

改进亚硫酸盐测序技术研究拟南芥 DNA 甲基化水平

马珊珊^{1,2}, 孙晓霞³, 李照令^{1,2}, 贾春云¹, 刘宛^{1*}, 台培东¹, 赵晓辉⁴, 李培军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.中国科学院大学, 北京 100049; 3.辽宁大学, 沈阳 110036; 4.沈阳农业大学, 沈阳 110866)

摘要: DNA 胞嘧啶甲基化是一种重要的表观遗传修饰形式, 在细胞增殖、分化、发育、基因组印迹、基因表达调控等过程中起着重要作用。随着对 DNA 甲基化研究的深入, 各种 DNA 甲基化检测方法被开发出来满足不同类型的研究需求。通过实验建立的一种改进亚硫酸盐测序技术, 将拟南芥基因组 DNA 经酶切纯化后, 用亚硫酸盐修饰液修饰, 将 PCR 产物克隆到 pEASY-T1 载体上, 每个样品随机挑取 15 个阳性克隆, 测序分析, 研究拟南芥错配修复基因 *MutL-homologue 1* (MLH1) 启动子区域的甲基化水平。结果表明: 与传统亚硫酸盐测序法相比, 改进方法有利于 DNA 完全修饰, 既减少了修饰时间, 又提高了 PCR 目的片段的特异性、稳定性和重复性; MLH1 基因启动子区域甲基化比率为 27.3%, 而不是 45.6%, 避免了非甲基化位点的错认。为植物 DNA 甲基化分析提供了一种更为理想的研究手段。

关键词: 亚硫酸盐测序; DNA 甲基化; MLH1

中图分类号: Q2-33 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)05-0889-06 doi:10.11654/jaes.2013.05.002

An Improved Bisulfite Sequencing Technique for Analysis of DNA Methylation Level in *Arabidopsis thaliana*

MA Shan-shan^{1,2}, SUN Xiao-xia³, LI Zhao-ling^{1,2}, JIA Chun-yun¹, LIU Wan^{1*}, TAI Pei-dong¹, ZHAO Xiao-hui⁴, LI Pei-jun¹

(1.Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3.Liaoning University, Shenyang 110036, China; 4. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: DNA cytosine methylation is a central epigenetic modification that has essential roles in the control of many critically important biological processes, including cell proliferation, differentiation, development, genomic imprinting and regulation of gene expression. With progresses in study on DNA methylation, detection techniques of DNA methylation have been developed to meet requirements of various researches. This article has established an improved bisulfite sequencing technique for analysis of *MutL-homologue 1* (MLH1) promoter methylation level of mismatch repair gene in *Arabidopsis thaliana*. After the genomic DNA in *Arabidopsis thaliana* was digested, purified, and then modified with bisulfite liquid, the PCR products were cloned into the pEASY-T1 vector. 15 positive clones were randomly selected from each sample and then sequenced. The results showed that compared with the traditional method of methylation analysis, the improved method modified the digested DNA completely, reduced the modification time greatly, and improved the specificity, stability and repeatability of the PCR products. MLH1 promoter methylation level was 27.3% instead of 45.6%. The improved bisulfite sequencing technique avoided misidentification at non-methylated sites, and would provide a better means of research for analysis of DNA methylation in plant.

Keywords: bisulfite sequencing; DNA methylation; MLH1

收稿日期: 2012-11-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(20977095; 40930739); 辽宁省自然科学基金项目(201202224); 国家科技重大专项(2012ZX07505-001); 沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室基金资助

作者简介: 马珊珊(1988—), 女, 辽宁凌源人, 硕士研究生, 主要从事环境污染生态毒理学研究。E-mail: mashanshan19880211@163.com

