

王鹤潼, 宋 婕, 崔伟娜, 等. 植物位点特异性甲基化研究的引物设计及 PCR 体系优化[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(9): 1686–1693.

WANG He-tong, SONG Jie, CUI Wei-na, et al. Primer design and PCR condition optimization for plant site-specific methylation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(9): 1686–1693.

植物位点特异性甲基化研究的引物设计及 PCR 体系优化

王鹤潼^{1,2}, 宋 婕³, 崔伟娜⁴, 曹 霞^{5,6}, 何 蕾³, 贾春云¹, 惠秀娟¹, 台培东¹, 成智博¹, 刘 宛^{1*}

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016; 2.辽宁何氏医学院, 沈阳 110163; 3.辽宁大学, 沈阳 110036; 4.上海应用技术学院, 上海 201418; 5.沈阳农业大学, 沈阳 110866; 6.通辽市农业科学研究院蔬菜所, 内蒙古通辽 028000)

摘 要:通过设计大量引物,探索在植物甲基化引物设计中长、短引物的设计方法及其相应的 PCR 条件,同时比较不同 Taq 酶对甲基化率影响。结果表明:17~30 bp 短引物适合使用 Touch-down 程序 PCR,但特异性差、成功率低;31~50 bp 长引物使用 55 °C 退火 60 °C 延伸的 PCR 条件成功率最高,其中反向引物的长度及 T_m 小于正向引物较佳;高保真酶因其 3'→5' 外切酶活性不宜用于甲基化研究,而 EpiTaqTM HS 在 PCR 结果中表现最佳。

关键词:植物甲基化;引物设计;Taq 酶;PCR 条件

中图分类号:Q943.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)09-1686-08 doi:10.11654/jaes.2016-0173

Primer design and PCR condition optimization for plant site-specific methylation

WANG He-tong^{1,2}, SONG Jie³, CUI Wei-na⁴, CAO Xia^{5,6}, HE Lei³, JIA Chun-yun¹, HUI Xiu-juan¹, TAI Pei-dong¹, CHENG Zhi-bo¹, LIU Wan^{1*}

(1. Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Liaoning He University, Shenyang 110163, China; 3. Liaoning University, Shenyang 110036, China; 4. Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China; 5. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 6. Institute of Vegetable Science, Tong Liao Academy of Agricultural Sciences, Tongliao 028000, China)

Abstract: The present study was to explore design methods for short and long primers in plant methylation research and their corresponding PCR conditions employing large number of designed primers and to analyze the effects on methylation rates using three different Taq polymerases. Results showed: a Touch-down PCR was suitable when using short primers of 17 ~ 30 bp, however, low specificity and success rates were observed; PCR performed the best when using long primers of 31~50 bp, provided that length and T_m of forward primers > those of reverse primers and 55 °C and 60 °C served as annealing and prolonging temperature, respectively; Super-Fidelity Taq polymerase like Prime STAR[®] HS isn't suitable for methylation research because of its 3'→5' exonuclease activities. However, PCR performed the best when using EpiTaqTM HS.

Keywords: plant methylation; primer design; Taq polymerase; PCR condition

表观遗传修饰是一种不同于核苷酸序列的可遗传信息,主要包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰,研究发

现其在植物生长发育、基因表达调控以及抗逆胁迫中起着至关重要的作用^[1-2]。DNA 甲基化广泛存在于多种有机体中,且多数发生在胞嘧啶第 5 碳原子上形成 5-甲基胞嘧啶。在植物中,DNA 甲基化是一种普遍现象,20%~30%的基因组胞嘧啶处于甲基化状态,并分布于 CG、CHG、CHH 位点(H 代表 A、G 或 T)^[3-5]。随着人们对植物 DNA 甲基化研究愈来愈关注,开发出众

收稿日期:2016-02-02

基金项目:国家自然科学基金项目(21347007,41272255,41472237);
国家科技重大专项(2012ZX7505-001)

作者简介:王鹤潼(1985—),男,辽宁沈阳人,博士,从事植物分子毒理及表观遗传研究。E-mail:tony.w.china@hotmail.com

* 通信作者:刘 宛 E-mail:liuwan63@hotmail.com

多检测DNA甲基化的方法。根据研究内容和目的的不同,可分为检测全基因组甲基化和位点特异性甲基化两类方法,其中前者主要以高效液相色谱法^[6]、基于甲基化敏感内切酶(如:Methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP^[7]和Methylation-sensitive arbitrarily primed PCR, MSAP-PCR^[8-10]等)和基于Southern探针杂交(如:CGI array和cDNA microarray等)^[2]的方法为主,由于芯片技术需要开发大量探针且成本较高,而高效液相色谱法条件优化较复杂,因此在植物研究中多数使用基于甲基化敏感内切酶的方法。

