

焦磷酸测序定量检测 γ 珠蛋白基因启动子区甲基化*

杨楠楠^{1**}, 李贵芳², 徐琴¹, 罗振元², 李頔¹, 熊永红³, 王仕敏², 黄盛文^{2***}

(1. 贵州医科大学医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院 检验科, 贵州 贵阳 550002; 3. 遵义医学院 检验系, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 采用焦磷酸测序定量检测人体 γ 珠蛋白基因(HBG)启动子区甲基化。方法: 收集30例经基因检测确诊为轻型 β -地中海贫血(简称地贫)患者的全血DNA样本, 查找 γ 珠蛋白基因的启动子区 CpG 位点, 设计 PCR 扩增引物及焦磷酸测序引物; DNA 样本经亚硫酸氢盐转化后进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物作单链处理, 在测序引物的引导下进行焦磷酸测序, 对 CpG 位点的甲基化程度进行定量分析。结果: 30例轻型 β -地贫患者的 HBG 启动子区共150个 CpG 位点均得到了甲基化程度的定量结果, 其中 -53、-50、+5、+16 及 +49 位点高甲基化分别有28例、24例、13例、0例及7例, 中甲基化分别有2例、6例、17例、30例及23例, 未检测到低甲基化。结论: 焦磷酸测序可对 HBG 启动子 CpG 位点的甲基化程度进行定量检测。

[关键词] γ 珠蛋白; 基因; 启动子区; 甲基化; 亚硫酸氢盐转化; 焦磷酸测序

[中图分类号] R34; R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)03-0274-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.03.006

Quantitative Detection of Methylation of γ -globin Gene (HBG) Promoter by Pyrosequencing

YANG Nannan¹, LI Guifang², XU Qin¹, LUO Zhenyuan², LI Di¹, XIONG Yonghong³,
WANG Shimin², HUANG Shengwen²

(1. School of Medical Examination, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Clinical Laboratory, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 3. Department of Medical Examination, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To establish quantitative detection of methylation of γ -globin gene (HBG) promoter by pyrosequencing. **Methods:** The whole blood DNA samples from 30 patients with mild β -thalassemia diagnosed by gene detection were collected to find the CpG site in the promoter region of γ -globin gene. PCR amplification primers and pyrosequencing primers were designed. DNA samples were amplified by PCR after transformation by hydrogen sulfite. The PCR products were treated with single strand, followed by pyrosequencing under the guidance of sequencing primers. The methylation degree of CpG sites was quantitatively analyzed. **Results:** A total of 150 CpG loci in HBG promoter region of 30 cases of mild thalassemia patients got quantitative results of methylation level. Among them, there were 28, 24, 13, 0, 7 cases of hypermethylation at -53, -50, +5, +16 and +49 respectively; There were 2, 6, 17, 30, 23 cases of middle methylation at them respectively; No hypomethylation was detected for all of them. **Conclusion:** Pyrosequencing can be used to quantify the degree of methylation at the CpG site of HBG promoter.

[Key words] γ -globin; gene; promoter region; methylation; bisulphite transformation; pyrosequencing

* [基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合平台人才(2016)5670号]; 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2015)7134号]; 贵州省留学人员科技创新项目[黔人项目资助合同(2016)15号]; 贵阳市科技创新平台计划[(2016)1001]35号

** 贵州医科大学2018届硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: hsw713@sina.com

网络出版时间: 2018-03-20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180320.1721.013.html>

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶的催化下, S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CG)二核苷酸中胞嘧啶第 5 位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶^[1-3]。DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种主要的表观遗传修饰形式, 是最常见的复制及转录后修饰方式之一, 能引起 DNA 稳定性、构象以及 DNA 与蛋白质之间相互作用方式的改变, 从而影响基因的表达, 调节基因组的功能^[4-7]。因此, DNA 甲基化的定量检测是研究基因表达的重要手段。焦磷酸测序可定量检测各 CpG 位点甲基化水平, 特异性高, 结果准确可靠。地中海贫血(简称地贫)是一种遗传性疾病, 轻型地贫患者在贵州省较常见, 而且临床表型多样, β -地贫发病的分子机制具有很大的遗传异质性。本研究针对轻型 β -地贫患者 γ 珠蛋白基因(*HBG*)启动子区的 5 个甲基化位点, 建立的一种基于焦磷酸测序技术的甲基化定量检测方法, 为研究 γ 珠蛋白基因启动子区的甲基化水平与 γ 珠蛋白基因表达的相关性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验标本

