

· 基础研究 ·

反向 PCR: 缺失断点定位好方法

问明瑶¹, 谢华平^{2△}

(华中科技大学同济医学院附属同济医院: 1. 耳鼻咽喉-头颈外科; 2. 消化内科, 武汉 430030)

摘要:目的 利用反向聚合酶链式反应(PCR)对乳腺癌细胞系 MCF-7 的 9p21 缺失断点进行准确定位。方法 以乳腺癌 MCF-7 细胞系为模板, 利用反向 PCR, 通过酶切、连接、PCR 反应及测序, 检测染色体 9p21 缺失断点。结果 乳腺癌 MCF-7 细胞系 9p21 缺失断点起于 chr9:21819532、止于 chr9:21989622 的大小为 170 kb 的大片段缺失, 断点处可见 ACTGG 5 个碱基的插入, 与长片段 PCR 检查结果相符。结论 反向 PCR 是缺失断点定位好方法, 适合样本人群研究。

关键词:乳腺癌; 细胞系, MCF-7; 缺失断点定位; 反向 PCR

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)23-2760-02

The inverse PCR: good method for deletion breakpoint mapping

Wen Mingyao¹, Xie Huaping^{2△}

(1. Surgical Department of Ear-Nose-Throat and Head-Neck, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To map the deletion breakpoint of 9p21 in breast cell line MCF-7 use the inverse PCR. **Methods** After digestion, ligation and PCR reaction, the breakpoint was confirmed by sequencing. **Results** The deletion breakpoint started at chr9:21819532 and ended at chr9:21989622 with a small insertion of ACTGG, which was consistent with the result confirmed by the long range PCR. **Conclusion** The inverse PCR is one good method for deletion breakpoint mapping and suitable for large sample size detection.

Key words: breast cancer; cell line, MCF-7; deletion breakpoint mapping; the inverse PCR

肿瘤基因组包含各种形式实体突变, 例如碱基替代、小片段插入或缺失、染色体重组以及拷贝数变异, 后者可以影响蛋白质编码或者基因调控, 与肿瘤的发生、发展密切相关^[1]。拷贝数变异, 由于芯片技术进步, 目前已获取各种肿瘤大量数据, 但仅有少部分拷贝数变异数据精确到碱基对水平, 影响深入研究^[2]。本研究小组曾用长片段聚合酶链式反应(PCR)对 MCF-7 细胞系的 9p21 缺失断点成功进行精确定位^[3]。但长片段 PCR 在进行引物设计时需要缺失断点两侧范围, 而且缺失区间内不能有其他形式的改变, 如染色体转位或者倒转的干扰, 具有明显的局限性^[4]。反向 PCR, 仅需要一段已知的序列作为引物设计模板, 用于检测紧邻区域未知 DNA 序列^[5]。本文将仍以乳腺癌细胞系 MCF-7 为模板, 探讨反向 PCR 进行缺失断点定位的可行性。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养、DNA 提取以及 MLPA (multiplex ligation-based probe amplification, MLPA) 检测 MCF-7 细胞系来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院保存的细胞系。DNA 提取及 MLPA 检测如早前描述的相关试剂公司提供的标准方案进行^[3]。

1.2 反向 PCR

1.2.1 限制性内切酶的选择 根据 MLPA 检测的结果, MCF-7 细胞系着丝粒侧断点位于 chr9:21994268~21995219 之间, 常规 PCR 检测证实 MCF-7 细胞系中存在 chr9:21993000~21994500 的 DNA 区间。UCSC 网站下载 chr9:21993000~21995200 序列, 经 NEBcutter 进行酶切检测后, 发

现 XbaI 内切酶在此区间内仅有 1 个酶切位点, 于是选择 XbaI 以及与 XbaI 产生相同粘性末端的 AvrII、NheI 和 SpeI 内切酶为反向 PCR 的内切酶。

1.2.2 反向 PCR 引物设计 引物设计: 反向 PCR 的引物设计, 也类似于正常 PCR 的引物设计。首先从 UCSC 网站下载 DNA 序列, 经 SNPmasker 进行单核苷酸多态性检测后, 将检测后的序列分成两部分, 并彼此交换位置, 也就是在后一部分设计正向引物, 在前一部分设计反向引物, 经 Primer3 在线软件设计相应的引物。本实验的正向引物为: 5'-TAA GTC GTT GTA ACC CGA ATG G-3'; 反向引物为: 5'-TGG GCT TTC TTT GTG AGT TAG AG-3'。

