

DNA 甲基化分析中重亚硫酸盐处理 DNA 转化效率的评估方法

刘洋洋¹, 崔恒宓^{1,2}

1. 南京大学医学院, 江苏分子医学重点实验室, 南京 210093;

2. 扬州大学表观遗传学及表观基因组学研究所, 扬州 225009

摘要: 为建立一种评估重亚硫酸盐处理 DNA 样本后胞嘧啶转化效率的有效方法, 以两组不同的 TaqMan qPCR 检测梯度稀释的重亚硫酸盐处理和未处理的 DNA 标准品, 建立转化与未转化的 DNA *Ct* 值以及对应的 DNA 拷贝数的标准曲线。使用相同的探针定量检测重亚硫酸盐处理后的 DNA 样本评估转化效率。结果显示该方法应用两组探针, 根据相应的标准曲线, 精确评估样本经重亚硫酸盐处理的转化效率。使用已知转化和未转化拷贝数的混合 DNA 作为模板, 证实了该方法的可靠性。同时也对不同重亚硫酸盐试剂盒处理 DNA 的转化效率进行了评估, 结果显示, 该方法能够有效地评估 DNA 样品重亚硫酸盐的转化效率, 为 DNA 甲基化准确分析提供了可靠快捷的方法。

关键词: DNA 甲基化; 重亚硫酸盐; TaqMan qPCR; 转化率

The method of estimating bisulfite conversion rate in DNA methylation analysis

Yangyang Liu¹, Hengmi Cui^{1,2}

1. Jiangsu Province Key Lab of Molecular Medicine, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Institute of Epigenetics & Epigenomics, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: To establish an effective method to estimate the conversion rate of bisulfite-treated genomic DNA, TaqMan qPCR assay was performed using probes and primers that are specific for bisulfite-converted or -unconverted DNA standard samples separately. Then two linear standard curves were generated by plotting *Ct* values against logarithm of absolute DNA amount with serial dilutions of the bisulfite-converted or unconverted DNA samples. Based on two standard curves, the unknown bisulfite-treated genomic DNA sample was analyzed using the same TaqMan probes and the bisulfite conversion rate was precisely estimated. This method was further verified to be reliable using known mixed bisulfite-converted and -unconverted DNA templates as well as DNA samples treated with different bisulfite kits. These results showed that this method can effectively estimate bisulfite conversion rate of genomic DNA and thus provides a reliable and quick method for accurate analyses of DNA methylation.

收稿日期: 2015-03-26; 修回日期: 2015-06-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81171965, 81372237)和国家重点基础研究发展计划项目(937 计划)(编号: 2012CB517605)资助

作者简介: 刘洋洋, 硕士研究生, 专业方向: 表观遗传学。E-mail: yangyang01234@126.com

通讯作者: 崔恒宓, 博士, 教授, 研究方向: 表观遗传学。E-mail: hcui@nju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-129

网络出版时间: 2015-7-2 15:28:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150702.1528.002.html>

Keywords: DNA methylation; bisulfite; TaqMan qPCR; conversion rate

目前表观遗传学调控研究主要集中在 DNA 甲基化和组蛋白修饰方面^[1], 其中 DNA 胞嘧啶的甲基化修饰研究最为广泛。哺乳动物中, DNA 胞嘧啶的甲基化修饰在基因表达调控、基因组印迹、胚胎发育、维持正常细胞功能以及疾病发生过程中都起着极其重要的表观调控作用^[2~5]。

在 DNA 甲基化分析中, 重亚硫酸盐处理 DNA 是一种最常见的检测手段。重亚硫酸盐能将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶^[6], 再通过 PCR、测序和芯片杂交等技术检测 DNA 甲基化水平变化。在重亚硫酸盐处理 DNA 样本中, 胞嘧啶的转化效率决定了 DNA 甲基化检测的准确性, 转化不完全 DNA 会导致错误的假阳性结果。因此, 评估重亚硫酸盐转化 DNA 的效率是非常必要的。本研究建立了一种简单可行的检测方法, 通过 TaqMan qPCR 评估重亚硫酸盐处理 DNA 中胞嘧啶的转化效率。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾近曲小管上皮细胞(Human kidney-2, HK-2)培养于 10% FBS DMEM 高糖培养基(购自 GIBCO), 加入青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。TaqMan Universal Master Mix 试剂购于 Invitrogen; *E. coli* 化学感受态 TOP10 购于天根公司; EpiMark Bisulfite Conversion Kit 和 Q5 高保真酶购于 NEB 公司; EpiTect Bisulfite Kit 和 DNeasy Blood and Tissue Kit 购于 Qiagen 公司; Cycle Pure Kit 购于 Omega BioTek 公司; EZ DNA Methylation-Gold Kit 购于 Zymo Research 公司; Real-time PCR 引物以及探针由上海桑尼生物科技合成。