30 例经基因检测确诊为轻型 β -地贫患者, 其中, 女 15 例, 男 15 例, 2~60 岁。提取全血 DNA。

表 1 *HBG* 启动子区 5 个 CpG 位点的 PCR 引物和测序引物

Tab. 1 PCR primers and sequencing primers for five CpG loci in *HBG* promoter region

编号	引物 5'→3'	待测序列	产物(bp)
P-1	F: GTTAAATTTTATTATGGGTTGGTTAGTT	TTAGGGGTYGGYGGTTGGTT	255
	R: 5'Biotin-CCCACAACTTATAATAATAACCTTATCCT	AGGGATGAAGAATAAAAAGG	
	S: GTTTTAGAGTATTTAGTGAGG		
P-2	F: GGTGGTTAGGGATGAAGAATAAA	TTTATATATTYGTTTTTGGG	144
	R: 5'Biotin-ACTTATAATAATAACCTTATCCTCCTCTA	AYGTTTGAGGTTATTAATAA	
	S: AAAGGAAGTATTTTTAGTAGT	GTTTTTACTT	
P-3	F: 5'Biotin-GGTTGGTTAGGGATGAAGAATAAAAAG	ATAACRTCTAAACTAAAAAC	151
	R: CCCACAACTTATAATAATAACCTTATCCT	TTATTAATAA CCTCAA	
	S: CCTCCTCTATAAAATAACCC		

注: F 为上游引物, R 为下游引物, S 为测序引物; Biotin 标记的生物素, Y 和 R 为待测位点

1.3.2 基因组 DNA 的亚硫酸氢盐转化 转化的总体积为 140 μ L, 分别加入 Bisulfite Solution 85 μ L, DNA protect Buffer 35 μ L, 基因组 DNA 20 μ L; 在 PCR 仪中转化, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 60 $^{\circ}$ C 20 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 60 $^{\circ}$ C 20 min, 20 $^{\circ}$ C 过夜; 依次加入 Buffer BL、无水乙醇后转入纯化柱, 离心后加

1.2 主要试剂和仪器

亚硫酸氢盐转化试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), PCR 扩增引物和焦磷酸测序引物(上海生工生物有限公司)。美国 ABI Veriti96 PCR 仪(美国 ABI 生物系统公司), Qiagen PyroMark Q24 焦磷酸测序仪(上海凯杰公司)。

1.3 方法

1.3.1 甲基化岛的预测及引物的设计 在 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 上找到 γ 珠蛋白基因(*HBG1* 和 *HBG2*)的启动子区域, 采用 Methyl Primer Express Software 软件(Life Technologies 公司)对 *HBG* 启动子区进行分析^[8-9]。由于 *HBG1* 和 *HBG2* 的同源性较高, 所预测的 *HBG1* 和 *HBG2* 启动子区的甲基化岛序列一致, 为其启动子区 1 864~2 113 区域存在 5 个甲基化位点, 本实验将针对这 5 个甲基化位点来进行研究。采用引物设计软件(Pyromark Q24 Assay Design 2.0)在所选定的启动子区的甲基化岛位置设计亚硫酸氢盐转化后的 PCR 引物, 以及对应的焦磷酸测序引物, 并记录软件所默认的生物素 5' Biotin 的标记位置^[10]; 其中, 第 1 组 PCR 引物(P-1)扩增的产物含有 -53 位点、-50 位点, 第 2 组 PCR 引物(P-2)扩增的产物含有 +5 位点、+16 位点, 第 3 组 PCR 引物(P-3)扩增的产物含有 +49 位点。见表 1。

