

鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化的检测方法^{*}

杨 春,褚文辉,路 晓,李春义^{**}

中国农业科学院特产研究所,特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室,长春 130112

摘 要: 以鹿茸干细胞为研究对象,分别采用甲基化敏感性扩增多态性(MSAP)和荧光标记甲基化敏感性扩增多态性(F-MSAP)方法对鹿茸干细胞进行全基因组 DNA 甲基化检测。结果表明:MSAP 方法共检测到 387 个位点,F-MSAP 方法共检测出 1 524 个位点。2 种方法所得结果中均发现 I 型条带数最多,III 型条带数最少。与 MSAP 方法比较,F-MSAP 方法在数据分析和实际操作过程中具有安全、高效、高通量、自动化等特点,更适用于检测鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化。

关键词: 甲基化敏感扩增多态性; 荧光标记甲基化敏感扩增多态性; DNA 甲基化; 鹿茸干细胞

中图分类号: S825.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2016)01-0097-05

DOI: 10.13327/j.jlau.2015.2636

引文格式: 杨春,褚文辉,路晓,等. 鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化的检测方法[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(1): 97-101.

Comparative Study on Methods of Genome-wide DNA Methylation Assay in Antler Stem Cells

YANG Chun, CHU Wenhui, LU Xiao, LI Chunyi^{**}

State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun 130112, China

Abstract: The methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) and the fluorescence-labeled methylation-sensitive amplification polymorphism (F-MSAP) are both modified AFLP (amplified fragment length polymorphism) techniques to investigate cytosine methylation in genomes. In F-MSAP system, selective amplification is fluorescently labeled and selective products could be detected by DNA sequencer. In the present study, MSAP and F-MSAP methods were used to analyze DNA methylation in antler stem cells. In MSAP and F-MSAP systems, a total of 387 and 1 524 fragments were detected, respectively, and type I fragments are the most frequent and type III fragments are the least frequent. The results show that compared to MSAP method, F-MSAP method had the main advantages of safety, high efficiency, high sensitivity and automation in the process of data analysis and operation. Overall, the present study reveals that the F-MSAP method was more suitable than MSAP method for detecting cytosine methylation in antler stem cells as well as deer.

Key words: MSAP; F-MSAP; DNA methylation; antler stem cell

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31402059)

作者简介: 杨春,男,博士,助理研究员,研究方向: 鹿茸生物学和分子遗传学。

收稿日期: 2015-04-17

** 通讯作者

在真核生物中,DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰方式,是在 DNA 甲基化转移酶的作用下将 S-腺苷硫酸中的甲基基团添加到 DNA 分子中的一种修饰过程^[1]。DNA 甲基化在生物基因组中广泛存在,在生命过程中起到重要调控作用。近年来,DNA 甲基化调控成为了组织和器官再生领域的研究热点。研究表明,DNA 甲基化对组织和器官的再生起到调控作用,如非洲爪蟾尾部再生^[2]、啮齿类脊髓再生^[3]、斑马鱼鳍再生^[4]、斑马鱼视网膜再生^[5]、肌肉再生^[6]和人毛囊再生^[7]等。

断肢再生是再生医学研究领域的热点。目前,断肢再生的研究还局限于蝾螈、爪蟾和斑马鱼这些低等动物,而低等动物与哺乳动物的遗传距离甚远并且再生形式不同,所以研究成果无法应用到哺乳动物断肢再生中。鹿茸是目前已知的唯一能够完全再生的哺乳动物附属器官^[8],因此将鹿茸作为哺乳动物断肢再生模型更有针对性。鹿茸每年春季由雄鹿的角柄上再生,角柄骨膜是鹿茸再生的关键组织^[9]。研究表明,鹿茸角柄骨膜细胞能够表达胚胎干细胞特征基因和分化成为多种细胞类型,因此鹿茸的再生是基于鹿茸干细胞的再生^[10]。鹿茸再生和 DNA 甲基化间也存在密切调控关系,能够获得鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化数据,将有助于揭示鹿茸再生的分子调控机制。

