经验交流

文章编号:1000-5404(2008)03-0268-02

DNA甲基化PCR引物的设计

张 艳,陈 彬,陈 敏,李渝萍,陈 健,娄桂予,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

DNA甲基化是哺乳类动物一个重要的基因外遗传信号。有研究表明,DNA甲基化与大多数肿瘤的发生相关,抑癌基因启动子CpG岛的高甲基化可引起抑癌基因表达沉默,细胞出现无节制生长,导致肿瘤的发生[1]。目前,甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MS-PCR)是研究DNA甲基化最为常用且准确度较高的方法之一,而理想的引物设计则是其成功的关键因素之一。国外互联网上有1个提供免费在线引物设计程序"MethPrimer",它能够预测CpG岛,根据实验者要求设计硫化测序PCR(bisulfate-sequencing PCR, BSP)和甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR,MSP)引物。本研究旨在介绍甲基化特异性PCR引物设计的原则及"MethPrimer"设计程序的使用方法和有关注意事项。

1 材料与方法

1.1 序列的转换

DNA经亚硫酸氢盐硫化处理后,DNA双链中的"C"转化为"U",通过随后的PCR,将"U"转化为"T",但亚硫酸氢盐不能使已发生了甲基化的DNA的"C"发生上述转化,因此,根据经亚硫酸氢盐处理的DNA模板设计引物时,先输入感兴趣的DNA序列,程序将会显示2种序列:一种是输入的源DNA序列;另一种是硫化处理后的DNA序列,除了CpG岛上的5甲基胞嘧啶(5mC)之外,所有非甲基化的"C"都转换成了"T",根据转化后的序列设计引物,进行BSP和MSP。

1.2 CpG岛的预测[2]

哺乳类动物基因组中5%~10%是CpG(二核苷酸),其中70%~80%呈甲基化状态,称为甲基化的CpG(mCpG)。CpG的聚集称CpG岛,已知在所有管家基因和一些组织特异基因的5′端调控区均有CpG岛呈高度甲基化,基因组中平均100个bp有1个跨度为0.5~5 kb的CpG岛。

"MethPrimer"设计程序默认的CpG岛跨度至少为200 bp,GC含量>50%,CpG出现频率>0.6。因此,符合这些参数的区域都默认为CpG岛,我们根据任意1个CpG岛设计引物进行扩增。

1.3 BSP的引物设计原则

标准的PCR引物设计原则同样适用于硫化测序PCR(bisulfite sequencing PCR,BSP),除了标准PCR的一些参数外,"MethPrimer"应用3′端算法计算自身退火温度、末端退火温度、碱基对互补率、GC含量、解链温度(T_m),而且还提供了上游引物和下游引物的T_m区别,以及引物中最大允许的单核苷酸重复率。因为所有非甲基化的"C"都被转换成"T",所以"MethPrimer"中默认的重复"T"为8个,而其他碱基重复数为5个。

DNA的完全硫化是很重要的,因此应选择含尽可能多的非甲基化CpG的"C"区域作为源序列,设计引物。对于BSP,引物设计的原则[1]: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CpG位点。

1.4 MSP的引物设计原则[3,4]

对于MSP需要设计2对引物,一对是针对于经亚硫酸氢盐处理的甲基化的DNA;另一对是针对于经亚硫酸氢盐处理的非甲基化的DNA。根据甲基化的DNA为模板的PCR扩增甲基化的DNA;根据非甲基化的DNA为模板的PCR扩增非甲基化的DNA。MSP引物设计的原则:①为了最大限度的区分甲基化与非甲基化,引物的3′端至少包含1个CpG位点,我们可以自己设定CpG的"C"距3′末端的最远距离。"MethPrimer"中默认值为3,即是在引物的最后3个碱基中,至少有1个是CpG的"C"。②引物序列中应包含尽可能多的CpG位点。③甲基化引物和非甲基化引物序列3′端应处于相同的CpG位点。如果,2对引物不在相同的CpG位点退火,PCR结果就不能准确反映样本DNA甲基化的情况。但是甲基化引物和非甲基化引物可跨越不同的长度,在起始位点和长度上也可以不同。一般非甲基化引物比甲基化引物长,因为受T_m值限制,由于非甲基化引物中的"C"转化成"T",导致GC含量降低,从而引起T_m降低。④2套引物应有相近的T_m值,"MethPrimer"中默认2套引物T_m值相差不超过5 ℃,这种限制可使2个PCR反应在同一PCR仪中进行。

