

· 论 著 ·

甲基化特异性 PCR 检测 PRAME 基因启动子 低甲基化 30 例及其临床应用*

朱照辉¹, 林江², 钱军^{1△}, 姚冬明³, 钱震¹, 王雅丽¹, 肖高飞²

(江苏大学附属人民医院:1. 血液科;2. 中心实验室;3. 检验科, 江苏 212002)

摘要:目的 建立实时定量甲基化特异性 PCR(RQ-MSP)法检测急性髓系白血病(AML)患者黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)基因低甲基化水平,初步评价其临床意义。方法 用亚硫酸氢盐修饰后的基因组 DNA 为模板,建立 EvaGreen 染料法 RQ-MSP 检测 PRAME 基因低甲基化水平方法,检测 18 例(对照组)和 30 例(AML 组)患者的骨髓单个核细胞中 PRAME 基因启动子低甲基化水平。结果 RQ-MSP 融解曲线呈单一峰,标准品 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^2$ copy/ μ L 重复性良好;AML 患者 PRAME 基因低甲基化水平(0.96~4 508.96,中位 772.42)明显高于对照组(0~100.00,中位 25.29),差异有统计学意义($P=0.002$)。结论 建立的 PRAME 基因低甲基化 RQ-MSP 法特异性、重复性和灵敏性良好,可用于 AML 初诊和病情监测。

关键词:甲基化特异性 PCR;基因;黑色素瘤优先表达抗原;低甲基化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.006

中图分类号:R730.45;R739.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3165-03

Methylation-specific PCR detection for hypomethylation in PRAME gene promoter of 30 cases and its clinical application*

ZHU Zhao-hui¹, LIN Jiang², QIAN Jun^{1△}, et al.

(1. Department of Hematology;2. Central Laboratory;3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Jiangsu 212002, China)

Abstract: Objective To establish and evaluate the method of real-time quantitative methylation-specific PCR(RQ-MSP) for detecting hypomethylation of PRAME gene promoter in the patients with acute myeloid leukemia(AML). **Methods** Genomic DNA modified by sodium bisulfite was used as a template. RQ-MSP with EvaGreen dye was established to detect the hypomethylation of PRAME promoter. The samples from 30 AML patients and 18 controls were detected. **Results** The melting curve showed a single peak. In repeated tests, maximal sensitivities of $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^2$ copy/ μ L were obtained. Preliminary studies have showed that the hypomethylation level of PRAME promoter was significantly higher in AML(0.96-4 508.96, median 772.42) than that in controls (0-100.00, median 25.29) ($P=0.002$). **Conclusion** The RQ-MSP for detecting hypomethylation of PRAME promoter was established with good specificity, reproducibility and sensitivity, which could be applied in the detection of samples at initial diagnosis and in monitoring the minimal residual disease of AML patients.

Key words: methylation-specific PCR; gene; preferentially expressed antigen of melanoma; Hypomethylation

黑色素瘤优先表达抗原(preferentially expressed antigen of melanoma, PRAME)是肿瘤相关抗原,在多种肿瘤细胞中高度表达,可作为一种肿瘤分子标志物用于微小残留病(minimal residual disease, MRD)监测^[1-2]。Christina 等^[3]研究发现,PRAME 基因启动子区低甲基化可能是其表达调控机制之一。本实验室建立了一种检测 PRAME 基因低甲基化的 EvaGreen 荧光染料实时定量甲基化特异性 PCR(RQ-MSP)法,并对急性髓系白血病(AML)患者进行了检测,证实该方法可用于 AML 患者初诊标本检测,并可用于随访标本 MRD 的监测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 18 例(对照组)骨髓标本,其中 11 例取自正常捐献者,7 例取自缺血性贫血(IDA)患者。30 例(AML 组)患者骨髓标本来自本院血液科住院患者,诊断按 FAB 标准分类。未甲基化阳性对照为重亚硫酸氢盐修饰的 AML 患者的骨髓 DNA,用去离子水作为阴性对照,甲基化阳性对照为经