在位点特异性甲基化研究中,以使用重亚硫酸盐限制酶组合分析^[11](COBRA)、甲基化特异性PCR^[12](MSP)和重亚硫酸盐测序法(Bisulfite Sequencing)^[13-15]为主。随着DNA测序技术发展,由于植物基因组CG含量较高而无法使用焦磷酸测序,重亚硫酸盐测序法的检测效率和准确性均高于COBRA法和MSP法,目前位点特异性甲基化研究中重亚硫酸盐测序法的使用最为广泛^[16-17]。然而,随着该方法在植物上的不断应用,发现其中仍然存在一些较棘手的技术性问题,即DNA目的片段重亚硫酸盐修饰后扩增结果不理想和测序后甲基化率不稳定,其中涉及引物的设计、PCR条件的优化和Taq酶的选择三个方面^[18]。由于植物基因组CG含量与动物及人相比较^[9],基因组修饰后重复序列过多,导致应用该方法时在设计引物和选择目标区域上会受到极大限制,同时还因所需目的基因区域的范围限制,导致所设计引物的 T_m 、特异性和稳定性不佳,使其在修饰后的DNA上不易扩增。另外,我们还发现不同的Taq酶对测序后的DNA甲基化率有明显影响,而这些问题都让植物甲基化研究受到阻碍。因此,本研究从完善方法着手,首次通过分析不同引物设计方式和不同引物扩增体系对甲基化结果的影响,优化植物研究中重亚硫酸盐测序法的实验条件,最终建立一个兼顾实验操作性和结果稳定性的重亚硫酸盐测序法实验体系,为植物的位点特异性甲基化研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养与处理

选用哥伦比亚型拟南芥种子,经10%次氯酸钠消毒后,于灭菌超纯水中4℃浸种24h打破春化。浸种后在无菌台上将种子转移至灭菌后0.5×MS培养基(0.5%蔗糖)中,并于21℃、10h光照培养15d^[9]。

1.2 DNA的提取

将不同培养罐中的幼苗混合,使用北京康为世纪生物科技有限公司的新型植物基因组DNA提取试剂盒(CW0531)提取混合幼苗地上部DNA,然后使用Eppendorf Biophotometer Plus检测DNA含量,根据测定结果上样50ngDNA进行琼脂糖电泳,用TaKaRa DL2000 DNA Marker进行含量校准并分装成每管1μg, -70℃冰箱保存。

1.3 重亚硫酸盐测序法

按照说明书使用EZ DNA Methylation-Gold™ Kits(Zymo research)修饰100ngDNA。根据TAIR(www.tair.org)拟南芥DNA序列数据库,使用Primer 5和Oligo 7自设计引物PCR扩增错配修复基因MLH1、MSH2、MSH6和MSH7启动子片段(引物序列及PCR条件详见“结果与分析”);扩增产物使用1%琼脂糖(TaKaRa)凝胶电泳检测;目的片段使用TaKaRaMiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit回收纯化;纯化后的PCR片段连接载体后克隆测序(上海英骏生物技术有限公司)。

2 结果与分析

2.1 植物甲基化研究中短引物的设计与应用

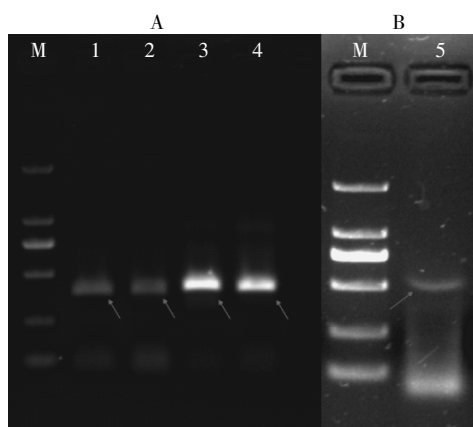
由于植物核基因组CG含量较高,修饰后造成基因组存在大量重复序列使引物特异性降低,因此本实验室为研究胁迫诱导拟南芥幼苗错配修复基因启动子甲基化变异,设计了大量长度在17~30bp的正、反向引物,发现其中仅有3对引物MLH1-1F/MLH1-1R、MLH1-410F/MLH1-410R和MSH6_P6F/MSH6_P6R3(表1)扩增出所需目的片段,且扩增稳定(图1)。通过比较引物相关信息,发现这3对成功扩增的引物,其正向引物的长度和 T_m 均大于反向引物(表1),说明在正、反向引物的设计上,需要反向引物的长度短于正向引物,前者可以优先退火结合模板;而正引物较长,可增加引物的特异性,其 T_m 高于反向引物利于在反向引物扩增后,迅速结合反向引物所在的模板链,最终完成整个PCR过程。

图1表明,在PCR扩增条件优化上,通过使用多种方式扩增后发现,Touch-down对于这三种甲基化短引物的扩增均有较好的效果:引物MLH1-1F/MLH1-1R使用55℃退火30s,且每个循环降0.5℃,运行17个循环,然后47℃退火30s运行21个循环为退火条件;引物MLH1-410F/MLH1-410R使用55℃退火30