入 Buffer BW, 再次离心后加入 Buffer BD, 孵化 15 min 后离心加入 Buffer BW, 再次离心后加入 Buffer BW, 继续离心后加入无水乙醇, 最后离心后将纯化柱放入 EP 管中, 加入 Buffer EB15 μ L, 离心提取 DNA 并置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 焦磷酸测序模板 PCR 扩增 25 μ L 的 PCR

反应体系中,加入 PyroMark PCR Master Mix 12.5 μL , CoraLoad Concentrate 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL , Q-Solution 5 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 亚硫酸氢盐转化后的 DNA 1 μL , RNase-free water 1.5 μL 。PCR 反应参数为 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 15 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 共循环 45 次; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳来检测产物是否为目的片段。

1.3.4 焦磷酸测序 向八连管中加入 Beads 2 μL , Binding buffer 40 μL , PCR 产物 10 μL , 高纯水 28 μL , 总体积为 80 μL ; 用回转式振荡器以 1 400 r/min 振荡 5 min, 将八连管放置在工作站中, 打开开关, 将真空工具放到八连管的孔中, 以捕获带有 PCR 产物的 sepharose 珠; 依次使用 70% 乙醇、变性溶液及洗涤液冲洗真空工具各 10 s, 将真空工具与 24 孔反应板对齐, 关闭开关, 以释放磁珠。将 24 孔板在 80 $^\circ\text{C}$ 的加热块上加热待测样本 2 min, 让样本冷却

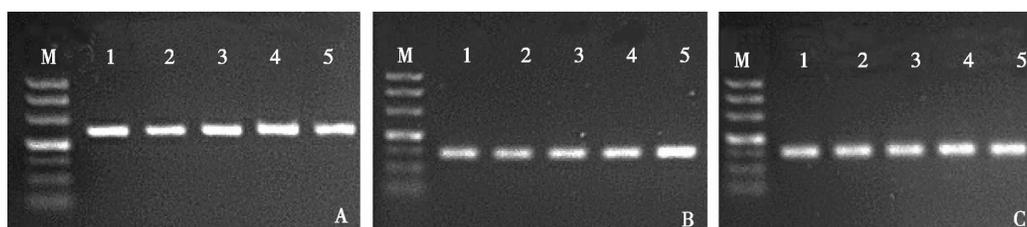
至室温, 即可放入焦磷酸测序仪内测序。

1.3.5 甲基化定量分析 亚硫酸氢盐转化的对照在 Pyrogram 图中以淡黄背景色突出显示, 以确认亚硫酸氢盐转化彻底, 而淡蓝色的区域即是待测的甲基化位点。根据相关文献及 Qiagen PyroMark Q24 焦磷酸测序仪的技术说明^[11-14], 甲基化程度检测结果在 0~5% 为背景值即无甲基化组, 5%~50% 为低甲基化, 50%~90% 为中甲基化, $\geq 90\%$ 为高甲基化。

2 结果

2.1 焦磷酸测序模板扩增结果

电泳结果显示 3 组 PCR 扩增的焦磷酸测序模板在相应位置均为单一条带, 见图 1。初步提示该扩增条件及设计的引物可用于 *HBG* 启动子区甲基化研究。



注: A、B、C 分别为引物 P-1、P-2 及 P-3 的 PCR 产物, M 为 50 bp DNA Marker; 1~5 泳道为样本

图 1 PCR 扩增的焦磷酸测序模板电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic results of pyrosequencing template