1.2.3 酶切反应 酶切反应总体积为 20 μ L, 含 3 μ L 的 MCF-7 细胞系 DNA 约 3 μ L 500 ng, 2 μ L 的 10 \times NEB 酶切反应液, 2 μ L 的 10 \times BSA, 1 μ L 的 XbaI、AvrII、NheI、SpeI 各约 5 U。37 $^{\circ}$ C 条件下水浴过夜, 65 $^{\circ}$ C 灭活 20 min。

1.2.4 酶切反应物的提取柱纯化 利用 Qiagen 公司的酶切反应纯化试剂盒, 实验步骤按公司提供的标准方案进行。

1.2.5 酶连接反应 反应体系 80 μ L, 含 20 μ L 的限制性内切酶酶切 DNA 约 200 ng, 10 \times NEB 连接反应液 8 μ L, T4DNA 连接酶 1 μ L 约 20 U, 加实验用水至 80 μ L。16 $^{\circ}$ C 下过夜。

1.2.6 PCR 反应 反应体系 50 μ L, 含酶连接反应物 5 μ L, 2 \times NEB LongAMP 液 25 μ L, 加实验用水至 50 μ L。反应流程如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 10 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 18 min; 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 18 min(每个循环延长 10 s); 68 $^{\circ}$ C 延长 10 min

结束。最后退火至 16 ℃ 结束。PCR 产物经胶红染色后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。以相同的方式设计引物,进行引物步移,将扩增片段缩小到 1 kb 时进行测序检测。

1.3 PCR 产物测序 PCR 反应产物经 1% 的琼脂糖凝胶检测。检测明确后,PCR 反应产物与 ExoSapIT 在 37 ℃ 共浴 30 min,然后 85 ℃ 15 min 灭活酶。纯化的 PCR 产物直接进行测序反应,测序反应采用 BigDyeR Terminator Cycle Kit(Applied Biosystems 公司),反应体积 10 μL,反应条件如下:96 ℃ 2 min;35 个循环的 96 ℃ 30 s,54 ℃ 10 s,60 ℃ 4 min。反应产物经异丙醇沉淀,70% 的乙醇清洗,溶解于 25 μL 的水中,直接由 ABI prism 3100 测序仪(Applied Biosystems 公司)检测。

2 结果

2.1 MCF-7 缺失断点定位 应用反向 PCR,检测到 MCF-7 细胞系存在着起于 chr9:21819532、止于 chr9:21989622 的大小为 170 kb 的大片段缺失,包括 MTAP 基因一部分及 CDKN2A 基因大部分。断点处可见 ACTGG 5 个碱基的插入(图 1),这与长片段 PCR 检测结果相符^[3]。

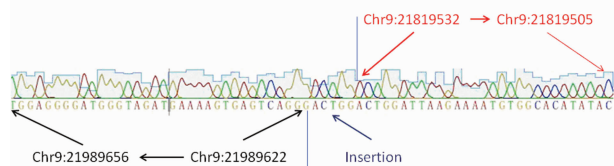


图 1 细胞系 MCF-7 缺失断点测序结果

2.2 反向 PCR 形成的人工环形连接部 位于 Chr9:21817963~21817968 的 XbaI 酶切位点(TCTAGA)与位于 Chr9:21995042~21995047 的 XbaI 酶切位点(TCTAGA)经酶切后连接成环。人工连接在连接位点附近产生一个干扰的 T 波背景。检测到人工形成的环形 DNA 的连接部(图 2)。

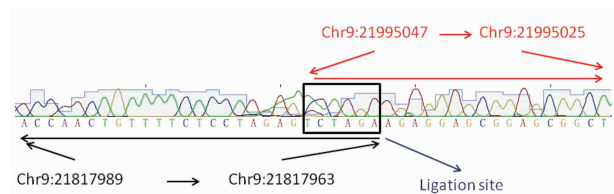


图 2 反向 PCR 的连接位点

3 讨论

DNA 测序确定缺失断点位置是检测大片段缺失金标准^[6]。长片段 PCR 虽然操作简单、价格低廉,但需要确定双侧断点范围,而不同个体间的断点缺失范围常有变化,限制长片段 PCR 应用^[4]。反向 PCR 可以通过已知边界序列来探测缺失断点具体位置以及重组之后新的结构,而不管这种重组仅是缺失或者伴有转位/倒转^[5]。良好的实验设计可以覆盖多达数 10 kb 的断点簇^[7]。Meyer 等^[8]曾用反向 PCR 对 MLL 基因重组进行研究,设计引物覆盖 MLL 基因重组断点聚集区域,反向 PCR 既能发现已知基因融合形式,还能发现以往没有被认识的新基因融合形式。Cin 等^[9]对脑的星形细胞瘤进行研究,利用反向 PCR 检测 BRAF 基因参与的融合,设计引物覆盖 BRAF 基因发生融合的外显子 8~12 区域,除了能准确探查到已知的 KIAA1549-BRAF 融合基因外,还发现新的具有成瘤性的 FAM131B-BRAF 融合基因。这些研究表明,反向 PCR 能准确进行断点定位,可在大样本群中应用,能发现各种不同形式的断点融合,为研究创新提供简单易行的途径。

