

应用 MS-RDA 筛选胃癌甲基化差异片段

廖爱军, 苏琦, 王珣, 曾斌, 石巍

廖爱军, 南华大学肿瘤研究所, 南华大学附属第一医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

苏琦, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001

王珣, 曾斌, 石巍, 南华大学附属第一医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

廖爱军, 女, 1964-08-08生, 湖南省宁乡县, 汉族, 2004年南华大学肿瘤研究所病理学博士生, 教授, 主要从事胃癌病因、发病机制及防治的研究。

湖南省科研计划重大专项, No. 04SK1004

湖南省教育厅科学研究资助项目, No. 99C195

通讯作者: 苏琦, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学肿瘤研究所. suqi1@hotmail.com

电话: 0734-8279064 传真: 0734-8281547

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-11-25

Isolation of differentially methylated DNA sequences of gastric cancer by methylation-sensitive representational difference analysis

Ai-Jun Liao, Qi Su, Xun Wang, Bin Zeng, Wei Shi

Ai-Jun Liao, Institute of Cancer Research, Nanhua University; Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Qi Su, Institute of Cancer Research, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Xun Wang, Bin Zeng, Wei Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Supported by the Key Foundation of Science and Technology Program of Hunan Province, No. 04SK1004, and the Scientific Research Foundation from Education Department of Hunan Province, No. 99C195

Correspondence to: Dr. Qi Su, Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province China. suqi1@hotmail.com

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-11-25

Abstract

AIM: To isolate the differentially methylated DNA sequences between gastric cancer and normal gastric mucosa.

METHODS: The differentially methylated DNA sequences between gastric cancer and normal gastric mucosa were isolated by methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). Similarities between the separated fragments and the human genomic DNA were analyzed with Building Loads Analysis and Sys-

tem Thermodynamics (BLAST) program.

RESULTS: Three differentially methylated DNA sequences, CRS1308, CRS1309, and CRS1310, were obtained. CRS1309 and CRS1310 had been accepted by GenBank. CRS1309 was highly similar to the eleventh exon of LOC440683 (98%), 3' end of LOC440887 (99%), and promoter and exon region of DRD5 (94%). CRS1310 was consistent (98%) with a CpG island, in ribosomal RNA, isolated from colorectal cancer by Minoru Toyota in 1999.

CONCLUSION: The methylation degree is different between gastric cancer and normal gastric mucosa. The differentially methylated DNA sequences can be isolated effectively by MS-RDA.

Key Words: Gastric cancer; DNA methylation; Differential sequences; MS-RDA

Liao AJ, Su Q, Wang X, Zeng B, Shi W. Isolation of differentially methylated DNA sequences of gastric cancer by methylation-sensitive representational difference analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):365-369

摘要

目的: 应用甲基化敏感性代表性差异分析法(methylation-sensitive representational difference analysis, MS-RDA)筛选胃癌和正常胃组织间甲基化差异DNA片段。

方法: 通过MS-RDA筛选胃癌和正常胃组织间DNA甲基化差异片段, 经克隆、测序后进行生物信息学分析。

结果: 获得3个甲基化差异片段, 分别为 CRS1308, CRS1309, CRS1310序列, 其中 CRS1309和CRS1310已被GenBank收录, 登陆号分别为AY887106和AY887107, CRS1309序列与LOC440683基因第11外显子、LOC440887基因的3'端, DRD5基因启动子和外显子区域均有很高的相似性(分别为98%, 99%, 94%), CRS1310序列与1999年Minoru Toyota在人类结肠癌中分离出的核糖体RNA上的甲基化差异性CpG岛有很高的相似性(98%)。

■背景资料

研究胃癌组织与正常胃组织基因的甲基化分布的差异, 不仅可探讨甲基化在胃癌发生中的作用, 同时也可筛选出与胃癌发生有关的新的相关基因, 为胃癌研究提供新的指标。MS-RDA通过采用甲基化敏感性四碱基限制性内切酶消化基因组DNA, 按甲基化分布的差异最大限度降低了基因组DNA的复杂性, 使整个基因组较短的酶切片段得到了有效富集。

■创新盘点

从本研究结果表明, MS-RDA能有效分离两种组织的差异甲基化DNA片段, 是研究胃癌中DNA甲基化作用, 筛选新的抑癌基因的一种较好的方法。

结论: 胃癌和正常胃组织间DNA甲基化存在差异, MS-RDA可有效分析这两种不同组织间甲基化的差异, 筛选出有意义的甲基化差异片段。

关键词: 胃癌; DNA甲基化; 差异片段; MS-RDA

廖爱军, 苏琦, 王珣, 曾斌, 石巍. 应用MS-RDA筛选胃癌甲基化差异片段. 世界华人消化杂志 2006;14(4):365-369
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/365.asp

