

快速检测 DNA 甲基化的新方法*

范钰 沈岩 傅四东** 林田** 赵艳君 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

关键词 PCR, 甲基化, FMR-1 基因

DNA 甲基化对基因表达的调控作用日益受到重视。对原核及真核细胞的多数研究结果表明: DNA 甲基化作用能引起基因表达的抑制, 二者呈反相关; 在细胞发育和分化过程中, DNA 甲基化的序列特异性^{m⁵C}存在于 5'-CpG-3' 二核苷酸序列中, 形成 5-^{m⁵C}pG-3'。CpG 序列甲基化对基因表达具有调控作用, 其它序列如 5'-^{m⁵C}pC-3' 或 5'-Gp ^{m⁵C}-3' 中的甲基化则无此作用。甲基化作用改变限制性内切酶酶切活性。如欲确定 DNA 的甲基化图谱, 通常的实验程序是: a. 用限制性内切酶将 DNA 降解成若干片段; b. 在琼脂糖凝胶上电泳分离这些片段并用 DNA 印迹法转移至硝酸纤维素膜上; c. 用已知的标记基因作为探针与转移后的片段进行分子杂交, 根据杂交图谱的分析确定 DNA 甲基化图谱^[1]。本文介绍一种先用限制性内切酶水解待测 DNA, 然后用 DNA 聚合酶链反应 (PCR) 检测 DNA 甲基化的方法。此方法操作简单、迅速, 值得推广。

我们选择与脆性 X 综合征 [Fra (X)] 有关的 FMR-1 基因 (Fragile X mental retardation 1) 甲基化敏感位点为研究对象, 合成位于该位点两侧的引物 FRX-G 和 FRX-H, 并在该位点下游 200bp 处选择了引物对 FRX-E 与 FRX-F 作为 PCR 反应的内对照^[2]。脆性 X 综合征患者及正常人基因组 DNA 从全血中制备^[3]。将 1μg DNA 加入 2μl BssH I 酶 (4U/μl, Biolabs), 2μl 10X 缓冲液, 补水至 20μl, 充分混匀后, 覆盖 30μl 石蜡油, 50℃ 水浴保温过夜。对照管除不加 BssH I 酶外, 其余成分与反应管完全相同。PCR 反应条件见文献^[2]。经过 35 个循环之后 72℃ 延伸 7min。取 10μl PCR 产物进行 2% 琼

脂糖凝胶电泳, 观察结果。

我们分析了 12 例正常男性 DNA 标本, 每份样品分别做两管, 一管用 BssH I 水解, 另一管不经 BssH I 酶水解。不加 BssH I 酶的反应管扩增出含该甲基化位点的 215bp 片段和 99bp 的内对照片段两条带, 而加酶管则只有一条 99bp 的内对照扩增带。表明在所分析的标本中该位点无甲基化存在, 因此模板 DNA 被 BssH I 酶切断, 无法扩增出 FRX-G/FRX-H 引物对特异的 215bp 条带。另外我们还检测了两例脆性 X 综合征患者 DNA 标本, 在完全相同的水解条件下, 限制酶 BssH I 不能切割 G^{m⁵}CGCGC 序列, 仍可扩增出 215bp 的特异区带 (图 1), 此结果与 DNA 印迹杂交结果吻合。

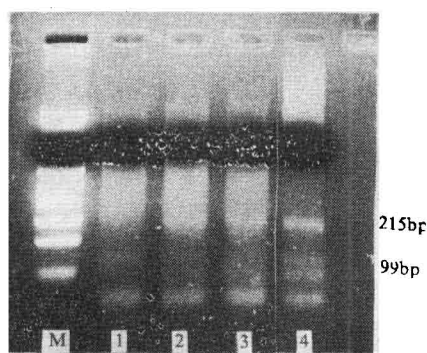


图 1 FMR-1 基因异常甲基化的 PCR 检测 M: pBR322/Hinf I 分子量标准; 1: 正常人 DNA 标本经 BssH I 酶解后 PCR; 2, 3: Fra (X) 患者 DNA 标本经 BssH I 酶解后 PCR; 4: 正常人 DNA 标本未经 BssH I 酶解, PCR