DNA 甲基化敏感性扩增片段多态性(Methylation sensitive amplified polymorphism,MSAP)技术是在 AFLP 技术基础上建立起来的一种检测动植物基因组 DNA 甲基化的方法。目前,MSAP 技术已广泛应用于动植物基因组 DNA 甲基化检测分析中,例如,昆虫、鸡和西瓜的基因组 DNA 甲基化检测^[11-13]。荧光标记 DNA 甲基化敏感性扩增片段多态性(Fluorescence-labeled methylation sensitive amplified polymorphism,F-MSAP)技术是一种改进的 MSAP 技术,是将 MSAP 中的选择扩增产物进行荧光标记。目前 F-MSAP 已经应用在鸡、猪、玉米基因组 DNA 甲基化检测中^[14-16]。

1 材料与方法

1.1 鹿茸干细胞基因组 DNA 的提取

将鹿茸干细胞按照细胞基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN)操作手册要求和方法进行 DNA

提取及纯化,结果于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,Biophotometer 分光光度计(Eppendorf)检测浓度。

1.2 引物与接头

接头和引物参考 Yang 方法设计^[15]。引物与接头由上海生工生物工程公司合成(表 1)。

1.3 MSAP 和 F-MSAP

取 2 份鹿茸干细胞 DNA 250 ng (100 ng/ μ L),同时进行 *Hpa* II/*Eco*R I 和 *Msp* I/*Eco*R I 酶切,体系如下:DNA 250 ng,*Eco*R I 10 U,*Hpa* II 和 *Msp* I 各 20 U,37 °C 8 h,水浴 65 °C 20 min 灭活,酶切产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。酶切产物用 T_4 DNA Ligase 与接头进行连接。连接产物稀释 20 倍作为预扩增模版进行扩增,预扩增引物见表 1。预扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min;16 °C 保存。反应结束后,预扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。将预扩增产物稀释 10 倍作为选择性扩增模板,选择性扩增引物序列见表 1,扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,65 °C 30 s(每循环降低 0.7 °C),72 °C 1 min,13 个循环;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,23 个循环;72 °C 延伸 7 min,16 °C 保存,选择性扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。所有限制性内切酶均购于 Thermo 公司,PCR 聚合酶购于 TaKaRa 公司。

表 1 引物和接头序列

Table 1. Sequences of primers and adapters

引物/接头	序列
<i>Eco</i> R I 接头	5'-CTCGTAGACTCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
E + 1 预扩增引物	5'-GACTGCGTACCAATTC + A-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + AAC-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + AAG-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + ACA-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + AGT-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + ATC-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + ACT-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + AGA-3' 5'-GACTGCGTACCAATTC + ATG-3'
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I 接头	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3' 3'-CTACTCAGATCTTGC-5'
HM + 1 预扩增引物	5'-GATGAGTCTAGAACGG + T-3'
HM + 3 选择性扩增引物	5'-FAM-GATGAGTCTAGAACGG + TAC-3' 5'-FAM-GATGAGTCTAGAACGG + TAG-3'

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(MSAP)

在 90 mL 5% 聚丙烯酰胺胶中加入 10% APS 320 μ L, TEMED 80 μ L, 90 W 预电泳 30 min。取 MSAP 产物 5 μ L, 加入同体积的变性缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰上放置 10 min, 上样。60 W 电泳, 直到溴酚蓝到达板底部, 时间约为 3.5 h 进行银染。

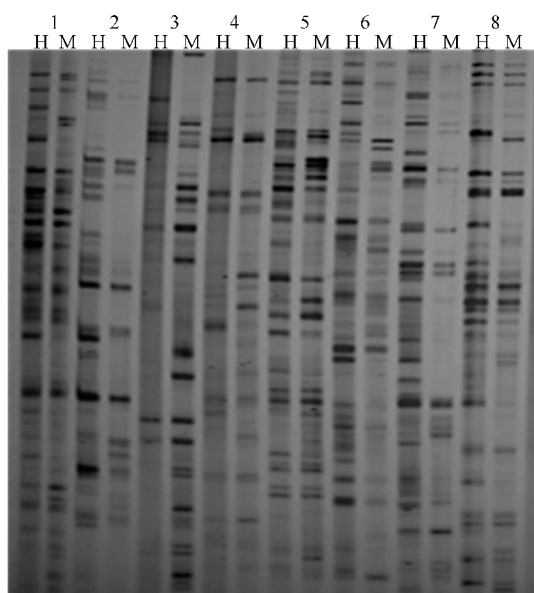
1.5 ABI 3730xl 测序仪毛细管电泳(F-MSAP)