表1 实验中自设计的甲基化短引物

Table 1 Self-designed short primers for methylation in this study

引物 Primers	序列 Sequence	长度 Size/bp	$T_m/^\circ\text{C}$	$3'\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
MLH1-1F	TGTTGGTGTGTTATTTTATTAATGTG	27	54	-6.3
MLH1-1R	TTCTTCCTCCTCCATCTC	19	52	-5.8
MLH1-410F	ACTGTGGAGTGACATCAAGAGTTG	24	60	-6.3
MLH1-410R	GATCATGATGATGCCTCACAAA	22	56	-6.0
MSH6_P6F	AGATTGGTTTTGGATYGGTTTAAG	24	56	-5.0
MSH6_P6R3	CRCTRCTRRTTCACCAAC	18	55	-6.8



图中 M 为 DNA marker(Takara DL2000),片段从大到小分别为 2、1 kb 和 750、500、250 bp;1 和 2 为不同模板浓度下 MLH1-1F/MLH1-1R 的 PCR 扩增产物;3 和 4 为不同模板浓度下 MLH1-410F/MLH1-410R 的 PCR 扩增产物;5 为 MSH6_P6F/MSH6_P6R3 的 PCR 扩增产物
M stands for DNA marker(Takara DL2000); 1 and 2 for the PCR products amplified by primers MLH1-1F/MLH1-1R under the samples of different concentration; 3 and 4 for MLH1-410F/MLH1-410R; 5 for MSH6_P6F/MSH6_P6R3

图1 自设计短引物电泳验证

Figure 1 Electrophoresis validation of products amplified by 3 pairs of short, self-designed primers

s,且每个循环降 1°C ,运行 11 个循环,然后 45°C 退火 30 s 运行 27 个循环为退火条件;引物 MSH6_P6F/MSH6_P6R3 使用 56°C 退火 30 s,且每个循环降 0.5°C ,运行 9 个循环,然后 52°C 退火 30 s 运行 30 个循环为退火条件。

该结果说明,甲基化短引物设计的实现需对应优化 PCR 条件,根据正、反向引物的 T_m 决定 Touch-down 程序的递降范围,原则上 Touch-down 程序退火最高温度设定于正、反向引物 T_m 之间,不可超过反向引物 T_m 过多,最低退火温度与最高退火温度之差原则上小于 10°C 。而且,引物 3'端的 ΔG 需要低于普通 PCR 引物,更利于甲基化引物退火后快速引发延伸反应。

结果还发现,虽然引物 MSH6_P6F/MSH6_P6R3 能够扩增出较稳定的 PCR 产物,且与 DNA marker 比较后其片段大小也与目的片段基本相似,但经过克隆测序并与 NCBI 数据库比对后发现,所扩增的序列与叶绿体 DNA 高度同源(图 2),并非所需目的基因 MSH6 的 PCR 片段。这说明甲基化短引物仍存在弊端,无法避免基因组修饰后导致的引物特异性严重下降。

2.2 植物甲基化研究中长引物的设计与应用

由于甲基化短引物无法避免基因组修饰后导致的引物特异性严重下降,致使 PCR 产物可能为非目的片段。为了克服该问题,本研究设计了大量长度为 31~50 bp 的长引物。表 2 中提供了部分该实验中的自设计引物,其中覆盖了拟南芥 *MSH2* 和 *MSH7* 基因的启动子区 0~600,且每个基因含有 2 对有效引物,表 2 中带“*”号引物为有效引物,其中 dMSH2-11F/dMSH2-5R 和 dMSH2b-7F/dMSH2b-4R 为 *MSH2* 基因启动子引物,dMSH7-3F/dMSH7-2R 和 dMSH7b-4F/dMSH7b-2R 为 *MSH7* 基因启动子引物。根据实验结果该 4 对引物均为有效扩增(图 3),且经测序比对验证是目的片段。

由于引物长度的加大可以使引物特异性得到很大的提升,正向引物已很难非特异性的结合非对应模板。根据短引物设计所得经验,在设计引物中依然尽量保持反向引物的长度小于正向引物,至少保证绝对不大于正向引物长度。结合表 2 和图 3 结果分析,表明反向引物仅需不大于正向引物,两者 T_m 仅需相差不大,且有较低的 3'端 ΔG ,便可扩增出目的片段。在引物的 PCR 程序选择上,通过对各种方式的尝试,最终发现,使用 55°C 退火 30 s、 60°C 延伸 2 min 适合甲基化长引物扩增,而且其特异性和稳定性较高。

表 2 显示,随着引物加长,不可避免的问题便是引物中覆盖了许多可修饰位点,但这些位点是否被修饰未知,因此只能通过使用简并碱基代替。过多的简并会导致引物的特异性和稳定性下降,因此本实验在

Arabidopsis thaliana chloroplast complete genome
Sequence ID: ref|NC_000932.1| Length: 154478 Number of Matches: 2
Range 1: 106170 to 106583 Genbank Graphics