2.2 *HBG* 启动子区的甲基化测序

30 例标本共 150 个甲基化位点均测序成功, 通过 Qiagen PyroMark Q24 软件分析得出相应位点的甲基化率, 见图 2。

2.3 *HBG* 启动子区甲基化程度分布

受检的 30 例标本共 150 个位点的甲基化程度见表 2, 所有位点甲基化程度达 81.51% 以上, 均为中甲基化或高甲基化, 未发现低甲基化。

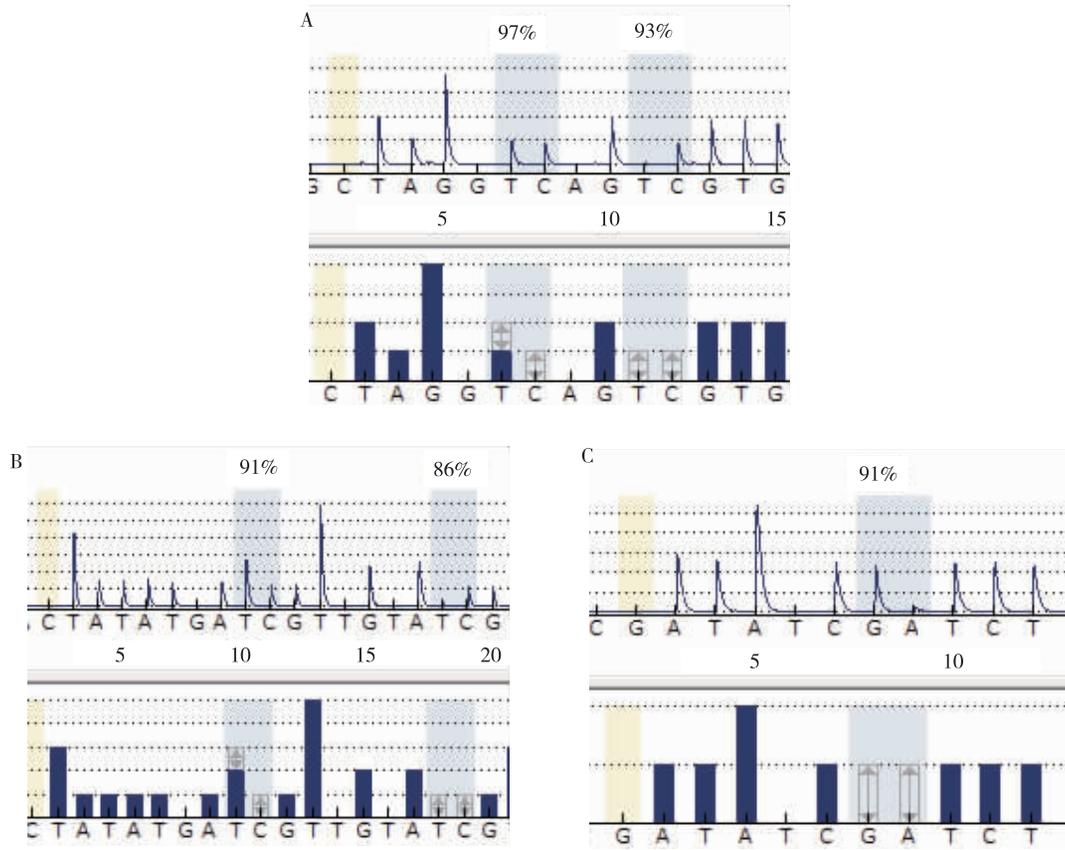
表 2 30 例标本 *HBG* 启动子区 5 个 CpG 位点的甲基化程度

Tab. 2 Methylation of 5 CpG loci in *HBG* promoter region among 30 specimens

位点	低甲基化 (n, %)	中甲基化 (n, %)	高甲基化 (n, %)	甲基化程度 (%)
-53	0(0.0)	2(6.7)	28(93.3)	92.73 \pm 1.91
-50	0(0.0)	6(20.0)	24(80.0)	91.37 \pm 1.90
+5	0(0.0)	17(56.7)	13(43.3)	90.23 \pm 3.37
+16	0(0.0)	30(100)	0(0.0)	81.57 \pm 2.90
+49	0(0.0)	23(76.7)	7(23.3)	88.83 \pm 2.10