甲基转移酶(M. SssI)处理后再行重亚硫酸氢盐修饰的正常人骨髓 DNA。

1.2 单个核细胞分离和基因组 DNA 制备 按本实验室常规方法提取骨髓单个核细胞;依据基因组 DNA 提取试剂盒(Gentra)和 DNA 修饰试剂盒(Chemicon 公司)操作指南提取基因组 DNA,进行 DNA 重亚硫酸氢盐修饰, -80 °C 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 定性 MSP 按参考文献[4]合成引物,PRAME 基因未甲基化(U)MSP 上游引物序列 5'-GTT GTA AGG ATG TTT TGA ATT GA-3',下游引物序列 5'-CCT ACA CCA CTA CCT AAA CCA TC-3',扩增片段 169 bp。参照基因 ALU 的上游引物序列 5'-TTA GGT ATA GTG GTT TAT ATT TGT AAT TTT AGT A-3',下游引物序列 5'-ATT AAC TAA ACT AAT CTT AAA CTC CTA ACC TCA-3',扩增片段 110 bp。

* 基金项目:江苏省医学重点人才资助项目(RC2007035);镇江市社会发展项目(SH2006032);江苏省卫生厅“科教兴卫工程”——苏州大学附属第一医院血液学学科开放课题基金项目(KF200944);江苏大学临床医学科技发展基金资助项目(JLY20080048)。△ 通讯作者:Email: qianjun0007@sina.com。

表 1 RQ-MSP 检测不同浓度 PRAME 基因与 ALU 基因质粒结果

基因	浓度	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	变异系数(%)
PRAME	5×10 ⁷	12.02	11.89	12.02	11.98	11.89	11.96	11.98	12.15	0.68
	5×10 ⁶	15.75	15.37	15.42	15.40	15.46	15.40	15.48	15.62	0.86
	5×10 ⁵	19.05	19.04	19.20	19.33	19.00	19.04	19.15	19.03	0.59
	5×10 ⁴	22.25	22.18	22.09	22.25	22.09	22.09	22.07	22.99	1.38
	5×10 ³	25.43	25.88	26.00	25.48	25.71	25.56	25.65	25.54	0.77
	5×10 ²	29.40	28.89	29.66	28.49	28.98	29.51	29.27	28.51	1.53
ALU	1×10 ⁸	11.36	11.49	11.84	11.58	11.46	11.40	11.58	12.08	2.10
	1×10 ⁷	14.97	14.80	14.67	15.09	15.04	15.27	15.30	15.02	1.41
	1×10 ⁶	18.38	18.60	18.50	18.70	18.71	18.71	19.02	18.56	1.02
	1×10 ⁵	22.20	22.31	21.69	22.06	21.76	21.91	21.89	22.14	0.99
	1×10 ⁴	25.44	25.57	25.19	26.34	25.60	25.60	25.65	25.98	1.36
	1×10 ³	29.21	29.25	28.72	29.26	29.10	28.81	29.11	29.04	0.69
	1×10 ²	32.28	32.57	32.11	32.20	31.65	32.60	31.52	32.25	1.21
10	33.02	33.11	33.93	32.95	35.27	33.01	33.52	32.88	2.43	

MSP 反应在 Icyler 梯度仪(伯乐公司)进行,25 μL 反应体系包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,2.5 mmol/L 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)2.0 μL、10 pmol/μL 引物 0.5 μL、1 u 热启动 Taq DNA 酶(Takara 公司,日本)、重亚硫酸氢盐修饰后的基因组 DNA 80 ng。反应条件为 95 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 共 40 个循环,72 °C 延伸 7 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳成像分析(Gene Genius 凝胶成像仪,Syngene 公司,英国)。

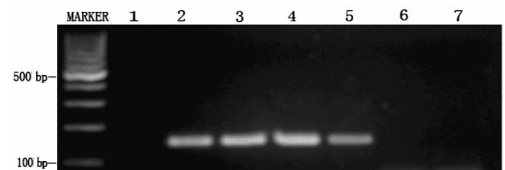
1.3.2 阳性模板制备 将 1 例 AML 患者的 MSP 扩增产物经 T4DNA 连接酶(Promega 公司)克隆入 PGEM-T 载体,扩增纯化重组载体、测序鉴定(上海基康),并将其定量,最后从 5×10⁷ copy/μL 开始进行 10 倍稀释,建立阳性模板梯度,4 °C 储存备用。