0 引言

1993年Lisitsyn *et al*^[1]在消减杂交的基础上发展了一种代表性差异分析(RDA)的方法, 该方法通过限制性内切酶消化基因组DNA, 降低基因组的复杂性, 经多轮消减杂交结合PCR后使差异性的靶基因片段得到大量的富集, 后来, Ushijima *et al*^[2]采用甲基化敏感性限制性内切酶消化基因组DNA, 而在RDA的基础上形成了MS-RDA(甲基化敏感性代表性差异分析), 该方法被用来筛选肿瘤中发生异常甲基化的基因. 我们运用MS-RDA方法筛选胃癌与正常胃组织间DNA甲基化差异片段, 为进一步研究胃癌新的相关抑癌基因提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌患者胃窦部肿瘤边缘黏膜及其癌旁(>5 cm)正常胃黏膜各1-3 g, 用锡箔、纱布包好置于液氮中保存, 组织标本术后经病理检查结果证实。

1.2 方法 取100 mg组织匀浆, 加入1.5 mL DNA提取液及胰RNA酶(Fermentas公司)(10 g/L)20 μ L, 混匀, 37℃孵育1 h, 加入蛋白酶K(Fermentas公司)(20 g/L)40 μ L, 上下颠倒混匀, 37℃消化3 h后溶液变得清亮, 使用经典的酚氯仿抽提法提取基因组DNA. 在10 μ g基因组DNA中加入10 μ L甲基化敏感性限制性内切酶Hpa II(Fermentas公司)(10 MU/L), 混匀稍离心后, 37℃酶切20 h. 未甲基化的-CCGG-位点被切割成黏性末端, 已甲基化的位点未被切割. 在酶切产物中加入RHpa II₂₄和RHpa II₁₁接头(表1), 50℃孵育1 min, 然后以1 min降1℃的速度逐步冷却到10℃, 使其自身退火形成RHpa II_{24/11}接头, 在T₄ DNA连接酶(TaKaRa公司)作用下, 16℃连接14-16 h^[1]. 以上述连接接头后, 产物接头中的RHpa II₂₄为引物在LA Taq酶(TaKaRa公司)作用下进行PCR扩增, 95℃变性1 min, 72℃退火3 min, 26个循环后72℃延伸10 min, 使带有R接

表 1 MS-RDA所使用的接头及序列

接头名称	序列
RHpa II ₂₄	5'-AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAC-3'
RHpa II ₁₁	5'-CGG TCG GTG AG-3'
JHpa II ₂₄	5'-ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA AAC-3'
JHpa II ₁₁	5'-CGG TTT CAT GG-3'
NHpa II ₂₄	5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAC-3'
NHpa II ₁₁	5'-CGG TCC CTC GG-3'
SHpa II ₂₄	5'-ACT TCT ACG GCT GAA TTC CGC CAC-3'
SHpa II ₁₁	5'-CGG TGT CGG AAT-3'

头的DNA片段即扩增子得到有效富集^[2], 10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察扩增子。

1.2.1 消减杂交 胃癌扩增子和胃正常扩增子在同裂酶Msp I酶(Fermentas公司)酶切作用下切除R接头, 酶切产物用DNA片段纯化试剂盒(TaKaRa公司)纯化以去除混于其中的R接头. 将胃癌扩增子去R接头纯化后的产物连上JHpa II_{24/11}接头(表1)作为检测子, 胃正常扩增子去R接头产物作为驱赶子进行的杂交称为正交, 反之称为反交, 检测子和驱赶子按1:40的比例混合沉淀后溶于4 μ L杂交缓冲液, 然后96℃变性10 min, 67℃杂交24 h, 杂交反应完成后, 取1/10体积杂交产物为模板, 以JHpa II₂₄为引物进行PCR反应, 13个循环后加入Mung Bean Nuclease(TaKaRa公司)消化单链核苷酸, 酚/氯仿抽提后继续PCR反应20-30个循环^[2]. 将上述第1轮正交和反交的产物用Msp I消化, 经DNA片段纯化试剂盒纯化后, 依次换以N/S接头, J接头分别进行随后的第2轮, 第3轮杂交和扩增. 检测子和驱赶子的比例由第1轮的1:40分别改为1:400, 1:4 000^[3], 获得胃癌和正常胃组织间差异甲基化DNA片段(图1)。