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

近年来,人们对DNA甲基化研究的重要性有了更多的认识,并开发出一系列检测DNA甲基化的方法。对于特异性位点的DNA甲基化的检测方法,常用的有以下几种:第一种是甲基化敏感性限制性内切酶法。这是一种经典的甲基化研究方法,可以同时检测基因组内多个CpG位点,但需要样本量大,只有检测与转录相关的关键性位点的甲基化状态时,此检测方法才有意义。第二种是甲基化特异性的PCR。这种方法只能明确是否存在甲基化而不能作定量检测。第三种是结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法。此种方法只能获得特殊酶切位点的甲基化情况,因此检测阴性不能排除样品DNA中甲基化存在的可能^[1]。第四种是直接测序法。直接测序法是由Frommer等^[2]提出的研究DNA甲基化的方法。关于基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰,大多参考Frommer等经典修饰方法^[3],其基本原理是:重亚硫酸盐使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成成为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变,为了区别甲基化DNA和非甲基化DNA,用不含CG位点的引物进行PCR扩增,扩增后尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶,对PCR产物进行测序并且与未经处理的序列比较,根据碱基变化判断CG位点是否发生甲基化。由于亚硫酸盐修饰法是一种非酶促反应的剧烈的化学反应,再加上长时间的修饰,可导致大量DNA降解和丢失,且化学修饰后模板成分复杂,使得PCR扩增效率极低甚至失败^[4]。因此,本文介绍一种改进的亚硫酸盐测序技术,具有很高的可靠性及精确性,可有效提高甲基化检测的成功率,为植物DNA的甲基化分析提供一种更为理想的研究手段^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis*)种子为哥伦比亚生态型(*Ecotype Columbia*)。

1.1.2 试剂与仪器

对苯二酚,亚硫酸氢钠,Trolox(水溶性维生素E),三烯丙基氰脲酸酯,四乙烯五胺五盐酸盐(TE-TRAEN),盐酸胍溶液(以上试剂均购自美国Sigma公司)。EcoR I酶和Hind III酶(宝生物工程有限公司),Wizard Clean-up resin DNA纯化系统(Promega公司,A7280),TransStart™ FastPfu DNA Polymerase及特异片段的克隆用pEASY™-Blunt Cloning Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),甲基化特异性引

物(宝生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥基因组DNA的提取

采用改良的CTAB法^[6],对拟南芥幼苗基因组DNA进行提取。称取200 mg新鲜拟南芥幼苗于液氮中,充分迅速研磨。加入2.5 mL CTAB提取液,轻轻摇匀,于65℃保温45 min。氯仿异戊醇需多次抽提,以保证DNA质量。

1.2.2 DNA的修饰与纯化

1.2.2.1 传统的亚硫酸盐修饰

取2 μg(不大于50 μL) DNA于2 mL离心管中,加入新配制的3 mol·L⁻¹ NaOH 5~5.5 μL,42℃放置15~20 min。再加入30 μL 10 mmol·L⁻¹ 氢醌和520 μL 3.6 mol·L⁻¹ 亚硫酸氢钠混匀,55℃避光水浴16 h后纯化回收,最后用50 μL TE溶解^[7]。

1.2.2.2 改进的亚硫酸盐修饰

(1)酶切及纯化

在约10 μg的基因组DNA中加入10 μL EcoR I酶、10 μL Hind III酶和20 μL M buffer,加无菌水至200 μL体系,于37℃水浴6~12 h,进行酶切处理。反应结束后,取5 μL进行电泳检测酶切是否完全。

若酶切完全,向上述水浴之后的体系中,加入等体积200 μL的氯仿与异戊醇混合液,间歇混匀10 min;于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,吸取180 μL上清液于1.5 mL离心管中;然后加入上清液1/10体积的3 mol·L⁻¹的NaAc(约20 μL)、40 μg糖原和上清液3.5倍体积(650~700 μL)的预冷的无水乙醇混匀后,于-20℃沉淀2~3 h(或过夜);于4℃、12 000 r·min⁻¹离心30 min;弃上清液,在沉淀中加入1 mL预冷的无水乙醇,间歇混匀5 min,再以4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min;所得沉淀再经预冷的无水乙醇混匀重复离心操作。