Score	Expect	Identities	Caps	Strand
288 bits(318)	1e-76	312/414(75%)	0/414(0%)	Plus/Minus

▼ Next Match ▲ Previous Match

Query 17 CTCCCTATCATCAATCACCACCTTCCTTAACCTTCGAACACTAAACAAACATCAACCC 76
Shjet 106583 CTCCCTGTATCAGGTACCAACTTCCTTAACCTTCGCGCACTGGGAGGCGTCAGCCC 106524

Query 77 CCATACATAATCTTACAACTTTACAAAAACCTATATTTTAATAAACCAATCACCACCAAC 136
Shjet 106523 CCATACATGGTCTTACGACTTTGCGGAGACCTTGTTTTTGGTAAACAGTCGCCCCGGCC 106464

Query 137 TAATCACTACACCCCTTTATaAAAAACACCCCTTCCTCCAAATTAACAACTATTT 196
Shjet 106463 TGGTCACTGCGACCCCTTTGTGAGGAGGCACCCCTTCCTCCGAGTTACGGGGCTATTT 106404

Query 197 TACCAAAATTCCTTaaaaaaTTATCTGACACCCCTAAATATTCTCTACCTACCCACCTA 256
Shjet 106403 TGGCGAGTTCTTTAGAGAGAGTTGTCTGCGCCCTAGGTATTCTCTACCTACCCACCTG 106344

Query 257 TATCAATTCAAATACAAATACCCCTTTTATTAATAATCAATCAAACTTTTCTTAAAAATA 316
Shjet 106343 TGTGCGTTTCGGGTACAGGTACCCCTTTGTGAAGGTCGTCGAGCTTTTCTGGGAGTA 106283

Query 317 TAACATAAATTAATTCACACCATACACCTTAATCTCAACATTAACTCAAAACATTTT 376
Shjet 106283 TAGCATGGGTACTTTCAGCGCCGTAGCGCTGGTACTCGAACATTGGCTCGGGCAITTT 106224

Query 377 CTCTACCCCTTCTTACCTTaaaaaaCAGGACACCTTACATCCTTAAACCAAT 430
Shjet 106223 CTCTACCCCTTCTTACCTTAAAAAACAGGACACCTTTCGTCCTTGAACCGAT 106170

图 2 引物 MSH6_P6F/MSH6_P6R3 扩增产物Blast 验证

Figure 2 Blast validation of PCR products amplified by primers MSH6_P6F/MSH6_P6R3

设计引物时,每个引物均设计成 3~6 对简并形式(表 2)。通过比较有效引物 and 无效引物,在我们成功扩增的 4 对引物中,发现并非所有可修饰位点全部简并是最佳的,其 3'端需要简并,尤其是 3'端的前 1/3 部分,然而其前 3 个碱基不能出现可修饰位点;其他位置的可修饰位点并无明显的规律,一般情况下非 5'端连续 3 个可修饰位点的碱基需要简并,同时连续可修饰位点应避开 3'端。

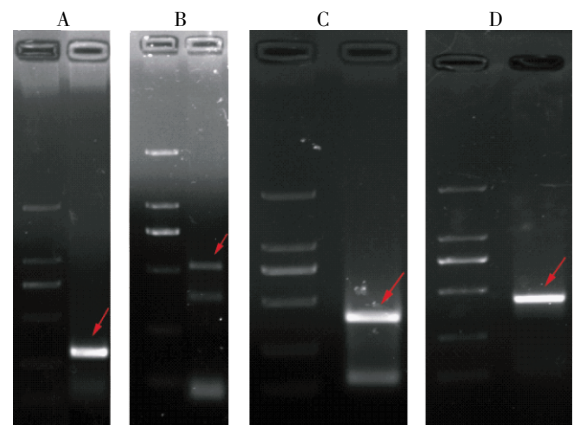
2.3 不同 Taq 酶对甲基化率的影响

本实验室对拟南芥错配修复基因的甲基化研究发现,不同的 Taq 酶对 PCR 扩增效果和甲基化率有明显的差别。因此本实验选用 3 种不同类型的 Taq 酶(表 3)对相同 DNA 的 *MLH1* 基因启动子进行扩增,结果如图 4 所示,发现 PrimeSTAR[®] HS 所得结果的甲基化率远大于其他两种 Taq 酶,而专为重亚硫酸盐修饰模板扩增开发的 EpiTaq[™] HS 比常规的 TaKaRaTaq 的甲基化率略高。该结果表明,高保真酶 PrimeSTAR[®] HS 由于其结果过高并不适合于甲基化研究,而 TaKaRaTaq 由于其酶能力所限,无法检测出目的片段内全部甲基化变异位点。