1.2.2 克隆测序及相似性分析 将最终的消减杂交产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪下将目的条带切胶, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa公司)回收后与pGEM-T载体(Promega公司)在4℃下连接12 h, 将连接产物加入高效感受态制备试剂盒(Fermentas公司)制备的JM109感受态细菌进行转化复苏后, 将菌液涂布于含有氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37℃培养箱中培养14 h, 挑取阳性克隆, 在LB液体培养基中37℃摇菌8 h, 用碱法提取质粒DNA, 经PCR法鉴定目的片段已转化到细菌质粒中, 将菌液送TaKaRa公司测序, 测序结果经BLAST系统进行相似性分析。

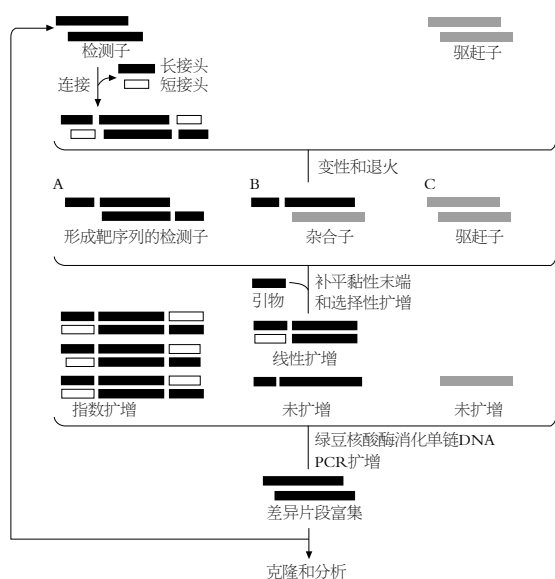


图1 MS-RDA实验策略示意图。

2 结果

2.1 基因组DNA扩增子及甲基化差异片段 胃癌组织和正常胃组织基因组DNA的Hpa II酶切产物加RHpa II_{24/11}接头, 经PCR扩增有效富集的扩增子(图2)。扩增子在200-1 000 bp之间为明亮的弥散的条带。将胃癌组织作为检测子, 胃正常组织作为驱赶子经过3轮正交反应后便可在400 bp左右见1条清晰的差异性条带(图3)。以胃正常组织作为检测子, 胃癌组织作为驱赶子进行2轮反交后可在400 bp左右及200-300 bp间见2条明亮清晰的差异条带(图4)。

2.2 克隆测序及BLAST分析 正交和反交后的3条甲基化差异DNA片段经pGEM-T克隆后, 分别挑取阳性克隆进行序列测通分析。其中正交的1条差异片段CRS1308的测序结果不理想, 存在较多的误读和失读, 考虑为GC含量丰富, 模板存在复杂的二级结构导致测序时峰值叠加, 测序仪无法准确识别, 表2中的相关数据仅供参考。反交的2条差异片段CRS1309和CRS1310已被GenBank收录, 登陆号分别为AY887106和AY887107, 经BLAST分析后发现, 其中AY887106序列与1q21.1的LOC440683基因第11外显子有98%的相似性, 与2p11.1的LOC440887基因的3'端有99%的相似性, 与4p16.1位置的DRD5基因的启动子和外显子区域有94%的相似性, AY887106序列与LOC440887基因、LOC440683基因和DRD5基因的位置关系如图5。AY887107序列位于核糖体RNA上, 与1999年Toyota *et al*^[4]在人类结肠癌中分离出的甲基化差异性CpG岛有98%的相似性。BLAST分析结果归

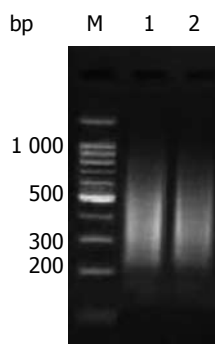


图2 胃癌组织和正常胃组织的扩增子。M: DNA marker; 1: 胃癌组织扩增子; 2: 正常胃组织扩增子。

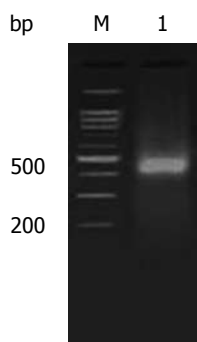


图3 3轮消减杂交后正交结果。M: DNA marker; 1: 位于400 bp左右的差异片段。

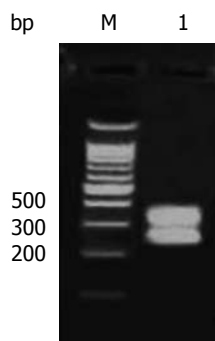


图4 2轮消减杂交后反交结果。M: DNA marker; 1: 分别位于400 bp左右和200-300 bp之间的2条差异片段。

纳为表2。

3 讨论

DNA甲基化通过影响基因转录、促进基因突变、增加染色体结构的不稳定性等多方面机制促进胃癌的发生、发展, 是表遗传学修饰的一种重要方式, 研究胃癌组织与正常胃组织基因的甲基化分布的差异, 不仅可探讨甲基化在胃癌发生中的作用, 同时也可筛选出与胃癌发生有关的新的相关基因, 为胃癌研究提供新的指标。早期使用Southern杂交和限制性标志的基因扫描(restriction landmark genomic scanning)也能确定