最后,将沉淀常温下离心8 s,将附着在EP管壁上的乙醇残液离至管底,用灭过菌的滤纸吸干沉淀周围的液体,通风干燥3 min后,加入50 μL无菌水。

(2)亚硫酸盐修饰液的配制及修饰

在2 mL的离心管中,加入600 μL无菌水,同时加入100 μL新配的6 mol·L⁻¹ NaOH、0.5 mg水溶性维生素E(配好后终浓度是0.5 mg·mL⁻¹)、10 μL三烯丙基氰脲酸酯(终浓度是1 mmol·L⁻¹)、0.037 g四乙烯五胺五盐酸盐(TETRAEN)(终浓度是0.1 mol·L⁻¹)、37.5 μL盐酸胍溶液(终浓度是0.3 mol·L⁻¹)、0.342 g偏重亚硫酸钠(终浓度是3.6 mol·L⁻¹)和20 μL新配

的对苯二酚;调节pH 为 5.0~5.1,加入无菌水 100 μL ,即定容到 1 mL。

将酶切纯化后的 DNA 溶液 25 μL 置于 PCR 仪中,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min 使其变为单链;将上述单链 DNA 取出,置于冰中 1 min,离心 5~6 s 后,向管中加入 5 μL 6 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH,用枪混匀,42 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 20 min(终体积 30 μL)。

水浴结束后,向 30 μL 解链后的 DNA 溶液中,加入新配制的亚硫酸盐修饰液 500 μL ,此时总体积为 530 μL ;而后分装于 PCR 管中,短暂离心之后进行修饰,所设置的 9 种修饰程序见表 1。

1.2.3 PCR 扩增

引物由宝生物工程有限公司设计,引物序列见表 2。

以重盐修饰后的基因组 DNA 为模板,以 MLH1(F)、MLH1(R)为上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积 25 μL ,体系中含有 0.8 μL 引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),2 μL dNTPs(4 种成分均为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),PCR Buffer 5 μL ,150 ng 基因组总 DNA 和 0.5 μL TransStartTM FastPfu DNA Polymerase(2.5 units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。

反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 两个循环;采用降落 PCR,将退火温度每两个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$,直至退火温度降低到 47 $^{\circ}\text{C}$,

将 47 $^{\circ}\text{C}$ 退火设置为 19 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ pause。共计 35 个循环。

1.2.4 测序分析

PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,回收 PCR 产物,用 pEASYTM-Blunt Cloning Kit 试剂盒克隆 PCR 产物,每个样品至少 15 个阳性克隆,菌液送北京华大基因公司测序。将每个克隆的测序结果利用 DNA-MAN 软件打开,在 NCBI 网站上与基因库中的拟南芥原始序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 用 EcoR I 和 Hind III 双酶切拟南芥幼苗基因组 DNA 的电泳结果

取 3 个拟南芥幼苗 DNA 样品,用 EcoR I 和 Hind III 对拟南芥幼苗基因组 DNA 进行了限制性酶内切,酶切结果如图 1。该结果显示,EcoR I 和 Hind III 双酶切能完全酶解拟南芥幼苗基因组 DNA,电泳结果呈均匀的弥散状,完全可以进行后续的亚硫酸盐修饰。

2.2 修饰时间和温度对改进的亚硫酸盐测序法修饰结果的影响

设置的修饰程序如表 1 所示,这 9 种修饰温度 and 时间的设定分别概述为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h,55 $^{\circ}\text{C}$ 、100 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 、80 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h,58 $^{\circ}\text{C}$ 、100 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 、80 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h,60 $^{\circ}\text{C}$ 、100 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 min。经 PCR、琼脂糖凝胶电泳后发现(图 2),这 3 种温度及时间的设定,均无明显差异。我们选定的是第 6 种修饰程序,即:3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -hold