1.3.3 RQ-MSP PRAME 基因与 ALU 基因反应程序和反应条件相同。 25 μL 反应体系包含 DNA 80 ng、10×缓冲液 2.5 μL、dNTP(10 mmol/L)0.5 μL、MgCl₂(25 mmol/L)2.0 μL、10 pmol/μL 引物 2.0 μL(ALU 引物为 1.0 μL)、20×EvaGreen(BIOTIUM 公司)1.2 μL、50×ROX0.5 μL、Taq 酶 1.0 u(MBI 公司)。PCR 反应在 PE7300(美国 ABI 公司)扩增仪上进行。反应条件为预变性 95 °C 5 min,95 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 30 s 扩增 40 循环;扩增产物熔解曲线分析程序为 95 °C 15 s、40 °C 60 s、90 °C 15 s、60 °C 15 s。应用参照基因 ALU 计算 PRAME 基因启动子未甲基化水平的相对量,计算公式如下: $N_{PRAME} = (E_{PRAME})^{\Delta C_T^{PRAME(对照标本)}} / (E_{ALU})^{\Delta C_T^{ALU(对照标本)}}$,其中 E 为 PCR 扩增效率($E = 10^{-1/slope}$), ΔC_T 为对照标本与待测标本中 PRAME 或 ALU 基因扩增的循环阈值(C_T 值)的差异;对照选自 PRAME 与 ALU 基因的 C_T 值差异最小的 1 例正常骨髓者。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学数据分析,组间比较应用 Mann-Whitney U 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RQ-MSP 特异性 RQ-MSP 扩增产物的熔解曲线分析揭示不同浓度的 PRAME 未甲基化阳性模板扩增产物均为单一峰,其 T_m 值为 82.6 °C,而 PRAME 基因甲基化阳性模板、未经重亚硫酸氢盐修饰的正常基因组 DNA 和去离子水则未显示峰;并且凝胶电泳结果显示未甲基化阳性模板扩增产物可见一约 170 bp 左右条带,而甲基化阳性模板和去离子水扩增结果为阴性(图 1)。



1: 为甲基化阳性对照;2: 为未甲基化阳性对照;3~5: 为 AML 患者,分别为 M1、M2、M3;6: 为未经重硫酸盐修饰的正常 DNA;7: 为阴性对照(去离子水)。

图 1 PRAME 基因 RQ-MSP 扩增产物凝胶电泳

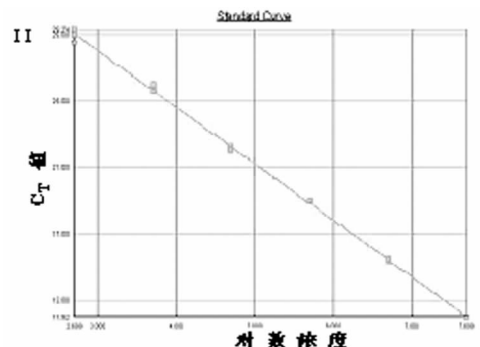


图 2 PRAME 质粒 RQ-MSP 标准曲线

2.2 RQ-MSP 灵敏度、重复性和扩增效率 对不同浓度 PRAME 未甲基化 DNA 质粒和 ALU 质粒分别扩增 8 次,PRAME 质粒最大灵敏度达 50 copy/μL,重复性不好,5×10⁷~5×10² copy/μL 重复性良好,见表 1。变异系数(CV)为

0.59%~1.53%。分别于第 1、2、3 周扩增 PRAME 质粒评价其不同时间的重复性, CV 值为 0.66%~3.35%, 见表 2。5×10⁷~5×10² copy/μL 的 PRAME 质粒荧光扩增曲线, 其标准曲线的斜率为-3.39, 相关系数为 0.998, PCR 扩增效率(E)为 1.97。

2.3 RQ-MSP 检测 AML 组 PRAME 基因未甲基化水平 对照组检测发现 PRAME 基因启动子未甲基化水平较低, 见表 3。而 AML 组中, PRAME 基因启动子未甲基化含量则明显增高, 两组间 PRAME 基因启动子未甲基化含量差异有统计学意义(P=0.002)。