* 中华医学基金会 (CMB, 90.524) 资助。

** 西安医科大学生物教研室。

收稿日期: 1993-06-18 修回日期: 1993-07-02

现已知脆性 X 综合征与 FMR-1 基因内一段 (CGG)_n 三核苷酸重复顺序的扩增和该 (CGG)_n 重复顺序 5' 侧 CpG 岛甲基化有关。大部分患者该 CpG 岛被甲基化且 FMR-1 基因失表达^[4]。因此该 CpG 岛甲基化的检测可以作为脆性 X 综合征 DNA 诊断的方法之一。用 PCR 法检测 DNA 特定位点甲基化所需 DNA 样品量少, 操作简便, 重复性好, 耗时短, 无需使用放射性核素且灵敏度高。即使被测对象只有部分甲基化, 也可由于 PCR 的高效扩增而被检出。但本法不能区分部分甲基化与完全甲基化, 以及杂合状态的个体。若需进一步区分仍需采用 DNA 印迹杂交技术。尽管如此, 本法仍不失为一种快速、简便, 重复性好且灵敏度高的检测手段。可以广泛用于甲基化与基因表达调控的各种研究。

参 考 文 献

- 1 方福德. DNA 甲基化作用与基因表达的调控. 生理科学进展, 1984; 15: 2
- 2 Fu Y-H, Kuhl D P A, Pizzuti A *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 1991; 67: 1047
- 3 方福德, 吴冠芸主编. 基因诊断技术及应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992: 176
- 4 Pieretti M, Zhang F, Fu Y-H *et al.* Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 1991; 66: 817

科技消息

'93 国际电泳学术会议在挪威召开

'93 国际电泳学术会议 (International Council of Electrophoresis Societies, ICES-ELPHO 93) 于 1993 年 6 月 1 日至 4 日在挪威美丽迷人的海滨小城 Sandefjord 举行。我作为唯一的中国代表 (由瑞典 Pharmacia LKB 公司资助) 参加了会议。参加会议的共有 200 多人。大多来自欧洲各国, 其次是美国和日本。世界上著名的电泳权威都出席了会议。会议的第一天有四个专题学习班可任意选择参加。这四个专题是: “用固相 pH 梯度等电聚焦作为第一向的双向电泳”, “毛细管电泳”, “使用琼脂糖凝胶的滴定曲线技术和快速转移”, “电泳谱带的图像分析”。学习班介绍的内容都是当前电泳的前沿技术, 在学习班上每个学员都可以进行操作练习。会议有八个专题报告:

a. 意大利米兰大学 Righetti 教授的“生物化学中的电泳: 现在和将来”;

b. 挪威奥斯罗大学 Olaisen 教授的“法医中的 DNA 电泳”;

c. 瑞典乌普萨拉大学 Hjertén 教授的“在设计第三代毛细管电泳装置时, 什么是我们期望的新进展?”;

d. 丹麦 Aarhus 大学 Celia 教授的“双向凝胶蛋白电泳数据库: 关于连锁蛋白和基因组”;

e. 法国 de Nice-Sophia 大学 Carle 教授的“场逆转和脉冲场凝胶电泳用于分析酵母人工染色体”;

f. 日本大阪大学 Takagi 教授的“电泳光散射”;

g. 美国 NASA Marshall 空间飞行中心 Synder 博士的“空间电泳, 为什么重要?”;

h. 瑞典国立职业卫生研究所 Vesterberg 博士的“电泳方法历史的简略回顾”。

会议还有 44 个口头报告和 39 份论文摘要大字报, 内容涉及广泛, 包括毛细管电泳、DNA 电泳、免疫电泳、制备电泳、空间电泳、转移、图像分析、新的电泳介质和仪器设计等。以固相 pH 梯度等电聚焦作第一向的双向电泳是目前电泳技术的热点, 论文摘要篇数占全部的 34%。会议还有一个小型展览会, 各公司都展示了他们最新的仪器和试剂。

本次会议执行主席 Solum 教授热诚希望中国成立电泳学会并参加国际电泳学会的一切活动。会议最后宣布下一次国际电泳学术交流会将于 1995 年在巴黎举行。

〔中国科学院生物物理研究所, 北京 100101 郭尧君〕