表 2 实验所用的引物序列

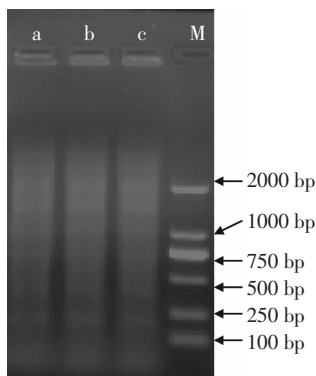
Table 2 Sequences of primer used in the experiment

引物名称	片段大小/bp	引物序列(5'→3')
MLH1(F)	404	ATTGTGAATGAAAAGTTGATTTTAAAT
MLH1(R)	404	ACCCAATTAAATCTAAAAACCC

表 1 实验设置的修饰程序

Table 1 Modification programs set up in the experiment

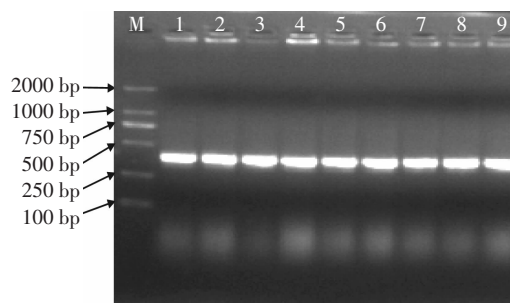
序号	简称	设置的修饰程序
1	55 $^{\circ}\text{C}$ 2 h	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
2	55 $^{\circ}\text{C}$ 100 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
3	55 $^{\circ}\text{C}$ 80 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
4	58 $^{\circ}\text{C}$ 2 h	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
5	58 $^{\circ}\text{C}$ 100 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
6	58 $^{\circ}\text{C}$ 80 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
7	60 $^{\circ}\text{C}$ 2 h	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 58 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
8	60 $^{\circ}\text{C}$ 100 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 55 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$
9	60 $^{\circ}\text{C}$ 80 min	3 min 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 60 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 60 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 60 $^{\circ}\text{C}$ -30 s 95 $^{\circ}\text{C}$ -20 min 60 $^{\circ}\text{C}$ -hold at 20 $^{\circ}\text{C}$



谱带 M=DL2000 marker; a, b, c 分别为拟南芥幼苗 DNA 样品

Profile M: DL2000 marker; Line a, b, c: *Arabidopsis thaliana* seedlings DNA samples

图1 用 EcoRI 和 HindIII 双酶切拟南芥基因组 DNA 的电泳结果
Figure 1 Result of the *Arabidopsis thaliana* genomic DNA digested with EcoRI and HindIII



谱带 M=DL2000 marker; 1~9 泳道分别对应所设置的 9 种修饰程序进行 PCR 扩增的拟南芥 MLH1 目的片段

Profile M: DL2000 marker; Line 1~9: PCR amplified products of *Arabidopsis thaliana* MLH1 targeted fragments under the 9 modification programs

图2 拟南芥幼苗 MLH1 基因启动子 PCR 产物电泳图谱
Figure 2 Profile of PCR amplification of *Arabidopsis thaliana* DNA MLH1 promoter region

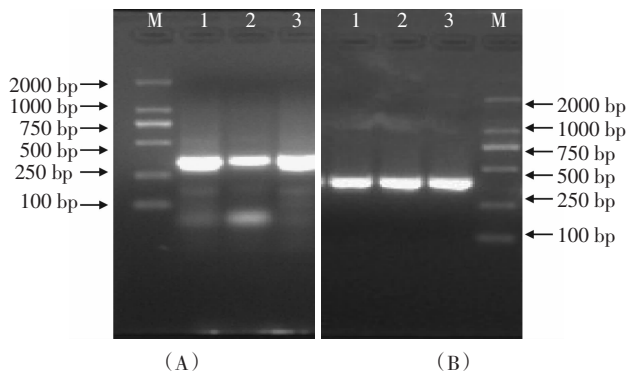
at 20 °C。

2.3 改进后的亚硫酸盐测序法 PCR 产物电泳结果

图 3(A)与图 3(B)对比可以看出,传统的修饰方法扩增出的片段,有非特异性条带的存在。用改进的修饰方法扩增出的条带,亮度无明显差异,分别在约 404 bp 处可见理想、清晰、特异性好的目的条带,其大小与预期结果一致。