表 2 不同时间 RQ-MSP 检测 PRAME 质粒的结果

	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	C _T	CV(%)
2	28.68	29.01	28.98	29.27	28.51	29.09	0.97
3	25.20	25.02	26.00	25.71	25.56	25.66	1.39
4	21.98	21.89	22.09	22.25	22.09	22.25	0.66
5	18.47	19.17	19.00	19.04	19.03	19.10	1.33
6	15.06	15.02	15.46	15.40	15.48	15.49	1.42
7	12.85	12.70	12.02	11.98	11.96	11.99	3.35

表 3 标本中 PRAME 基因 RQ-MSP 检测结果[中位(范围)]

组别	n	PRAME-C _T	ALU-C _T	N _{PRAME}
对照组	18	30.41 (0~36.43)	12.21 (9.56~14.42)	25.29 (0~100.00)
AML 组	30	30.61 (24.06~37.21)	11.44 (9.47~16.39)	772.42 (0.96~4 508.96)

3 讨论

PRAME 基因在 AML 患者中呈高水平表达, 可能通过维甲酸信号通路参与调节细胞增殖^[5]、分化和凋亡, 其表达量与 DNA 甲基化程度之间存在可逆关系, 提示 DNA 低甲基化在 PRAME 基因表达中起着重要的调控作用^[6], 检测 PRAME 基因低甲基化有助于疾病早期诊断, 并为化疗提供预测指标。

基因组 DNA 甲基化包括高甲基化和低甲基化, 目前标准 MSP 法广泛应用于检测基因组 DNA 甲基化, 它避免了限制性核酸内切酶酶切技术操作复杂、技术难度大、酶切不彻底、不能反映整个 CpG 岛的甲基化状态等缺点, 但是只能定性检测有无甲基化的存在, 无法进行定量分析。实时荧光定量 PCR 建立与目的片段一样的标准品, 保证目的片段与标准品的扩增效率一致, 减小实验误差^[7], 具有快速准确、敏感度高、重复性好和无需 PCR 后处理等优点, 已被广泛应用于核酸定量研究。Toyooka 等^[8]建立的 RQ-MSP 法克服了 MSP 的缺点, 能定量检测目的基因甲基化量, 在此基础上, 本研究建立了以 EvaGreen 为荧光染料的 RQ-MSP 检测 PRAME 基因未甲基化技术, 结果显示 RQ-MSP 具有良好的重复性、特异性和灵敏性。

本研究初步检测两组 PRAME 基因启动子低甲基化含量, 结果表明两者差异有统计学意义, AML 组 PRAME 基因

启动子区低甲基化水平明显高于对照组, 文献报道^[9-11], 30%~64% AML 患者存在 PRAME 基因高水平表达, 提示 AML 患者 PRAME 基因低甲基化改变可能与其发病相关。

本研究揭示 RQ-MSP 能够准确检测 PRAME 基因启动子区的低甲基化水平, 并且可用于肿瘤患者初诊标本和化疗后随访标本的 MRD 检测。

参考文献:

- [1] Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, et al. Clinical implication of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, 133(1):118.
- [2] Spanakia A, Perdikogianni C, Linardakis E, et al. Quantitative assessment of PRAME expression in diagnosis of childhood acute leukemia [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(5):639.
- [3] Christina A, Ortmann, Eisele L, et al. Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(10):809.
- [4] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(11):1521.
- [5] Epping MT, Wang L, Edel MJ, et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling [J]. *Cell*, 2005, 122(6):835.
- [6] Schenk T, Stengel S, Goellner S, et al. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46(9):796.
- [7] 罗勇军, 刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用 [J]. *重庆医学*, 2005, 34(3):414.
- [8] Toyooka KO, Toyooka S, Maitra A, et al. Establishment and validation of real time polymerase chain reaction method for CDH1 promoter methylation [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(2):629.
- [9] Goellner S, Steinbach D, Schenk T, et al. Childhood acute myelogenous leukaemia: Association between PRAME, apoptosis-and MDR-related gene expression [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(16):2807.
- [10] Tajeddine N, Millard I, Gailly P, et al. Real-time RT-PCR quantification of PRA-ME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006, 44(5):548.
- [11] Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, et al. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects [J]. *Am J Hematol*, 2005, 79(4):257.