3 讨论

3.1 引物设计及优化在植物位点特异性甲基化研究中的重要性

随着分子生物学和生物技术的高速发展,对于一般生物科学研究而言,实验中使用的关键技术已不再是制约,而且各类仪器、技术服务以及试剂盒的开发



图中 DNA marker 为 Takara DL2000,片段从大到小分别为 2、1 kb 和 750、500、250bp;A 为 dMSH2-11F/dMSH2-5R 的 PCR 扩增产物;B 为 dMSH2b-7F/dMSH2b-4R 的 PCR 扩增产物;C 为 dMSH7-3F/dMSH7-2R 的 PCR 扩增产物;D 为 dMSH7b-4F/dMSH7b-2R 的 PCR 扩增产物

DNA markers used in figure are Takara DL2000;A showed the PCR product amplified by primers dMSH2-11F/dMSH2-5R;B showed the PCR product amplified by primers dMSH2b-7F/dMSH2b-4R;C showed the PCR product amplified by primers dMSH7-3F/dMSH7-2R;D showed the PCR product amplified by primers dMSH7b-4F/dMSH7b-2R

图 3 自设计长引物电泳验证

Figure 3 Electrophoresis validation of products amplified by 4 pairs of short, self-designed primers

极大地方便了科学研究并简化了实验过程。因此,实验和研究人员所面临的难题便是课题或实验的设计,以及方法或技术的选择和优化^[20]。对于植物位点特异性甲基化研究而言,其特异性位点的引物设计、选择和优化便是难点。

表 2 实验中自设计的甲基化长引物
Table 2 Self-designed long primers for methylation in this study

引物 Primer	序列 Sequence	长度 Size/bp	$T_m/^\circ\text{C}$	$3'\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
dMSH2-10F	GTTAG RRR AGTAAG RRRA ATATGAGAATTAATGGG RR TTG	40	64.1	-5.6
dMSH2-11F*	GTTAG TTT AGTAAG RRRA ATATGAGAATTAATGGG RR TTG	40	62.6	
dMSH2-12F	GTTAG TTT AGTAAG TTT AATATGAGAATTAATGGG RR TTG	40	61.1	
dMSH2-4R	TCCY YAA YCTT Y TTCT Y TCCTCYAAATTACCC TCC	36	65.5	-7.3
dMSH2-5R*	TCCY YAA ACTTAT TCT ATTCCTCYAAATTACCC TCC	36	63.2	
dMSH2b-5F	GTAT R ATGGGTTTGT R AGGTTGG R TGTAT R TRATAA	36	62.6	-4.5
dMSH2b-6F	GTAT T ATGGGTTTGT R AGGTTGG R TGTAT R TRATAA	36	62.1	
dMSH2b-7F*	GTAT R ATGGGTTTGT T AGGTTGG T TGTAT R TRATAA	36	61.5	
dMSH2b-2R	CATAT Y YCTTACT Y YCTAAC Y ACACCTACCATT	36	63.8	-6.2
dMSH2b-3R	CATAT TAA ACTTACT Y YCTAAC Y ACACCTACCATT	36	62.1	
dMSH2b-4R*	CATAT TAA ACTTACT AA CTAAC Y ACACCTACCATT	36	60.4	
dMSH7-1F	GGGTTAG RR GA ARR GAAT ARR AATG RRT GATTG ART RGTGG	42	67.0	-6.8
dMSH7-2F	GGGTTAG TT GA ATT GAAT ARR AATG RRT GATTG ART RGTGG	42	65.0	
dMSH7-3F*	GGGTTAG T GAAT T GAAT T TAATGTTGATTG ART RGTGG	42	63.1	
dMSH7-1R	AA AYCYTCY CCT TTAYCAT CCC CTCCTTCACATTA	36	65.5	-5.0
dMSH7-2R*	AA ACYTCY CCT TTAYCAT CCC CTCCTTCACATTA	36	64.9	
dMSH7-3R	AA AACATC ACCT TTAYCAT CCC CTCCTTCACATTA	36	63.8	
dMSH7b-1F	RR TGGGTAT RT G RT RGG R AT R CTRGATGAAT	31	63.4	-5.7
dMSH7b-2F	TT TGGGTAT TT G T TRGG R AT R CTRGATGAAT	31	60.7	
dMSH7b-3F	TT TGGGTAT TT G TT TRGG R AT R CTRGATGAAT	31	60.1	
dMSH7b-4F*	TT TGGGTAT TT G TT GGTAT R CTRGATGAAT	31	59.4	
dMSH7b-1R	ATCA Y YCAT Y YTTATTC Y YTC Y YCTAACCC	31	62.0	-7.1
dMSH7b-2R*	ATCA AA ACAT TA ATATTC Y YTC Y YCTAACCC	31	59.4	
dMSH7b-3R	ATCA AA ACAT TA ATATTC AA TC Y YCTAACCC	31	58.1	

注: * 号表示有效引物;加粗且斜体的碱基表示是可修饰位点;R 表示 A 或 G;Y 表示 C 或 T。

Note: * stand for effective primers; bold and italic bases for modified locus; R for A or G; Y for C or T.