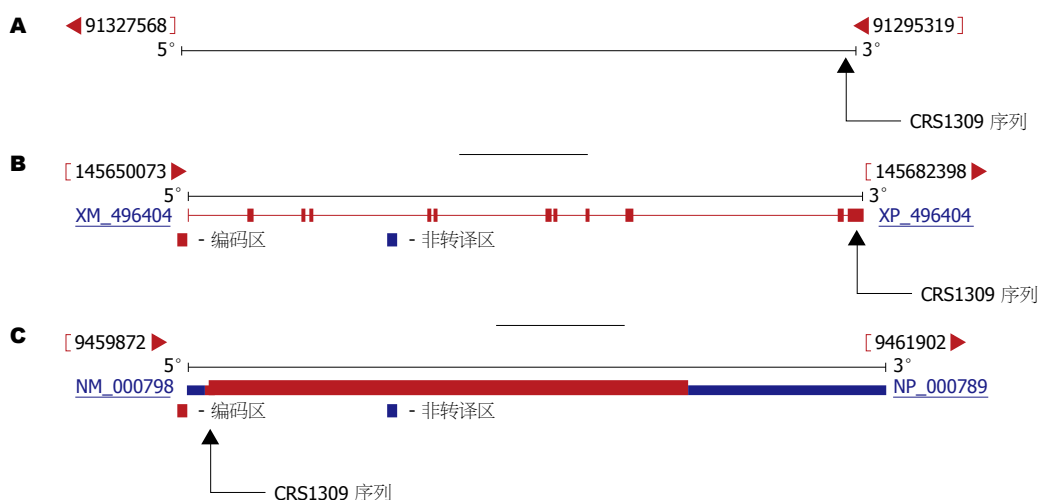


图 5 CRS1309序列与LOC440887 (A) 基因LOC440683基因 (B) 和DRD5基因 (C) 结构位置关系.

表 2 MS-RDA分析所获得的差异甲基化片段的特征

片段	筛选 (次数)	长度 (bp)	GC (%)	CG/GC	相似性			
					染色体定位	S	E	相似率 (%)
CRS1308	2	431	46.6	0.653 8	18q21.1-2	272	1e-69	86
CRS1309 (AY887106)	2	264	66.3	0.700 0	2p11.1	521	e-145	99
					1q21.1	498	e-138	98
					4p16.1	435	e-119	94
CRS1310 (AY887107)	2	395	50.6	0.928 6	8q13.3	745	0	98

异常甲基化基因, 但是前者仅局限于已知基因, 后者则存在操作复杂以及分离得到的基因难以克隆的缺点^[5]. Ushijima *et al*^[12]创建MS-RDA的同时也成功的筛选出了小鼠肝肿瘤中差异性甲基化片段. MS-RDA采用甲基化敏感性四碱基限制性内切酶消化基因组DNA, 可按甲基化分布的差异最大限度降低基因组DNA的复杂性后^[3]酶切产物连接R*Hpa* II_{24/11}接头进行PCR, 使整个基因组较短的酶切片段有效富集. 由于长片段难以经PCR扩增, 而短片段扩增效率高, 这就为随后的消减杂交的效率打下了基础, 同时将“检测子”和“驱赶子”两者之间的差异转化为限制性内切酶位点之间的差异^[1], 我们得到的扩增子是位于200-1 000 bp之间的弥散条带. 将“检测子”和“驱赶子”进行多轮消减杂交结合PCR扩增, 其中的靶序列即差异甲基化片段为同聚体, 两端均有接头成指数扩增, 而“驱赶子”和“检测子”相同序列形成的异源二聚体因只有单链接头只能成线性扩增, 这样二者间的相同序列被彻底抵消, 从而使“驱赶子”中缺乏而存在于“检测子”中的甲基化差异片段呈指数扩增而得到有效的富集, 因此MS-RDA中“驱赶