2.4 传统亚硫酸盐测序法和改进亚硫酸盐测序法测序结果的比较

我们所要研究的部位为拟南芥基因 MLH1 的 ATG 上游约 404 bp 片段,如图 4(A)所示,其序列如图 4(B)所示。其中目的片段的 404 个碱基对应的原始序列中的 11 个 CG 位点已用“CG”标出。



(A)为采用传统修饰方法扩增出的片段;(B)为采用改进的修饰方法扩增出的片段。图谱 M 为 DL2000, 1~3 号泳道均为对照样品修饰后的特异性扩增结果

(A): Amplified products adopted the traditional method of bisulfite modification. (B): Amplified products adopted the improved method of bisulfite modification. Profile M: DL2000 marker; Line 1~3: The specific amplification results of bisulfite modified control samples

图3 拟南芥幼苗 MLH1 基因启动子 PCR 产物电泳图谱对比
Figure 3 Profile of PCR amplification of *Arabidopsis thaliana* DNA MLH1 promoter region

采用改进的亚硫酸盐测序技术,对照样品的 15 个克隆测序结果分别与原始序列比对,11 个 CG 位点有 3 个未转变为 TG, mCpG/CpG 为 27.3%,甲基化的位点为 CpG7、CpG8、pG10。而采用传统的亚硫酸盐测序法,对照样品的 15 个克隆测序结果与原始序列比对,11 个 CG 位点有 5 个未转变为 TG, mCpG/CpG 为 45.6%,甲基化的位点为 CpG7、CpG8、CpG9、CpG10、CpG11。比较两种修饰效果发现,改进后的修饰方法可更高效准确地鉴定拟南芥 MLH1 基因启动子甲基化状态。

3 讨论

近年来有关甲基化的研究方法越来越多,而制约 DNA 甲基化研究的瓶颈是方法和技术^[8-10]。研究发现,甲基化研究难度大,各种方法都存在着一一定的限制^[11]。

改进的亚硫酸盐测序法各主要步骤均影响测序结果:首先,在植物 DNA 甲基化研究中,DNA 修饰效果决定 PCR 扩增的成败^[12]。改进亚硫酸盐测序技术在摸索出的修饰温度下对酶切后的小片段 DNA 进行修饰,有利于 DNA 修饰完全。传统的修饰方法,采用 55 °C 温浴约 16 h^[13],不仅仅繁琐耗时,而且对 DNA 造成很大程度的损伤,影响后续的 PCR 扩增,条带特异性不强,有明显的杂带。有同样的研究结果,也存在扩增出的目的片段特异性不强的情况^[14]。其次,理想的