表 3 本研究所选用的 Taq 酶
Table 3 Taq polymerase used in this study

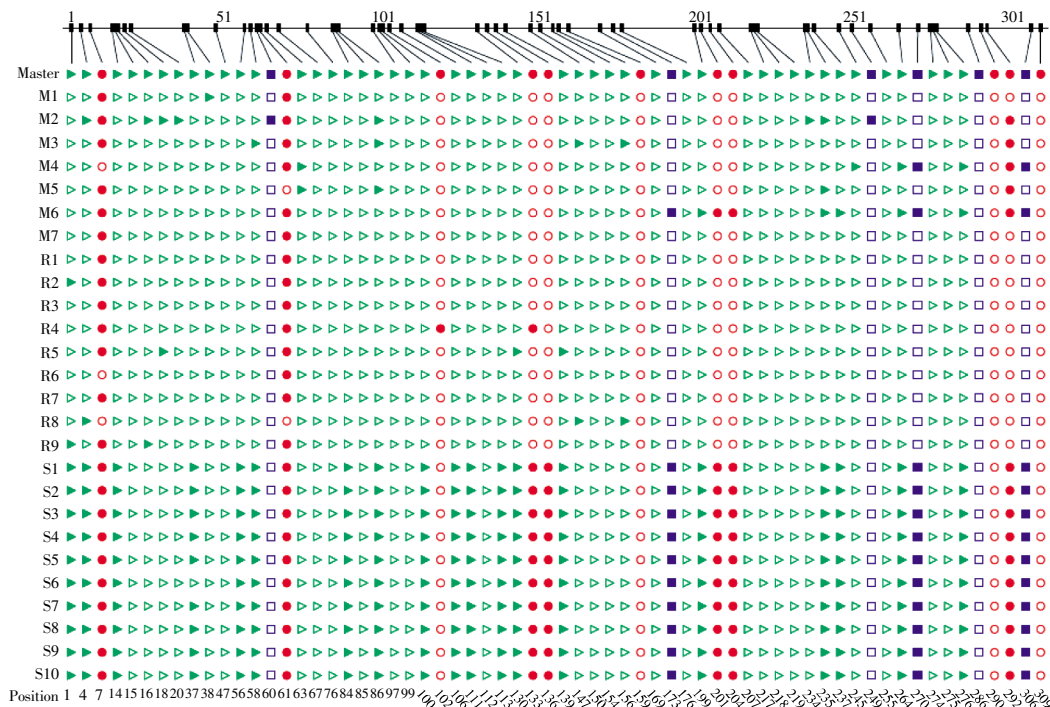
Taq 酶 Taq polymerase	生产商 Manufactory	特性 Characteristics
TaKaRaEpi Taq TM HS	宝生物工程(大连)	专用于重亚硫酸盐修饰后含有尿嘧啶的模板 DNA 的 PCR 扩增
TaKaRaTaq	宝生物工程(大连)	常规 Taq 酶,用于一般 PCR
Prime STAR [®] HS	宝生物工程(大连)	兼具高保真性和高扩增效率,有极强的 3'→5'核酸外切酶活性

一方面,由于植物基因组 CG 含量较高^[19],导致经过重亚硫酸盐修饰后基因组重复序列过多,引物结合模板的特异性下降,而且胞嘧啶过多也给设计引物造成较大的困难,因为在指定的区域或范围内,很难找到较优异的引物。另一方面,由于 PCR 扩增的模板是修饰过的,与原 DNA 差异较大,网上并没有相关的数据库,也无法对所设计的引物进行特异性分析(Primer-blast),只有通过 PCR 实践检测验证。这些原

因均极大地阻碍了实验的进度和研究的开展,导致即使拥有高效的 DNA 提取、修饰及纯化的试剂盒,实验却仍然停滞不前。因此,在植物位点特异性甲基化研究中,引物的设计和优化尤为重要。

3.2 植物位点特异性甲基化的引物设计

本实验室主要研究 Cd 胁迫下拟南芥的遗传损伤^[9-10, 21-22],其中包括对错配修复基因表观遗传损伤的研究,并为此设计了大量的引物。然而经 PCR 扩增检验的结果并不理想,约 20 余对短引物(17~30 bp)中,仅有 3 对成功扩增(表 1)。通过整理引物并总结经验,我们发现主要原因在于引物的特异性上,由于引物长度较短,修饰的 DNA 重复序列高,导致引物的非特异性极高,这便使目的片段很难扩增。然而根据这些所设计引物,我们对有效引物和失败引物进行了比较分析,得到了一些有用的经验。我们发现正向引物的长度和 T_m 需要大于反向引物,且 3'端 ΔG 也要保持较



图中 Master 为参考序列;M1~M7 为使用 EpiTaq™ HS 扩增目的片段经克隆测序所得甲基化结果;R1~R9 为使用 TaKaRaTaq 所得结果;S1~S10 为使用 PrimeSTAR® HS 所得结果。实心圆代表 CpG 位点发生甲基化,空心圆代表未发生甲基化;实心方块代表 CHG 位点发生甲基化,空心方块代表未发生甲基化;实心三角代表 CHH 位点发生甲基化,空心三角代表未发生甲基化