3 讨论

DNA 甲基化是表观遗传学的一种重要的修饰形式, 可随细胞的有丝分裂和减数分裂遗传给后代细胞并持续下去^[15]。一般情况下, DNA 甲基化可抑制基因的表达, 与肿瘤的发生、发展密切相关^[16], 另外, 当甲基化对印记基因修饰紊乱时会造成印记丢失、抑制和刺激生长的信号失衡, 也会影响基因的表达^[17]。研究表明 DNA 甲基化可能发生在非编码区、尤其是调控区, 或启动子区的 CpG 岛, 它调控着相关基因的表达^[18]。因此 DNA 甲基化的检测对基因表达的研究具有重要的意义。随着检测技术的发展和 DNA 甲基化研究的深入, 越来越多的新技术被用于 DNA 甲基化的检测之中。高效液相色谱法检测甲基化其精度高、效率高、但由于对仪器设备的要求较高, 使其广泛使用



注:A中-53位点的甲基化率为97%, -50位点的甲基化率为93%;B中+5位点的甲基化率为91%, +16位点的甲基化率为86%;C中+49位点的甲基化率为91%

图2 *HBG* 启动子区-53、-50位点的甲基化定量测序结果

Fig. 2 Methylation quantitative sequencing of the -53 and -50 site in the *HBG* Promoter region

受到了限制^[19]。亚硫酸氢盐测序方法样品准备过程较为繁琐,需要大量的克隆测序^[20]。甲基化基因芯片法为高通量研究 DNA 甲基化提供了新的方法,但其特异性不够高^[21-22]。限制性酶切基因扫描技术(RLGS)检测甲基化方法,由于限制性内切酶偏好性,酶用量大、种类多对样本的要求极高^[21-23]。基于比例竞争型定量 PCR 的横向流动核酸生物传感器法要求在比较温和的环境下进行,灵敏度不够高^[21]。以上甲基化的检测方法都有其不同的局限性,尤其是在甲基化定量检测方面不够理想。

本研究建立的焦磷酸测序定量检测 *HBG* 基因启动子区甲基化的方法可以快速、准确定量检测 DNA 甲基化水平。焦磷酸测序技术是一种新的序列分析技术,在引物延伸的过程中,通过将链合成过程中释放出的焦磷酸(PPi)转化成光信号来监测链的合成过程,达到边合成边测序的目的^[24-25]。测序模板经亚硫酸氢盐转化后,根据 C 和 T 的掺入量来定量确定单个位点的 C/T 比例,从而对

CpG 位点的甲基化进行定量分析。焦磷酸测序是目前最为可靠的对 DNA 甲基化模式进行直接、绝对定量的技术,且重复性好,特异性高,操作简便,全程软件控制可显著地减少人为因素的影响。本研究的 150 个甲基化位点通过焦磷酸测序均得到了甲基化程度的定量结果,没有出现非特异峰,每次测序可同时对 24 个样本进行检测,焦磷酸测序时间仅为 20 min。

本研究对 30 例轻型 β -地贫的检测结果显示, γ 珠蛋白基因启动子区的 5 个甲基化位点均呈中度或高度甲基化,由于本实验的样本量较少,所以后续会扩大样本量来进行研究 γ 珠蛋白基因启动子区的甲基化状态是否与轻型 β -地贫临床表型相关,是否影响 HbF 的表达。胎儿体内表达的主要 β 类珠蛋白基因是 γ 珠蛋白基因,血红蛋白以胎儿血红蛋白(HbF)为主,出生以后 γ 珠蛋白基因逐渐关闭,1 岁以后接近成人水平,HbF < 1%。本研究结果说明 γ 珠蛋白基因启动子区较高度度的甲基化,起到了抑制 γ 珠蛋白基因表达的作用。

