加入1/10体积3 mol/L醋酸钠,2.5倍体积冷无水乙醇,混匀,-20 ℃至少放置30 min,12 000×*g*离心20 min,收集沉淀。75%乙醇洗沉淀物2次,室温晾干。加入pH 7.6的TE溶解。以紫外分光光度计测定DNA的纯度和浓度,并经1.0%琼酯糖凝胶电泳以判断DNA的质量。

1.5.2 甲基化和未甲基化阳性对照准备

SssI甲基转移酶处理的胎盘组织DNA进行碱基修饰、PCR扩增作为甲基化阳性对照,未经Sss Ⅰ甲基转移酶处理的胎盘组织DNA进行碱基修饰、PCR扩增作为未甲基化阳性对照,以等量灭菌双蒸水作空白对照。

胎盘DNA全基因组甲基化反应体系(40 μl):10×NEB Buffer 4 μl;SAM(32 mmol/L)0.2 μl,M.Sss Ⅰ Methylase 1 U,DNA 2 μg,补充H_2O至40 μl于37 ℃水浴3 h。

1.5.3 基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰 取2 μg基因组DNA按Zymo DNA CpG岛甲基化修饰试剂盒说明进行。其原理是亚硫酸氢盐可以使DNA序列中未甲基化的胞嘧啶发生脱

氨基反应而成为尿嘧啶,而发生甲基化的胞嘧啶却不能发生脱氨基反应,碱基不发生转变。

1.5.4 PCR扩增反应及检测方法 PCR反应体系(总体积为20 μl):10 × PCR Buffer 2 μl,1.5 mmol/L $MgCl_2$,1.25 mmol/L dNTPs,上下游引物各0.4 μmol/L,Ex-*Taq* DNA聚合酶0.1 μl,模板DNA 1.6 μl。在冰上配制PCR反应液。先将PCR仪预热至94 ℃,然后把PCR管放进预热的PCR仪,进行下面的循环。

反应条件为:

94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃/ P14 w,70 ℃/ P16 w,30 s,72 ℃ 30 s,共30个循环;72 ℃延伸4 min。

94 ℃ 30 s,60 ℃/ P14 m/ P14 u,64 ℃/P16 m/ P16 u,30 s,72 ℃ 30 s,共45个循环;72 ℃延伸4 min。

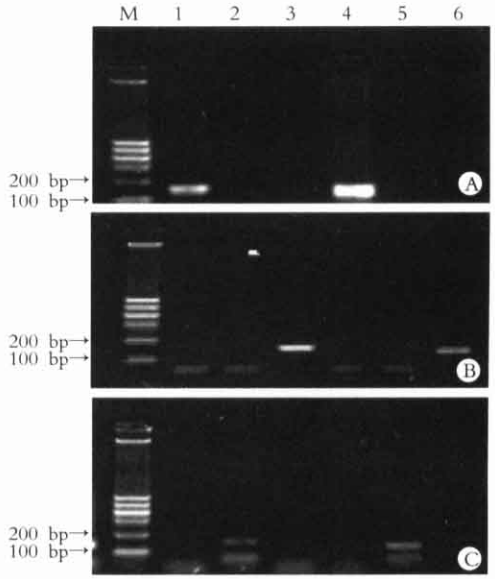
PCR反应结束后,取10 μl反应产物,2 μl上样缓冲液,于含0.15 mg/L溴化乙锭的2.5%琼脂糖凝胶上电泳,以100 bp梯度DNA为分子量标准,凝胶成像系统分析仪进行摄像分析。

所有PCR均设甲基化和未甲基化的阳性对照以及不含DNA的阴性对照。

2 结果

2.1 MSP的特异性

图1显示了MSP使用的对照,胎盘DNA经碱基修饰前仅能扩增出P16 W、P14 W,胎盘DNA经碱基修饰后仅能扩增出P16 u、P14 u,胎盘DNA先经M. Sss Ⅰ甲基转移酶处理后再进行碱基修饰仅能扩增出P16 m、P14 m。与标准分子量DNA相比,P16 w、m、u PCR扩增长度分别为140、150、151 bp,P14 w、m、u PCR扩增长度分别为122、122、132 bp。与预期的长度相符,说明MSP有很高的特异性。