反向 PCR 实验的关键,是选择合适的限制性内切酶^[5]。

首先,选择一段已知的 DNA 序列,利用 NEB cutter 进行限制性内切酶的选择^[10]。限制性内切酶不能切割正、反向引物之间的区域,最好在已知区间内靠近引物的区域有且只有一个切割位点,另外的一个切割位点位于未知区间。限制性内切酶要选择能产生粘性末端的酶,因为粘性末端连接的成功率远远高于顿性末端^[11]。限制性内切酶的酶切位点可含有 4~6 个核苷酸序列,如果探测的区间短,可选择含有 4 个核苷酸的限制性内切酶;如要增加探测未知区间的长度,可以选择含有 6 个核苷酸序列的限制性内切酶,因为通常酶切位点含有 4 个核苷酸的限制性内切酶的切割频率要远高于酶切位点含有 6 个核苷酸的限制性内切酶^[12]。应尽量选择在人类基因组中切割频率相当较高的限制性内切酶,切割频率太低将增加实验难度和失败的风险。

新的研究样本多达 2 000 例的乳腺癌基因组研究表明,染色体 9p21 的甲硫腺苷磷酸化酶基因(methylthioadenosine phosphorylase,MTAP)所在区间,是乳腺癌最常见缺失位点之一,但其意义并不明确^[13]。在其他肿瘤中,例如脑胶质瘤和非小细胞型肺癌,近 10% 的样本存在着类似本研究的、断点位于 MTAP 外显子 4~5 之间缺失^[14]。本研究提示,利用反向 PCR 在乳腺癌样本中检测 MTAP 外显子 4~5 之间的区间,可能获得新而有趣的发现。

参考文献:

- [1] Hudson TJ, Anderson W, Artez A, et al. International network of cancer genome projects[J]. Nature,2010,464(7291):993-998.
- [2] Conrad DF, Pinto D, Redon R, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome [J]. Nature,2010,464(7289):704-712.
- [3] 谢华平,严江涛,汤琳,等.乳腺癌 MCF-7 细胞系 9p21 缺失断点的精确定位分析[J].解放军医学杂志,2012,37(5):405-408.
- [4] Liu YT, Carson DA. A novel approach for determining cancer genomic breakpoints in the presence of normal DNA[J]. PLoS One,2007,2(4):e380.
- [5] Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction[J]. Genetics,1988,120(3):621-623.
- [6] Mills RE, Walter K, Stewart C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing[J]. Nature,2011,470(7332):59-65.
- [7] Thorsen J, Micci F, Heim S. Identification of chromosomal breakpoints of cancer-specific translocations by rolling circle amplification and long-distance inverse PCR [J]. Cancer Genet,2011,204(8):458-461.
- [8] Meyer C, Schneider B, Reichel M, et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(2):449-454.
- [9] Cin H, Meyer C, Herr R, et al. Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma [J]. Acta Neuropathol,2011,121(6):763-774.

表 3 各组对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	左耳(mg)	右耳(mg)	肿胀度	抑制率(%)
空白对照组	—	0.350±0.036	9.300±2.033	8.950±2.012	—
阳性对照组	0.22	0.368±0.041	4.173±1.501**	3.805±1.484**	57.5
I 组	0.84	0.349±0.055	4.350±2.014**#	4.001±2.005**#	55.30
II 组	0.42	0.376±0.041	6.794±2.191*	6.418±2.198*	28.2
III 组	0.21	0.403±0.068	7.139±2.706	6.736±2.687	24.7

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$, 与空白对照组比较; # : $P > 0.05$, 与阳性对照组比较; — : 此项无数据。