1.2 DNA 提取以及重亚硫酸盐转化

按照 DNeasy Blood and Tissue Kit 说明提取人肾近曲小管上皮细胞全基因组 DNA。分别使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit、EpiMark Bisulfite Conversion Kit 和 EpiTect Bisulfite Kit, 按照试剂盒说明书用重亚硫酸盐处理 DNA。

1.3 TaqMan 探针以及引物设计

在内参基因 β -actin 启动子上游选取一段无 CpG

位点的 DNA 序列, 使用 Real-time PCR 引物设计软件 Primer Express(ABI, USA)分别根据未转化的 DNA 序列和重亚硫酸盐处理后转化的 DNA 序列设计 TaqMan 探针以及引物(图 1)。其中探针 5'端为荧光报告基团 FAM, 3'端为淬灭基团 TAMRA, 未转化 DNA 探针与转化的 DNA 探针分别靶向转化的 DNA 与未转化的 DNA 模板(图 2)。引物和探针序列如下:

未转化 DNA 上游引物: 5'-GATGGAGGAGGCT-CAGCAAGT-3';

未转化 DNA 下游引物: 5'-GGACCTGCTCCT-CCCTTGA-3';

未转化 DNA 探针: 6FAM-5'-ACCACCACCC-AGCACACAGTGGCAGACACA-3' TAMRA;

转化 DNA 上游引物: 5'-TGGTGATGGAGGA-GGTTTAGTAAGT-3';

转化 DNA 下游引物: 5'-AACCAATAAAACC-TACTCCTCCCTTAA-3';

转化 DNA 探针: 6FAM 5'-ACCACCACCCAA-CACACAATAACAAACACA-3' TAMRA。

1.4 建立标准曲线和转化效率计算

选择持家基因 β -actin 启动子上游序列作为检测序列, 未经重亚硫酸盐处理的 DNA 和重亚硫酸盐处理的 DNA 作为模板对应未处理 DNA 和处理 DNA 的引物, 使用 Q5 超保真聚合酶(NEB, England)进行扩增, Cycle Pure Kit(Omega BioTek, USA)纯化 PCR 产物。Sanger 测序验证 DNA 序列后, 将两组 PCR 产物的 DNA 片段用作定量 PCR 标准曲线的模板。

按照如下公式计算: 拷贝数/ng = 6.02×10^{23} 拷贝数/mol \times 载体摩尔质量(g/mol) $\times 10^9$ 。选取 7 个 5 倍梯度浓度 DNA 模板建立标准曲线。梯度浓度分别为 3×10^7 拷贝数、 6×10^6 拷贝数、 1.2×10^6 拷贝数、 2.4×10^5 拷贝数、 4.8×10^4 拷贝数、 9.6×10^3 拷贝数和 1.92×10^3 拷贝数。分别建立 log 拷贝数与 *Ct* 相对应的标准曲线。

待测样本使用两组引物以及探针分别进行检测, 得出 *Ct* 值根据标准曲线计算出对应 DNA 的拷贝数(图 2)。使用如下公式计算单个样本的重亚硫酸盐的转化率。重亚硫酸盐处理 DNA 转化率(%) = 转化的 DNA 拷贝数 / (未转化的 DNA 拷贝数 + 转化的 DNA