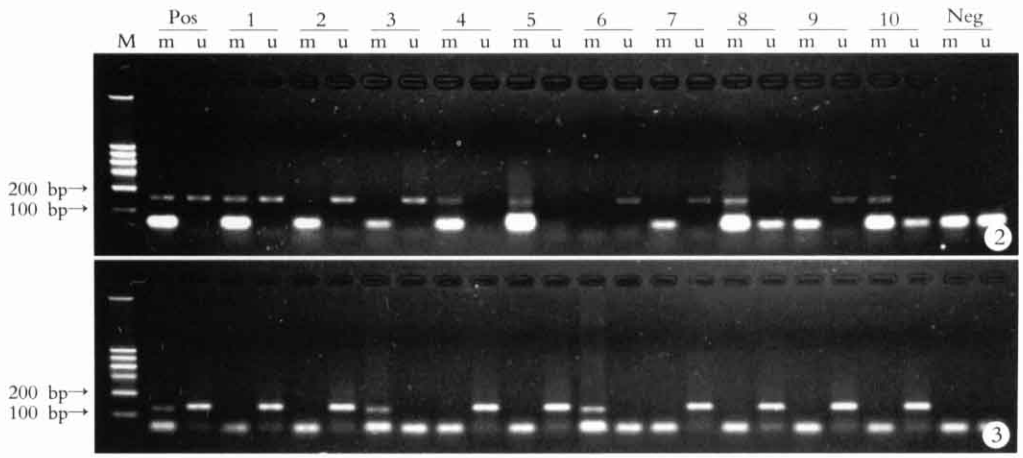


A:野生型对照; B: 未甲基化对照; C:甲基化对照 M:标准;1-3:分别为INK4a基因w、m、u;4-6:分别为ARF基因w、m、u

图1 胎盘DNA MSP结果

2.2 MSP分析结果

35例石蜡包埋NSCLC组织有18例P16 M(51.4%)扩增阳性,8例P14 M(22.8%)扩增阳性,见图2、3。



Pos:阳性对照(胎盘DNA经M. Sss Ⅰ处理后再修饰和不经过M. Sss Ⅰ处理直接修饰分别作为甲基化和未甲基化的阳性对照);M:标准;m:甲基化;u:未甲基化;Neg:空白对照;箭头所示为引物二聚体。病例1、4、5、8、10的INK4a基因显甲基化阳性

图2 INK4a基因的甲基化电泳图(样本1-10)

Pos:阳性对照(胎盘DNA经M. Sss Ⅰ处理后再修饰和不经过M. Sss Ⅰ处理直接修饰分别作为甲基化和未甲基化的阳性对照);M:标准;m:甲基化;u:未甲基化;Neg:空白对照。病例3、6的ARF基因显甲基化阳性

图3 ARF基因的甲基化电泳图(样本1-10)

3　讨论

我们选取 35 例石蜡包埋 NSCLC 利用 MSP 技术对 INK4a、ARF 基因启动子甲基化状态进行了分析，结果显示石蜡包埋组织中 INK4a、ARF 基因启动子区甲基化发生率与采用新鲜组织标本报道基本一致[3-7]，说明本实验利用石蜡包埋组织为材料进行 MSP 检测的技术是可行的。