3 讨 论

疼痛是机体受到来自内外环境的伤害性刺激时出现的一种伴有情绪反应的病理生理过程,可作为机体受到伤害的一种警告,起到防御性保护作用,也是多种疾病的一种症状^[9]。现代医学发现许多因子都有可致痛的作用,局部组织受损时,可释放出大量的钾离子、组胺、前列腺素和缓激肽等炎性介质,既可引起炎症又可致痛。中医学认为,人身经脉流行,气血环转,上下内外,无有已时。若病邪相加,气行不畅,血运不调,气血不通,则出现疼痛^[10]。据相关文献报道,目前主要有雷公藤、青藤碱、白芍总甙、黄连素、三七总皂苷、粉防己碱、树舌多糖、伪麻黄碱、黄芪总苷、五加皮等,均具有一定的镇痛抗炎效应^[11-17]。然而,对于水药骂广瓦在镇痛抗炎方面的实验研究尚无相关报道,本研究第 1 次通过动物实验来探究水药骂广瓦在镇痛抗炎方面的疗效,为新药研究提供一定的理论依据。

骂广瓦在三都及都匀水族地区民间被用于治疗风寒痹痛、龋齿痛、跌打损伤等疾病。本研究以镇痛、抗炎为主要指标,通过实验证明,水药骂广瓦对醋酸诱发小鼠扭体及热板法致痛和二甲苯所致耳廓肿胀实验具有镇痛、抗炎作用。同时,在本研究中还发现,随着水药骂广瓦剂量的增高,其扭体潜伏期、给药后痛阈值、镇痛率、抑制率越高,扭体次数和肿胀度越低,证实了高剂量的水药骂广瓦灌胃给药对小鼠具有较好的抗炎镇痛效果,至于其具体的药理学作用机制及有效成分尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 司有奇,陆龙辉.中国水族医药宝典[M].贵阳:贵州民族出版社,2007:318-319.
- [2] 中华本草编委会.中华本草(第 8 卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1999:504-505.
- [3] 魏学军,林先燕,李雪营,等.民族药金耳环总多糖的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):41-44.
- [4] 夏亚兰,魏学军,林先燕,等.水药骂广瓦提取液对小鼠止

咳祛痰作用的实验研究[J].重庆医学,2012,41(10):966-967.

- [5] 李伟平,何良艳,马哲龙,等.土牛膝多糖抗炎镇痛作用的研究[J].中华中医药学刊,2012,30(4):747-749.
- [6] 田庚元,冯宇澄,林颖.植物多糖的研究进展[J].中国中药杂志,1995,20(7):441-443.
- [7] 申利红,王建森,李雅,等.植物多糖的研究及应用进展[J].中国农学通报,2011,27(2):349-352.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002:882-911.
- [9] 周志梅,郭世民,何静,等.镇痛中药的研究进展[J].云南中医中药杂志,2007,28(4):52-54.
- [10] 姜维龙,唐勇,董超.关节疼痛的中医理论认识[J].四川中医,2010,28(3):11-13.
- [11] 吴荫子.白芍的药理研究与临床应用[J].中国医院药学杂志,1998,18(4):172-173.
- [12] 王志荣.粉防己碱药理作用研究进展[J].中国药理学通报,2000,16(5):488-491.
- [13] 王健,龚兴国.多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展[J].中国生化药物杂志,2001,22(1):52-54.
- [14] 戴贵东,闫琳,余建强,等.伪麻黄碱镇痛、抗炎作用的研究[J].陕西医学杂志,2003,32(7):641-642.
- [15] 霍海如,车锡平.青藤碱镇痛和抗炎作用机理的研究[J].西安医科大学学报,1989,10(4):346-349.
- [16] 张轩萍,扬彩红,王洁,等.祛风息痛丸的抗炎作用机制研究[J].中国药物与临床,2009,9(3):225-228.
- [17] 焦连庆,于敏,焦莹,等.树舌多糖的分离纯化、理化性质及抗炎镇痛活性研究[J].中国药师,2010,13(5):615-618.

(收稿日期:2013-03-21 修回日期:2013-05-22)

(上接第 2761 页)

- [10] Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEB cutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13):3688-3691.
- [11] Loukianov E, Loukianova T, Periasamy M. Efficient cloning method that selects the recombinant clones[J]. Biotechniques, 1997, 23(2):292-295.
- [12] Taheri A, Robinson SJ, Parkin I, et al. Revised selection criteria for candidate restriction enzymes in genome walking[J]. PLoS One, 2012, 7(4):e35117.

- [13] Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2 000 breast tumours reveals novel subgroups[J]. Nature, 2012, 486(7403):346-352.
- [14] Schmid M, Sen M, Rosenbach MD, et al. A methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) fusion transcript identifies a new gene on chromosome 9p21 that is frequently deleted in cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(50):5747-5754.

(收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-04-25)