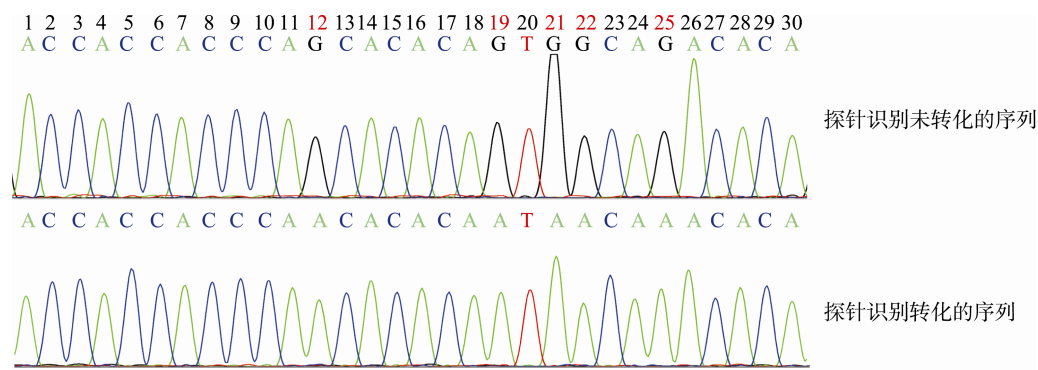


图 1 两个不同的探针分别检测转化和未转化的 DNA 模板
5 个红色的数字分别代表转化与未转化组的探针所在的位置。

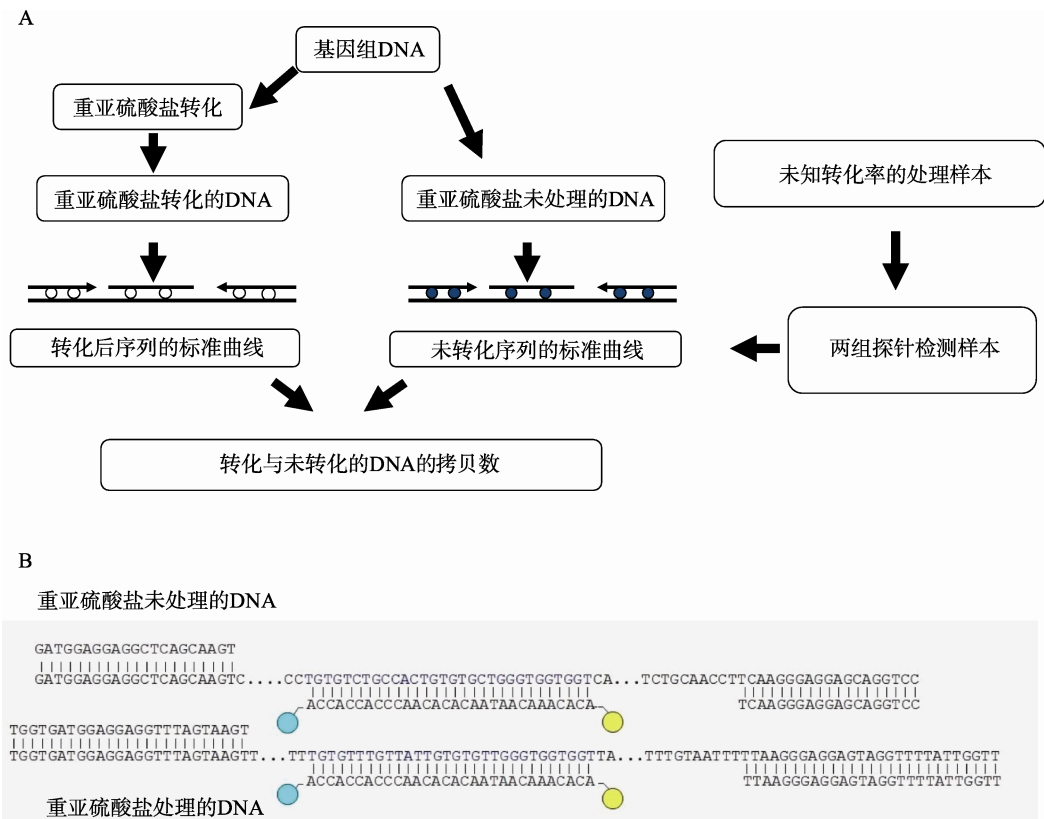


图 2 精确测定重亚硫酸盐处理 DNA 转化效率的原理
A：基因组 DNA 分别经过重亚硫酸盐处理与未经重亚硫酸盐处理，两组模板分别使用不同的 qPCR 引物与探针进行相应的检测。B：特异性的引物与探针分别结合经重亚硫酸盐处理转化后的 DNA 以及未经处理的 DNA 模板。

