

甲基化 MSP 特异性 PCR 全程的常见问题与相关控制措施

2018-01-24 临床科研那些事

一、亚硫酸氢钠修饰过程中可能出现的问题及应对措施

亚硫酸氢钠修饰 DNA 的目的是将 DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶完全转化为尿嘧啶，而甲基化的 5-甲基胞嘧啶保持不变。影响此过程的主要因素有修饰试剂的浓度、反应温度、反应环境的 pH 值及反应时间。其中任何一个环节出现问题都将导致 MSP 扩增失败，体会如下：

- (1)亚硫酸氢钠的浓度最好控制在 3.0~3.9 mol/L 为好，其 pH 值必须用 NaOH 精确调整至 5.0；
- (2)修饰时间应掌握在 10~16h，修饰时间过长会导致甲基化胞嘧啶也会转化成尿嘧啶且 DNA 模板破坏加剧，而时间过短会导致修饰不彻底；
- (3)反应温度应控制在 50~55℃(若用国产恒温水浴箱建议温度设定在 53℃为好)；
- (4)DNA 模板量应控制在<2ug 为宜。

只要遵循以上几点基本上能保证 99% 未甲基化的胞嘧啶转化尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变。但是，此修饰过程中模板 DNA 有约 96% 已经降解。当 DNA 样品较少时(如石蜡包埋组织、血清 DNA)，在纯化回收时可加入适量鲑鱼精 DNA 或糖原(约 1g)作为载体，有利于 DNA 沉淀(加入载体后轻轻晃动 Ependorf 管可见絮状 DNA 富集现象)。

二、甲基化特异 PCR 可能出现的问题与对策

1. 引物因素分析 MSP 的引物设计的质量是扩增成败的关键性因素。

MSP 的引物设计与普通的 PCR 引物设计不同，MSP 的引物设计原理是：模板 DNA 在经过亚硫酸盐处理后，发生甲基化的基因启动子区域 CpG 岛内 CpG 位点 5' 一端胞嘧啶保持不变；而未发生甲基化的 CpG 岛内 CpG 位点 5' 一端胞嘧啶转化为尿嘧啶，即 C-U。针对修饰前后的序列差异用 MethPrimer 软件设计甲基化与未甲基引物，进行 PCR 扩增。MSP 的引物序列中至少含有 1 个以上 CpG 位点，最好是含有多个 CpG 位点，这样可保证引物的特异性，同时可以提高 DNA 启动子甲基化碱基的检出率。MSP 的引物必须按亚硫酸氢钠处理后的 DNA 序列设计，同时也应该尽可能与普通 PCR 的引物设计原则相符合。按 MSP 的要求，任意 DNA 序列在做 MSP 扩增时，至少要合成 2 对引物，即甲基化引物与未甲基化引物。在 MSP 的未甲基化引物序列中前导引物不含鸟嘌呤碱基，反向引物不含胞嘧啶碱基。初涉及 MSP 者最好用文献引物进行研究。如果是为了筛选新的甲基化的抑癌基因而文献中无法找到的相应 MSP 引物，可用在线 MethPrimer 软件在线设计引物，网址为 <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>。根据软件提示可以找到所需要的 MSP 引物。但 MSP 所遇到的困难是，要扩增的是启动子或部分第一外显子序列，其 CG 含量相对较高，MSP 扩增难度加大，因此设计好的引物最好用引物软件如 Primer5.0 从理论上推测其扩增效率，对于扩增效率<30% 的引物要进行优化，方法是：在核心启动子区域前后反复调整甲基化前导引物扩增起始点，以期使引物扩增效率增高，降低扩增难度，从而提高 PCR 产量。

2. MSP 的反应体系问题 MSP 的反应体系的成分与普通 PCR 一样，反应体系的优化也与普通类似，反应体系的优化与普通 PCR 的反应体系中最大的区别是 DNA 模板不同。

经过修饰后的模板为单链状态，MSP 的 DNA 模板在抽提后应检测其纯度和含量，其纯度要求 A260/A280 在 1.8~2.0 之间；其含量要准确检测，否则在亚硫酸盐处理时因 DNA 模板加的太多而导致 DNA 处理不完全而导致 MSP 扩增失败；而加的 DNA 模板太少则一方面浪费试剂，另一方面会因为目的片段太少导致 MSP 假阴性。Mg²⁺浓度一般在 2.0~2.5 mmol/L 为

宜，过低过高都不利于扩增。此外，PCR 的缓冲液及 Taq 酶的来源也很重要，一般的 PCR 缓冲液常常会导致结果不稳定，不同来源的 Taq 酶也会影响结果的重复性。我们建议用 ROCHE 公司针对富含 CG 等复杂二级结构模板的 GC RICH KIT 效果较好。而一旦选用某一厂家 Taq 酶后，不要轻易更换，以免 MSP 因重新优化而引起的时间和成本的浪费。

3. MSP 的反应温度分析 MSP 扩增的结果有 3 种情况。

(1)产物电泳为阴性；(2)产物电泳出现多条非特异性条带(含目的基因条带)；(3)产物电泳为阳性(仅目的基因条带)。出现前 2 种情况时，可在保证反应体系和引物没有问题的情况下，通过调整 MSP 的反应温度而得到目的基因带。方法如下：PCR 反应中， T_m 的高低与 CG 含量呈正相关。因甲基化与未甲基化引物序列差异，在扩增过程中可能会出现 PCR 偏性。我们建议，提高预变性温度(一般应 $>95^{\circ}\text{C}$ ，10 min)和变性温度($>95^{\circ}\text{C}$ ，1 min)，退火温度以 60°C 作梯度或 70°C 作降落 PCR。

总之，在 MSP 全过程中，影响结果的因素较普通 PCR 要多得多，只要对实验过程每一步认真控制可完全提高 MSP 的准确度和精密度。