3.1　关于 DNA 样品的制备

石蜡包埋组织的 DNA 因受固定剂的类型、固定时间、固定温度及组织处理过程等多种因素影响而极易断裂，故操作步骤不易过多。如何提高石蜡包埋组织 DNA 提取质量，我们的体会是：①蜡块的选择，在 DNA 提取前应检查组织切片。如果有自溶、退变或组织结构不清，大片出血等改变的蜡块不能用；若有明显坏死存在的蜡块，最好不用或将坏死部分切去后再用。②由于固定和包埋组织由于化学修饰作用，使得 DNA 与蛋白质不易分离。因此，必须增加 SDS 和蛋白酶 K 的浓度和作用时间：SDS 可增至 1% ~2%，蛋白酶 K 可分次加入，并注意不时震摇，使酶与组织充分接触。③根据组织细胞密度和细胞外间质的多少，DNA 释放率是有差异的。对于含有较多间质的肺组织，我们在预实验中观察孵育时间最少要达到 24 h。④在 DNA 提取过程中，应尽可能轻柔操作，避免过多地移管。若必需移管时应选用大口吸管。尽可能避免人为的 DNA 剪切。

3.2　关于亚硫酸氢盐修饰

MSP 的 DNA 模板在抽提后需经亚硫酸盐修饰，如果修饰不彻底时，将导致假阳性的产生，因此在处理的过程中每一步都必须严格按照试剂盒的操作说明书进行。通常研究者利用 2 对引物即甲基化特异性引物（m）和非甲基化特异性引物（u）进行 MSP 扩增，我们增加了 1 对野生型引物（w），引物 u 和化学修饰后未甲基化的 DNA 退火，引物 m 和化学修饰后甲基化的 DNA 退火，引物 w 将和任何未经化学修饰的 DNA 包括甲基化 DNA 和未甲基化 DNA 退火，用此反应作为 MSP 的对照，来检验化学修饰的效率，从而提高了 MSP 的特异性。

3.3　关于 PCR 扩增

MSP 法与普通的 PCR 反应相比，反应条件要求较为苛刻。首先 MSP 法中模板 DNA 的量较少（一般约 50 ng），另外由于引物设计有富含 GC 的序列，引物设计难于优化，若用普通 PCR 进行扩增，虽然也可得到目的片段，但容易导致非特异性扩增。除了好的引物设计之外，热启动 PCR 也能提高 PCR 特异性。本实验是在冰上配制 PCR 反应液，并将其置于预热的 PCR 仪进行反应。这种方法简单便宜，其原理与热启动相同，同样能有效地抑制非特异性扩增。

石蜡包埋组织的 MSP 检测成功，改变了以往只能用新鲜组织标本所存在的取材不易及保存困难等缺点，为临床和科研提供了有利的帮助。本研究采用新近发明的 MSP 方法，不但检测样本要求的量少，而且灵敏度高和特异性强。去甲基化治疗国外已开始走向临床，MSP 方法的建立，临床上可用于微小残留疾病的检测，为恶性肿瘤去甲基化治疗带来新的监测手段，前景是广阔的。

关键词：甲基化特异性 PCR；DNA 甲基化
中图法分类号：R730.43　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] ESTELLER M, TORTOLA S, TOYOTA M, *et al*. Hypermethylation-associated inactivation of P14 (ARF) is independent of p16 (INK4a) methylation and p53 mutational status[J]. Cancer Res, 2000, 60 (1): 129 - 133.

[2] HERMAN J G, GRAFF J R, MYOHANEN S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821 - 9826.

[3] DESTRO A, BIANCHI P, ALLOISIO M, *et al*. K-ras and p16 (INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers[J]. Lung Cancer, 2004, 44(1): 23 - 32.

[4] JARMALAITE S, KANNIO A, ANTTILA S, *et al*. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2003, 106(6): 913 - 918.

[5] KIM D H, KIM J S, JI Y I, *et al*. Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63 (13): 3743 - 3746.

[6] AWAYA H, TAKESHIMA Y, AMATYA V J, *et al*. Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung[J]. Pathol Int, 2004, 54(7): 486 - 489.

[7] HSU H S, WANG Y C, TSENG R C, *et al*. 5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(14): 4734 - 4741.

（编辑　张大春）