拷贝数) × 100%。

1.5 方法可靠性验证及商业试剂盒转化率的检测

已知拷贝数重亚硫酸盐转化 DNA 与未经重亚硫酸盐转化 DNA 模板按照拷贝数比值：0:4、1:3、2:2、3:1 和 4:0 混合，并使用上述方法检测该混合模板，将实际运算的转化率与理论值进行比较，以评

估该方法的准确性。使用不同重亚硫酸盐转化试剂盒 ,Qiagen 公司的 EpiTect Bisulfite Kit、New England Biolabs 公司的 Epimark Bisulfite Conversion Kit 和 Zymo Research 公司的 EZ DNA Methylation-Gold Kit 分别处理相同的基因组 DNA，并按照上述方法评估其转化率。

2 结果与分析

2.1 重亚硫酸盐处理和未处理模板的标准曲线

持家基因 β -actin 上游一段无 CpG 位点的核酸作为目的序列,分为重亚硫酸盐处理 DNA 和重亚硫酸盐未处理 DNA。使用与两个组模板对应的引物分别扩增 DNA 片段。纯化后根据分子量计算拷贝数,并建立标准曲线。模板拷贝数以 5 倍梯度稀释,从 3×10^7 至 1.92×10^3 拷贝数。标准曲线的横坐标对应平均 Ct 值,纵坐标对应 log DNA 拷贝数(图 3)。

2.2 方法可靠性检验

将已知拷贝数的重亚硫酸盐处理的样本与未经重亚硫酸盐处理的样本按照一定比例混合,使用上述方法检测该样本。检测结果符合预先混合样本的比例,表明该检测方法可以有效可靠地评估重亚硫酸盐处理 DNA 的转化率(表 1)。

2.3 利用该方法检测商业试剂盒的转化效率

使用 3 种不同商业的试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kit、Epimark Bisulfite Conversion Kit 和

EpiTect Bisulfite Kit 处理 DNA 样本,并使用上述方法检测重亚硫酸盐转化 DNA 效率。经检测,3 种商业化的试剂盒处理的样本全部具有大于 99% 的重亚硫酸盐转化率,均符合进行后续试验的要求(表 2),同时也验证该方法检测 DNA 重亚硫酸盐转化率的可靠性。

3 讨论

DNA 甲基化分析方法主要分为 3 种方法:甲基化敏感性限制性内切酶法,DNA 甲基化免疫共沉淀和重亚硫酸盐处理 DNA^[7]。尽管甲基化敏感性限制性内切酶的方法简单快速,但其有限的酶切位点以及未完全酶切导致的假阳性限制了其广泛应用^[8]。DNA 甲基化免疫共沉淀富集甲基化修饰 DNA 的方法,主要依赖于特异性结合甲基化的胞嘧啶抗体或甲基化 DNA 结合蛋白^[9,10],进而富集甲基化的 DNA。该方法可以快速有效的检测基因组范围的 DNA 甲基化,却无法在单个碱基水平上分析 CpG 位点修饰,而且实验结果也需要进一步的验证^[11]。重亚硫酸盐转化则有效地将甲基化的胞嘧啶脱氨基随后转为尿嘧