子”和“检测子”间的差异比较不是酶切片段长度的比较而是两者间甲基化差异信息的比较, 因而可有效的筛选出甲基化差异片段. MS-RDA的实验方法较为繁复, 费用较高, 我们无法进行大样本量的筛选, 仅采用一例标本进行研究, 目的是希望通过该实验为胃癌发病机制研究提供一个新的研究靶点, 为后续研究提供一个方向和平台. 我们采用的标本为同一个体的胃癌组织及其癌旁正常组织, 可排除由于个体差异及其他干扰因素而导致的假阳性结果, 因此我们筛选出的片段可以反映该个体在胃癌发展过程中相关基因甲基化的差异. 我们从GenBank提供的信息显示, 与AY887106序列高度相关的LOC440683基因和LOC440887基因都是目前研究甚少的新基因, LOC440683基因的最新信息更新认为其可能为多巴胺受体D5基因的假基因, 是物种进化过程中的产物, LOC440887基因被认为可能与髓细胞/淋巴细胞或多系混合性白血病有关, 编码ALR(急性淋巴母细胞性白血病[ALL]-1相关)样蛋白, 并与位于染色体7q36上的MLL3基因具有密切的相关性. Tan *et al*^[6]发现在髓性白血病中发现MLL3基因所在的染色

体区域频繁缺失, 认为MLL3基因的缺失在恶性白血病的发生发展中起着重要的作用. 2002年, Ruault *et al*^[7]发现1, 2, 13和21号染色体的着丝粒部位存在MLL3基因的部分拷贝, 而LOC440887基因正是位于2号染色体的着丝粒部位, 很可能为其部分拷贝. 我们已在NCBI的网站上对MLL3基因进行了Digital Northern分析, 结果认为MLL3基因在人胃组织中有表达, 并在胃癌及正常胃组织间存在一定的表达差异, 我们目前正在进行相关的实验室研究. AY887107序列位于核糖体RNA上, 与1999年Toyota *et al*^[4]在人类结肠癌中分离出的甲基化差异性CpG岛有98%的相似性, 进一步表明该位点在胃肠道肿瘤中较易发生甲基化.

MS-RDA由于周期较短、富集效率高且假阳性低的特点而广泛的应用于基因筛选和克隆方面. 2001年, Takai *et al*^[8]应用MS-RDA对两种肺癌细胞株EBC-1和LK-2中异常甲基化基因筛选发现HTR1B基因沉默以及EDN1基因的低表达. 2003年, Miyamoto *et al*^[9]应用MS-RDA发现人类结肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌中3-OST-2基因的沉默均与甲基化相关. 2004年, Hagihara *et al*^[10]应用MS-RDA在人类胰腺癌中筛选出111个甲基化差异片段, 其中35个位于已知基因的5'区域. 但是MS-RDA同时也存在步骤繁多, 作为“检测子”和“驱赶子”样本要求具有高度同源性, 最后富集的片段小于1 kb的缺点, 有可能使部分信息丢失, 但从本研究结果表明, MS-RDA能有效分离两种组织的差异甲基化DNA片段, 是研究胃癌中DNA甲基化作用, 筛选新的抑癌基因的一种较好的方法.

4 参考文献

- 1 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*

- 1993; 259: 946-951
- 2 Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T, Nagao M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2284-2289
- 3 Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5640-5648
- 4 Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 2307-2312
- 5 Parkes V, Modha N, Ulrich JM, Jones T, Francis GE. DNA-protein interaction sites in differentiating cells. II. A subset of alphoid repetitive sequences with retinoic acid induced protein attachment and an unusual purine-pyrimidine 'signature'. *Exp Hematol* 1996; 24: 568-579
- 6 Tan YC, Chow VT. Novel human HALR (MLL3) gene encodes a protein homologous to ALR and to ALL-1 involved in leukemia, and maps to chromosome 7q36 associated with leukemia and developmental defects. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 454-469
- 7 Ruault M, Brun ME, Ventura M, Roizes G, De Sario A. MLL3, a new human member of the TRX/MLL gene family, maps to 7q36, a chromosome region frequently deleted in myeloid leukaemia. *Gene* 2002; 284: 73-81
- 8 Takai D, Yagi Y, Wakazono K, Ohishi N, Morita Y, Sugimura T, Ushijima T. Silencing of HTR1B and reduced expression of EDN1 in human lung cancers, revealed by methylation-sensitive representational difference analysis. *Oncogene* 2001; 20: 7505-7513
- 9 Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 2003; 22: 274-280
- 10 Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 2004; 23: 8705-8710

■同行评价

本研究利用MS-RDA方法筛选胃癌甲基化差异片段, 方法先进, 研究设计合理, 充实了胃癌发生过程中基因变异的材料, 为胃癌的研究提供了新的指标.

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