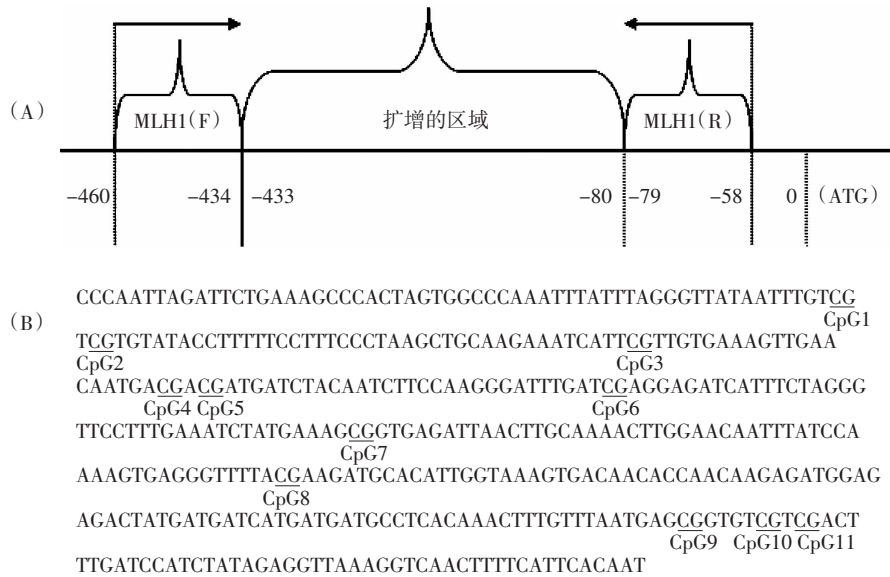


图 4 拟南芥基因 MLH1 启动子部位分析

Figure 4 Analysis of promoter of *Arabidopsis thaliana* DNA MLH1

转化是在 5-甲基胞嘧啶保持不变的情况下,使绝大多数 C 转化为 U,并可控制 DNA 的降解和丢失,从而保证甲基化分析的灵敏度^[15-18]。采用改进亚硫酸盐测序技术,极大地缩短了修饰时间,处理速度加快,避免了时间的浪费。同时,DNA 的降解率低,扩增出的目的片段具有良好的特异性、稳定性和重复性,保证了甲基化分析的灵敏度。最后,为了得到完整而准确的 CpG 位点甲基化信息,评估改进后的亚硫酸盐测序法的可行性,我们取 3 个拟南芥 DNA 样品,利用改进的亚硫酸盐测序法,对拟南芥 DNA 每个样品随机选取 15 个阳性克隆,测序分析拟南芥幼苗 MLH1 基因启动子区的甲基化水平。改进的亚硫酸盐测序技术测出的拟南芥 MLH1 启动子区域 11 个 CG 位点有 3 个位点发生甲基化,而传统的亚硫酸盐测序技术测出的拟南芥 MLH1 启动子区域 11 个 CG 位点有 5 个位点发生甲基化。从而可以得出,改进的亚硫酸盐测序法更具有准确性,避免非甲基化位点的错认。

目前,有关植物基因组 CpG 岛区域内胞嘧啶(Cytosine)位点的甲基化状态以及甲基化多态性研究的报道,主要集中在植物甲基化状态如何调控植物的生长发育或逆境胁迫与植物基因表达水平之间的相关性^[19-24]。逆境胁迫可导致 DNA 甲基化水平发生改变,是植物对逆境响应的机制之一^[25]。国内外关于重金属胁迫下,植物 MMR 系统中 MLH1 基因启动子部位是否存在甲基化位点、其甲基化状态在重金属胁迫下是否具有早期预警作用的报道尚少。

4 结论

采用改进亚硫酸盐测序技术在摸索出的修饰温度下对酶切后的小片段 DNA 进行修饰,实现了 DNA 高效特异转化。与传统方法比较,该技术方案优点为:①DNA 片段修饰完全;②修饰时间短,避免繁琐耗时;③DNA 降解率低,目的片段具有良好的特异性、稳定性和重复性,保证了甲基化分析的灵敏度。

改进亚硫酸盐测序技术能更准确反应基因启动子甲基化状况,更适用于甲基化状态的检测,为以 PCR 为基础的启动子 CpG 岛甲基化检测提供了方便,尤其为扩增富含 CG 的基因启动子区域提供了参考。利用此改进的亚硫酸盐测序法,可以准确满足拟南芥 DNA 甲基化分析的需要。本文作者已利用该方法进行了污染胁迫诱导对拟南芥幼苗基因甲基化影响的相关研究,获得了较好的试验结果。

参考文献:

- [1] 张松法,叶枫,陈怀增,等.基因组 CpG 岛甲基化检测技术研究进展[J].国际遗传学杂志,2006,29(3):201-203.
ZHANG Song-fa, YE Feng, CHEN Huai-zeng, et al. Advance in the profile of genome CpG islands methylation methods[J]. *Int J Genet*, 2006, 29(3):201-203.
- [2] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:1827-1831.
- [3] 田金凤,曹培,于秀远,等.小鼠骨髓细胞中 p16 和 RalB 基因启动