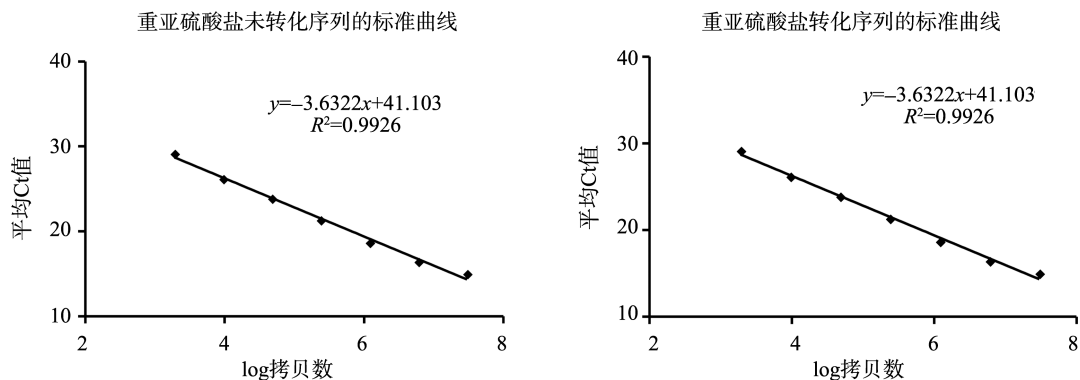


图 3 重亚硫酸盐处理后的 DNA 以及未经重亚硫酸盐处理 DNA 的标准曲线

重亚硫酸盐转化与未转化 DNA 分别进行 5 倍梯度稀释作为模板,使用 Real-time PCR 分别建立标准曲线。

表 1 重亚硫酸盐处理 DNA 转化率可靠性验证

| 转化 DNA : 未转化 DNA | 理论转化率(%) | 转化拷贝数 | 未转化拷贝数 | 实际转化率(%) |
|------------------|----------|------------|------------|----------|
| 4:0 | 100 | 2510618.33 | | 100 |
| 3:1 | 75 | 1660559.17 | 630506.85 | 72.48 |
| 2:2 | 50 | 1048715.58 | 1316477.36 | 44.34 |
| 1:3 | 25 | 554676.93 | 2045604.75 | 21.33 |
| 0:4 | 0 | | 2385937.62 | 0 |

注:各组间均重复 3 次,取平均值。实际转化率=转化拷贝数/(转化拷贝数+未转化拷贝数)×100%。

表 2 检测 3 种不同商业化的重亚硫酸盐试剂盒处理 DNA 样本的转化率

| 转化的 DNA | | | 未转化的 DNA | | | 转化率(%) |
|--|---------|----------|----------|---------|--------|--------|
| 平均 Ct 值 | log 拷贝数 | 平均拷贝数 | 平均 Ct 值 | log 拷贝数 | 平均拷贝数 | |
| EZ DNA methylation-Gold Kit (Zymo Research) | | | | | | |
| 26.31 | 4.07 | 11823.29 | 34.11 | 1.68 | 47.87 | 99.6 |
| 25.51 | 4.29 | 19633.17 | 35.91 | 1.15 | 14.17 | 99.9 |
| 25.28 | 4.36 | 22715.01 | 37.97 | 0.55 | 3.51 | 99.9 |
| 26.09 | 4.13 | 13592.76 | 34.71 | 1.50 | 31.90 | 99.8 |
| 25.54 | 4.28 | 19263.31 | 35.17 | 1.37 | 23.37 | 99.9 |
| EpiMark Bisulfite Conversion Kit (New England Biolabs) | | | | | | |
| 25.26 | 4.36 | 23004.84 | 37.53 | 0.68 | 4.73 | 100 |
| 25.05 | 4.41 | 26280.61 | 35.44 | 1.29 | 19.47 | 99.9 |
| 24.73 | 4.51 | 32191.14 | 31.77 | 2.37 | 232.97 | 99.2 |
| 26.32 | 4.07 | 11748.57 | 31.84 | 2.35 | 222.21 | 98.1 |
| 24.14 | 4.67 | 46792.08 | 33.56 | 1.84 | 69.43 | 99.9 |
| EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) | | | | | | |
| 24.73 | 4.51 | 32191.14 | 31.32 | 2.50 | 315.85 | 99.0 |
| 24.94 | 4.45 | 28178.65 | 35.80 | 1.19 | 15.26 | 99.9 |
| 25.16 | 4.39 | 24510.42 | 37.71 | 0.62 | 4.19 | 100 |
| 26.43 | 4.04 | 10957.22 | 40.00 | -0.05 | 0.89 | 100 |
| 25.58 | 4.27 | 18780.99 | 37.59 | 0.66 | 4.55 | 100 |

注：每种试剂盒分别处理 5 组样本，每组重复 3 次，取平均 Ct。

啶，而不影响甲基化的胞嘧啶^[12]。基于转化后 DNA 核苷酸的改变，可以通过不同的方法，检测 DNA 甲基化变化，例如甲基化特异性 PCR(MSP)^[13]，重亚硫酸盐测序(BSP)^[14, 15]，焦磷酸测序^[16]，甲基化芯片^[17]以及甲基化高通量测序^[18~20]等。