Master in figure stands for reference sequence; M1~M7 are clone methylation profiles using EpiTaq™ HS; R1~R9 are profiles by using TaKaRaTaq; S1~S10 are profiles by using PrimeSTAR® HS. Solid circles stand for methylated cytosines of CpG loci, hollow circles for unmethylated; solid squares stand for methylated cytosines of CHG loci, hollow square for unmethylated; solid triangles stand for methylated cytosines of CHH loci, hollow triangles for unmethylated cytosines

图 4 3 种 Taq 酶扩增修饰后拟南芥 *MLH1* 基因启动子的甲基化结果

Figure 4 Methylation profile of Arabidopsis *MLH1* promoter amplified by 3 Taq polymerase after sodium bisulfite modification

低($-6.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 左右),这样引物的成功率会显著提升(表 1)。该现象是因为甲基化引物 PCR 与常规 PCR 有一重要区别,便是在实际扩增过程中只利用了一条链作为模板,即单链扩增,而与该模板链对应的引物便是反向引物,故在设计引物时,首先需考虑的便是让反向引物更易退火且特异性较高。反向引物长度短于正向引物,便会先于正向引物退火结合到模板上;同时因 3'端 ΔG 较低,会让引物退火后快速有效的引发延伸反应,而正向引物尽管 T_m 高于反向引物,但因引物长度大导致其引物特异性略高,且没有对应模板,不易退火。当反向引物扩增后,正向引物的高 T_m 会迅速让其退火反向引物扩增链,并保持高于反向引物的退火能力及延伸能力,这样可尽量保持两条引物的同步扩增,又不至于单条链过于富集造成 PCR 效率下降。

在成功扩增产物的引物中,经测序比对验证仍有非目的片段的扩增(图 2),因此短引物用作甲基化引

物依然存在弊端。为此本实验室又设计了大量长引物(31~50 bp)。根据表 2 发现,除不同简并形式外,长引物的成功率可在 50%以上,其中设计引物原则基本与短引物保持一致,即反向引物更易于结合模板。另外,引物除 5'端外要保持较低 ΔG ,即在引物内部稳定性上(Internal stability)呈“W”型,并且不能存在 ΔG 过低的发夹或二聚体。另一方面,由于引物过长必然导致覆盖较多的可修饰位点,引物当中的可变碱基需要简并,然而不同的简并形式会对 PCR 扩增造成直接影响。根据经验我们发现 3'端若有可修饰位点则必须简并,但该状况越少越好,因为它直接影响引物延伸反应的引发,但是 3'末端的前 3 个碱基不允许存在可修饰位点。另外,需要避免 2 个碱基以上的连续可修饰位点,且不应出现在 3'端,如含有则须简并。综上所述,虽然长引物依然存在一些不可控因素,但与短引物相比,其引物设计成功率已得到极大提升,并且通过选择适合的 PCR 程序和 Taq 酶也可在一定程度上

提高其成功率。

3.3 PCR 程序和 Taq 酶的选择

图1结果表明,短引物扩增所使用的PCR程序是Touch-down模式。在该方式下,设定的起始退火温度高于反向引物的 T_m ,使反向引物能有较高的特异性,而该温度低于正向引物 T_m ,可在反向引物延伸后迅速以其为模板进行扩增。随着前几轮扩增,使有义模板富集,此时退火温度已下降,可增加PCR扩增的整体效率以便得到较高含量的目的片段。但是,因为退火温度只是影响PCR效率的次要因素,如果引物特异性差,PCR程序如何优化也于事无补,所以长引物的选用成必然趋势。

表2和图3结果表明,通过多种方式的尝试和验证,最终发现长引物的PCR程序如下:95℃变性30s,55℃退火15~30s,60℃延伸2~3min。在该PCR程序中,选用长退火或延伸时间会造成PCR总时间过长而引起酶活力下降,因而需要根据不同Taq酶的扩增能力(主要指单位时间扩增片段长度)和活力的持久度,决定退火及延伸时间,此PCR条件与Henderson等^[18]所用方法相似。该PCR条件的优点是,对于 T_m 较高的长引物,55℃会让引物迅速地在高特异性和稳定性的位点上退火,然后在60℃进行边退火边延伸,这样可使一些低稳定性和可修饰的位点继续退火,也可进行较稳定的延伸。然而缺点便是PCR程序时间过长且对酶的性能要求较高,因为60℃并不是Taq最佳温度,在该温度下其延伸效率不足72℃的一半,致使延伸时间过长,而普通的Taq在2h后性能会明显下降,最终影响PCR的效果。