综上,本研究建立的 γ 珠蛋白基因启动子区甲基化定量检测方法,为后续研究 *HBG* 启动子区甲基化水平与 γ 珠蛋白基因表达的相关性奠定了基础。

4 参考文献

- [1] DAVIDRUS D. Mathematical framework of epigenetic DNA methylation in gene body Arabidopsis[J]. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures, 2012, 8(1):227-237.
- [2] SHINOJIMA T, YU Q, Huang S K, et al. Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer[J]. Epigenetics, 2012, 7(11):1279-1289.
- [3] SEKITA N, SUZUKI H, ICHIKAWA T, et al. Epigenetic regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene in human prostate cancer cell lines. [J]. Cancer Science, 2001, 92(9):947-951.
- [4] MORAND G B, SILVA S D D, HIER M P, et al. Insights into genetic and epigenetic determinants with impact on vitamin D signaling and cancer association studies: The case of thyroid cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2014, 12(4):309.
- [5] KLOSE R J, BIRD A. Genomic DNA methylation[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2015, 31(2):89-97.
- [6] TOST J, GUT I G. DNA methylation analysis by pyrosequencing[J]. Nature Protocols, 2007, 2(9):2265-2275.
- [7] CUSHMAN S A. Grand challenges in evolutionary and population genetics: the importance of integrating epigenetics, genomics, modeling, and experimentation[J]. Front Genet, 2014, 5(5):197.
- [8] 张锋, 虞闰六, 任绪义. 高通量检测全基因组 DNA 甲基化方法的建立[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(21):1672-1675.
- [9] FRAGA M F, RICO A, FERRERO C, et al. Setting-up genomic bisulfite sequencing reactions using Methyl Primer Express[®] Software[J]. Cancer Research, 2006, 10(1):66-69.
- [10] 叶卉, 刘云龙, 邹秉杰, 等. 焦磷酸测序中 PCR 引物与测序引物的设计[J]. 分析化学, 2013, 41(5):744-748.
- [11] 孙海平. 核苷(酸)类似物相关 HBV P 基因区耐药变异的焦磷酸测序及分析[D]. 济南:山东大学, 2010.
- [12] MOYA P, MOLINS A, MARTINEZ-ALBEROLA F, et al. Unexpected associated microalgal diversity in the lichen Ramalina farinacea is uncovered by pyrosequencing analyses[J]. Plos One, 2017, 12(4):e0175091.
- [13] AHMADIAN A, EHN M, HOBER S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future[J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 363(1):83-94.
- [14] DANHORN T, YOUNG C R, DELONG E F. Comparison of large-insert, small-insert and pyrosequencing libraries for metagenomic analysis[J]. Isme Journal, 2012, 6(11):2056.
- [15] 孙永健, 陈小强, 孙宁, 等. 表观遗传学的分子机制及其研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33):14450-14452.
- [16] KOMORI H K, HART T, LAMERE S A, et al. Defining CD4 T cell memory by the epigenetic landscape of CpG DNA methylation[J]. Journal of Immunology, 2015, 194(4):1565.
- [17] 尤媛媛, 郝长付, 姚武. 表观遗传学及其应用研究进展[J]. 现代预防医学, 2012, 39(3):715-717.
- [18] 腾丽娟, 张长松, 李克. 营养与肿瘤表观遗传学关系的研究进展——DNA 甲基化机制[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(1):95-97.
- [19] 孙贝娜. DNA 甲基化检测方法的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4):11-14.
- [20] 牟瑛, 宋添添, 宫雪, 等. 应用焦磷酸测序法检测肝癌中 4 种基因甲基化的研究[J]. 中国热带医学, 2015, 15(6):664-667.
- [21] 孙贝娜. DNA 甲基化检测方法的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4):11-14.
- [22] ALLEGRUCCI C, WU Y Z, THURSTON A, et al. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. [J]. Human Molecular Genetics, 2007, 16(10):1253-1268.
- [23] YEGNASUBRAMANIAN S, LIN X, HAFFNER M C, et al. Combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes (COMPARE-MS) for the rapid, sensitive and quantitative detection of DNA methylation. [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(3):e19.
- [24] SHAW R J, HALL G L, LOWE D, et al. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression[J]. Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, 2008, 134(3):251-256.
- [25] IWAGAMI S, BABA Y, WATANABE M, et al. Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Annals of Surgical Oncology, 2012, 19(8):2726-2730.

(2017-12-28 收稿, 2018-02-21 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 冉海勇