2 结果

2.1 MethPrimer设计的BSP引物

我们运用人雌激素受体β(ERβ)启动子序列(AF191544)来设计硫化测序PCR(bisulfite sequencing PCR,BSP)引物。首先进入免费在线引物设计程序"MethPrimer"(http://www.urogene.org/methprimer/),点击"Go to MethPrimer",进入"MethPrimer-Design Primers for Methylation PCRs"网页(http://www.urogene.org/methprimer/index1.html),在网页的方框内输入ERβ启动子序列,选择"Pick primers for bisulfite sequencing PCR or restriction PCR",其他参数选择程序默认值,也可根据实

基金项目:国家自然科学基金(30671056)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671056)
作者简介:张 艳,女,重庆市人,实验师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752940,E-mail:tmmubiozy@yahoo.com.cn
通信作者:周度金,电话:(023)68752940
收稿日期:2007-03-20;修回日期:2007-09-15

验需要加以限制,然后点击“ Submit ”键;“ MethPrimer ”软件即可显示预测的 ERβ 启动子序列的 CpG 岛及引物的相应位置,同时也显示设计的 BSP 引物有 5 组,我们可选择 1 组引物进行 PCR(表 1),通常情况下选择第 1 组引物,进行 PCR。如果所选择的引物 PCR 效果不佳,可选择其他几组引物,也可优化 PCR 反应条件,或者是更改 BSP 引物设计参数,重新设计引物。

表 1　MethPrimer 软件设计的 ERβ 启动子的 BSP 引物

	引物	起始(bp)	大小(bp)	T_m(℃)	GC 含量(%)	引物序列(5′→3′)
1	上游引物	1 163	25	57.94	56.00	ATATTTTATTAAGTTGGGGGAATTG
	下游引物	1 370	25	58.26	64.00	ACCCTCAAAAAATCACTAAAAAAAC
2	上游引物	1 163	25	57.94	56.00	ATATTTTATTAAGTTGGGGGAATTG
	下游引物	1 377	25	59.47	56.00	ATTCTCAACCCTCAAAAAATCACTA
3	上游引物	1 163	25	57.94	56.00	ATATTTTATTAAGTTGGGGGAATTG
	下游引物	1 365	25	56.92	56.00	CAAAAAATCACTAAAAAAACCTTTC
4	上游引物	1 152	25	59.06	60.00	GGGTGAGGGGAATATTTTATTAAGT
	下游引物	1 377	25	59.47	56.00	ATTCTCAACCCTCAAAAAATCACTA
5	上游引物	1 161	26	58.32	53.85	GAATATTTTATTAAGTTGGGGGAATT
	下游引物	1 370	25	58.26	64.00	ACCCTCAAAAAATCACTAAAAAAAC

2.2　MethPrimer 设计的 MSP 引物

输入 ERβ 启动子序列,选择“ Pick MSP primers ”,其他参数选择程序默认值,点击“ Submit ”;“ MethPrimer ”软件即可显示预测的 ERβ 启动子序列的 CpG 岛,及引物的相应位置,同时也显示设计的 MSP 引物,有 5 组引物,每组分别有甲基化引物、非甲基化引物,我们可选择 1 组引物进行 PCR(表 2),通常情况下选择第 1 组引物,进行 PCR,如果所选择的引物 PCR 效果不佳,可选择其他几组引物,也可优化 PCR 反应条件,或者是更改 MSP 引物设计参数,重新设计引物。