图4结果表明,在Taq酶的选择上,PrimeSTAR[®] HS并不适合甲基化PCR,因为所有的高保真酶都含有3'→5'核酸外切酶活性,而尿嘧啶与胸腺嘧啶相比少一个甲基,虽然在碱基配对时也可形成两个氢键,但形成双链螺旋结构时并不稳定,可能会影响高保真酶的扩增,甚至会误认其是错配而将其外切掉,导致已修饰位点不易扩增而含甲基化位点的DNA可正常延伸,最终引起结果中高甲基化的极端现象。而且在部分品牌高保真酶的说明书上,虽然没有强调却有提示“不宜使用含dUTP或尿嘧啶的模板和引物”。因此,甲基化引物的PCR更注重对Taq酶的扩增能力。相对于普通的TaKaRaTaq,由于EpiTaq[™] HS专为修饰DNA设计,其扩增能力得到加强,且在保真性能上不依赖外切酶活性,因此其结果优于TaKaRaTaq。

4 结论

(1)17~30bp短引物使用Touch-down程序PCR效果较好,但无法避免其特异性低的弊端;31~50bp长引物可解决该问题,并以55℃退火60℃延伸PCR程序扩增,成功率最高,其中反向引物的长度及 T_m 低于正向引物较佳。

(2)高保真酶因其外切酶活性所致的高甲基化现象,并不适宜用于甲基化研究,而EpiTaq[™] HS由于专为修饰模板PCR设计,其有较强的扩增含尿嘧啶模板及不依赖3'→5'外切酶活性的保真能力,在实际应用中效果最佳。

参考文献:

- [1] Bird A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation[J]. *Nature*, 1986, 321(6067):209-213.
- [2] Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(3):223-231.
- [3] Richards E. J. DNA methylation and plant development[J]. *Trends Genet*, 1997, 13(8):319-323.
- [4] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis[J]. *Cell*, 2006, 126(6):1189-1201.
- [5] Wagner I, Capesius I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1981, 654(1):52-56.
- [6] Johnston J W, Harding K, Bremner D H, et al. HPLC analysis of plant DNA methylation: A study of critical methodological factors[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(9):844-853.
- [7] Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 253(6):703-710.
- [8] Gonzalgo M L, Liang G, Spruck C H, et al. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(4):594-599.
- [9] 王鹤潼,何蕾,宋杰,等.改进MSAP-PCR技术应用于Cd胁迫下拟南芥DNA甲基化分析[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(8):1618-1624.
WANG He-tong, HE Lei, SONG Jie, et al. Assay of DNA methylation in *Arabidopsis* under Cd stress using improved MSAP-PCR technique[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(8):1618-1624.
- [10] Wang H, He L, Song J, et al. Cadmium-induced genomic instability in *Arabidopsis*: Molecular toxicological biomarkers for early diagnosis of cadmium stress[J]. *Chemosphere*, 2016, 150:258-265.
- [11] Xiong Z, Laird P W. COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(12):2532-2534.
- [12] 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 U S A*, 1996, 93(18):9821-9826.
- [13] Sadri R, Hornsby P J. Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(24):5058-5059.
- [14] Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. *Nature*, 2008, 452(7184):215-219.
- [15] Lister R, O'Malley R C, Tonti-Filippini J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2008, 133(3):523-536.
- [16] 李利红, 仪慧兰, 王艺雯, 等. 二氧化硫胁迫诱导拟南芥 NIT2 基因 DNA 甲基化修饰[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(4):685-690.
- LI Li-hong, YI Hui-lan, WANG Yi-wen, et al. Sulfur dioxide induces DNA methylation alteration of a gene encoding nitrilase 2 protein in *Arabidopsis* plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(4):685-690.
- [17] 王艺雯, 李利红, 仪慧兰. H₂O₂ 诱导拟南芥 NIT2 基因甲基化特征与转录水平改变[J]. 环境科学学报, 2015, 35(1):324-328.
- WANG Yi-wen, LI Li-hong, YI Hui-lan. DNA methylation alterations and gene transcription changes of NIT2 in *Arabidopsis* plants induced by hydrogen peroxide[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(1):324-328.
- [18] Henderson I R, Chan S R, Cao X, et al. Accurate sodium bisulfite sequencing in plants[J]. *Epigenetics*, 2010, 5(1):47-49.
- [19] 侯雷平, 李梅兰. DNA 甲基化与植物的生长发育[J]. 植物生理学报, 2001, 37(6):584-588.
- HOU Lei-ping, LI Mei-lan. DNA methylation and plant growth and development[J]. *Plant Physiology Journal*, 2001, 37(6):584-588.
- [20] Fulnecek J, Kovarik A. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism(MSAP) profiles?[J]. *Bmc Genet*, 2014, 15:2.
- [21] Liu W, Sun L, Zhong M, et al. Cadmium-induced DNA damage and mutations in *Arabidopsis* plantlet shoots identified by DNA fingerprinting[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(9):1048-1055.
- [22] Liu W, Yang Y S, Li P J, et al. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices[J]. *J Hazard Mater*, 2009, 161(2/3):878-883.