- 区 CpG 岛的甲基化位点分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(10):962-967.
- TIAN Jin-feng, CAO Pei, YU Xiu-yuan, et al. Analysis of methylation locus at CpG islands of p16 and Ralb genes promoter in mouse bone marrow cells[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 26(10):962-967.
- [4] Clark S, Statham A, Stirzaker C, et al. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis[J]. *Nat Protocol*, 2006, 1(5):2353-2364.
- [5] Schumacher A. Schumacher's guide for: Bisulfite conversion of DNA for methylation fine-mapping[M/OL]. 2008. <http://www.MethyLogiX.com>.
- [6] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA[J]. *Biotechnology*, 2000, 28(3):432-434.
- [7] 冯苏妹, 杨磊, 吕嘉春, 等. 一种改良的亚硫酸氢盐修饰微量 DNA 的甲基化分析方法[J]. 医学创新研究, 2008, 5(21):1-2.
- FENG Su-mei, YANG Lei, LÜ Jia-chun, et al. A modified method of bisulfite modification of micro quantity of DNA for analysis of DNA methylation[J]. *Medicine Innovation Research*, 2008, 5(21):1-2.
- [8] Yang I, Park I Y, Jang S M, et al. Rapid quantification of DNA methylation through dNMP analysis following bisulfite-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8):e61.
- [9] Brena R M, Auer H, Kornacker K, et al. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3):e17.
- [10] Meissner A, Gnirke A, Bell G W, et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18):5868-5877.
- [11] 顾婷婷, 张忠明, 郑鹏生. DNA 甲基化研究方法的回顾与评价[J]. 中国妇幼健康研究, 2006, 17(6):555-560.
- GU Ting-ting, ZHANG Zhong-ming, ZHENG Peng-sheng. Review and evaluation of methodology of research on DNA methylation[J]. *Chinese Journal of Maternal and Child Health Research*, 2006, 17(6):555-560.
- [12] Rand K, Mitchell S, Clark S, et al. Bisulphite differential denaturation PCR for analysis of DNA methylation[J]. *Epigenetics*, 2006, 1(2):94-100.
- [13] 汪艳杰, 龙鸿, 姚家玲. 亚硫酸氢钠测序法检测水稻 FIE 基因 CpG 岛甲基化状态[J]. 植物科学学报, 2011, 29(1):134-139.
- WANG Yan-jie, LONG Hong, YAO Jia-ling. Analysis of methylation at CpG island of FIE in rice by bisulfite sequencing[J]. *Plant Science Journal*, 2011, 29(1):134-139.
- [14] 单存海, 钟鸣, 刘宛, 等. 镉胁迫对拟南芥 MLH1 基因启动子甲基化的影响[J]. 植物生理学报, 2011, 47(3):298-304.
- SHAN Cun-hai, ZHONG Ming, LIU Wan, et al. Effects of cadmium stress on MLH1 promoter methylation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(3):298-304.
- [15] Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(24):5064-5066.
- [16] Shiraishi M, Hayatsu H. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation[J]. *DNA Res*, 2004, 11(6):409-415.
- [17] Liu L, Wylie R C, Hansen N J, et al. Profiling DNA methylation by bisulfite genomic sequencing: Problems and solutions[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 287(2):169-179.
- [18] Grunau C, Clark S J, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(13):65-66.
- [19] Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2008, 49(1):61-72.
- [20] Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769(5-6):276-286.
- [21] Saze H, Shiraishi A, Miura A. Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Science*, 2008, 319(5862):462-465.
- [22] Wang Y, Lin X, Dong B, et al. DNA methylation polymorphism in a set of elite rice cultivars and its possible contribution to inter-cultivar differential gene expression[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2004, 9(3):543-556.
- [23] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis[J]. *Cell*, 2006, 126(6):1189-1201.
- [24] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(1):61-69.
- [25] 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.