表 2　MethPrimer 软件设计的 ERβ 启动子的 MSP 引物

	引物	起始(bp)	大小(bp)	T_m(℃)	GC 含量(%)	引物序列(5′→3′)
1	上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
	下游甲基化引物	1 571	23	59.46	65.22	ACCAATCTAAAAACCACACTTCG
	上游非甲基化引物	1 409	24	55.40	66.67	TTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
	下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA
2	上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
	下游甲基化引物	1 570	22	58.67	63.64	CCAATCTAAAAACCACACTTCG
	上游非甲基化引物	1 409	24	55.40	66.67	TTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
	下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA
3	上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
	下游甲基化引物	1 569	23	58.36	60.87	CAATCTAAAAACCACACTTCGAA
	上游非甲基化引物	1 409	24	55.40	66.67	TTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
	下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA
4	上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
	下游甲基化引物	1 571	23	59.46	65.22	ACCAATCTAAAAACCACACTTCG
	上游非甲基化引物	1 408	25	56.22	68.00	GTTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
	下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA
5	上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
	下游甲基化引物	1 571	23	59.46	65.22	ACCAATCTAAAAACCACACTTCG
	上游非甲基化引物	1 407	26	58.51	65.38	TGTTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
	下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA

3　讨论

引物的成功设计对于 PCR 是至关重要的,硫化反应促使 DNA 链中的“ C ”转化为“ U ”,导致 GC 含量降低,使 PCR 反应后在序列中出现长的连续“ T ”,容易引起 DNA 链的断裂[5,6]。此外,纯化过程中的 DNA 的丢失,也是要考虑的另一个因素,这些因素又会影响下面的 PCR 的进行,这些都是设计 PCR 引物时需要考虑的。

一般情况下,PCR 产物的长度大于 300 bp 时,就很难以硫化 DNA 为模板进行扩增。因此,“ MethPrimer ”程序设计 PCR 产物的长度在 100 ~ 300 bp,200 bp 的长度比较合适。与标准 PCR 不同的是甲基化 PCR 引物的长度,甲基化 PCR 一般需要更长的引物,引物长度在 30 bp 左右,原因是硫化降低了模板 DNA 的 GC 含量,使序列中出现长的连续“ T ”,导致很难选择具有合适的 T_m 值及稳定的引物;另一方面,为了区别硫化处理和没有硫化处理以及未完全处理的 DNA,需要引物有足够数量的“ C ”,这些都增加了选择稳定引物的困难。因此,为了获得更稳定的双链,选择更长的引物是有必要的,因为 DNA 的 T_m 值取决于引物的长度[7]。一般情况下,甲基化 PCR 引物的长度在 20 ~ 30 bp。“ MethPrimer ”默认的引物长度在 20 ~ 30 bp,25 bp 为最适长度。

“ MethPrimer ”在设计引物时,不考虑输入序列中的重复元件和载体序列。因为,对于 DNA 甲基化的研究,我们一般注重有特点的序列或者序列中确定的区域,大部分这些序列或区域是启动子序列,因此载体序列不考虑;另一方面,输入的序列由程序模拟硫化处理发生了转化,这样重复的元件不再重复了,即使是引物位置所在的序列在转化前是重复序列,也不会影响引物的质量。

总之,“ MethPrimer ”是一个特异性的针对硫化 PCRs(BSP 和 MSP)设计引物的程序,其操作简便、快速、准确,对于研究 DNA 甲基化是一个至关重要的工具。目前,“ MethPrimer ”正在进一步地发展和完善,使它可以设计出更多其他的硫化 PCRs 的引物。

关键词:甲基化;PCR
中图法分类号:R394-33　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] Paulsen M, Ferguson-Smith A C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease[J]. J Pathol, 2001, 195(1):97 - 110.
[2] Ribeiro-Filho L A, Franks J, Sasaki M, *et al*. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer[J]. Mol Carcinog, 2002, 34(4):187 - 198.
[3] Li L C, Yeh C C, Nojima D, *et al*. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275(2):682 - 689.
[4] Li L C, Chui R, Nakajima K, *et al*. Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression[J]. Cancer Res, 2000, 60(3):702 - 706.
[5] Rychlik W. Priming efficiency in PCR[J]. Biotechniques, 1995, 18(1):84 - 86,88 - 90.
[6] 高丽莉, 胡义德, 刘洪旗. 石蜡包埋组织中 DNA 甲基化特异性 PCR 技术[J]. 第三军医大学学报, 2006,28(18):1915 - 1917.
[7] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. Methods Mol Biol, 2000, 132:365 - 386.

(编辑　邓强庭)