在重亚硫酸盐处理 DNA 研究甲基化变化的研究中，处理后的转化效率是至关重要的。目前，还没有一种简单有效的方法检测其转化效率。虽然一些商业化的试剂盒提供了甲基化分析的标准样本，其中包含完全甲基化的 DNA 作为阳性对照。然而这种方法只能整体的反应重亚硫酸盐处理样本的方法以及操作是否正确，却不能评估和监控单个样本的质量是否符合后续检测要求。即使有良好的商业化的重亚硫酸盐处理试剂盒，不当的实验操作也会导致不完全转化，并导致后续实验结果不可靠。在另外的一些检测中引入了一定的检测手段，例如焦磷酸测序软件会在合适的非甲基化位点引入额外的胞嘧啶检测，用以监控单个样本重亚硫酸盐转化 DNA 是否完全^[21]。但该检测方法需要昂贵的焦磷酸测序仪，许多实验室不具备条件。

本研究建立了一种简单的方法，使用 TaqMan

qPCR，能快速准确的评估重亚硫酸盐处理的 DNA 样本的转化率。该方法具有多个优点：(1)方法简便经济，可以广泛的应用于各个分子实验室；(2)由于使用 TaqMan 实时定量 PCR 方法进行检测，其具有很好的灵敏性和准确性。可以准确的评估未完全转化的 DNA 在处理样本中的百分比；(3)该方法最明显的优势是在简单快速的同时，可以检测数百个重亚硫酸盐处理的 DNA 样本，在评估样本的同时并降低重复试验的工作量。本研究中，我们的方法仅适用于人源的 DNA 样本，对于其他物种可以设计类似的引物以及探针，即可简单快速的检测重亚硫酸盐的转化效率。

参考文献

[1] Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(5): 295–304.[DOI]

[2] Gehring M, Bubb KL, Henikoff S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*, 2009, 324(5933): 1447–1451. [DOI]

[3] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in

- mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3): 204–220. [DOI]
- [4] Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development*, 2011, 138(5): 811–820. [DOI]
- [5] Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 2010, 70: 27–56. [DOI]
- [6] Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2353–2364. [DOI]
- [7] Shen LL, Kondo Y, Guo Y, Zhang JX, Zhang L, Ahmed S, Shu JM, Chen XL, Waterland RA, Issa JPI. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *Plos Genet*, 2007, 3(10): e181. [DOI]
- [8] Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 191–203. [DOI]
- [9] Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 2007, 134(22): 3959–965. [DOI]
- [10] Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, 2007, 39(4): 457–466. [DOI]
- [11] Nair SS, Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Statham AL, Strbenac D, Robinson MD, Clark SJ. Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics*, 2011, 6(1): 34–44. [DOI]
- [12] Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 2010, 328(5980): 916–919. [DOI]
- [13] Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A. Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(7): e42. [DOI]
- [14] Shen LL, Guo Y, Chen XL, Ahmed S, Issa JP. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *BioTechniques*, 2007, 42(1): 48–58. [DOI]
- [15] Jiang MH, Zhang YH, Fei J, Chang XX, Fan WW, Qian XQ, Zhang TB, Lu DR. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab Invest*, 2010, 90(2): 282–290. [DOI]
- [16] Irahara N, Nosho K, Baba Y, Shima K, Lindeman NI, Hazra A, Schernhammer ES, Hunter DJ, Fuchs CS, Ogino S. Precision of pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells. *J Mol Diagn*, 2010, 12(2): 177–183. [DOI]
- [17] Brinkman AB, Gu HC, Bartels SJJ, Zhang YY, Matarese F, Simmer F, Marks H, Bock C, Gnirke A, Meissner A, Stunnenberg HG. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1128–1138. [DOI]
- [18] Ekblom R, Galindo J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 2011, 107(1): 1–15. [DOI]
- [19] Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(7): 499–510. [DOI]
- [20] Liu L, Li YH, Li SL, Hu N, He YM, Pong R, Lin DN, Lu LH, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: ArticleID 251364. [DOI]
- [21] Byun HM, Siegmund KD, Pan F, Weisenberger DJ, Kanel G, Laird PW, Yang AS. Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4808–4817. [DOI]

(责任编辑: 方向东)