F-MSAP 产物在 ABI 3730xl 测序仪上进行毛细管电泳检测, 具体步骤: 将 5 μ L 选择扩增样品分别加入 96 孔板中, 加入 0.25 μ L ROX500 分子量内标, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰上放置 10 min, 进行毛细管电泳。数据结果通过 GeneScan 3.0 软件以 Excel 表格形式输出, 最后通过自主开发的 MSA 分析软件对荧光图谱进行数据统计。

2 结果

2.1 鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化 MSAP 检测结果

利用 16 对引物对 DNA 酶切产物进行了选择性扩增, 通过 MSAP 技术对选择性扩增产物进行检测, 由于引物数量较多, 只展示部分结果(图 1)。

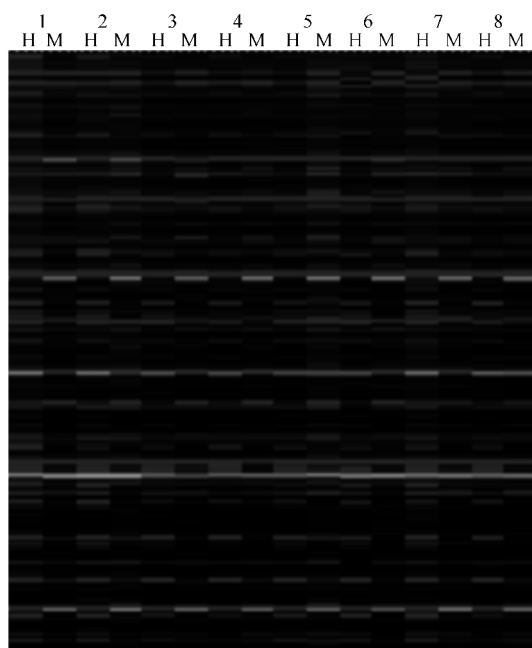


1~8. 引物; H. *Hpa* II/*Eco*R I 双酶切; M. *Msp* I/*Eco*R I 双酶切

图 1 MSAP 图谱
Fig. 1. MSAP profiles

2.2 选择性扩增产物荧光标记的 F-MSAP 图谱

F-MSAP 产物在 ABI 3730xl 测序仪上进行毛细管电泳, 电泳结束后, 数据通过 GeneScan 3.0 软件进行初步分析, 最终 F-MSAP 数据以 Excel 表格形式输出。F-MSAP 图谱见图 2。



1~8. 引物; H. *Hpa* II/*Eco*R I 双酶切; M. *Msp* I/*Eco*R I 双酶切

图 2 F-MSAP 图谱
Fig. 2. F-MSAP profiles

2.3 MSAP 和 F-MSAP 数据统计

在 MSAP 的数据统计过程中, MSAP 通过聚丙烯酰胺凝胶对产物进行分离, 人工进行数据统计, 再通过手动计算, 最后统计得出 DNA 甲基化水平。而 F-MSAP 体系中, 产物通过毛细管电泳分离后, 数据通过 Genscan 3.0 软件处理后以 Excel 表格的形式输出, 无需人工进行统计, 能够更直观和准确的得到分析数据, 此外, 针对 F-MSAP 输出数据开发了数据分析软件(MSA), 缩短了数据分析时间, 提高了数据的准确性。MSAP 和 F-MSAP 数据统计结果分别见表 2 和表 3。

在 MSAP 和 F-MSAP 检测体系中, 基因组 DNA 被同裂酶酶切后能够得到 3 种类型甲基化片段: I 型, 同一样品 2 种酶切组合中都出现的条带(非甲基化条带); II 型, 只出现在 *Hpa* II 泳道中的条带(半甲基化条带); III 型, 只出现在 *Msp* I 酶切泳道中的条带(全甲基化条带)。

表 2 MSAP 分析结果
Table 2. Analysis results of MSAP

引物编号	总带数	I 型带数	II 型带数	III 型带数
1	29	19	4	6
2	33	18	11	4
3	25	14	5	6
4	19	11	4	4
5	38	24	8	6
6	27	17	8	3
7	22	9	9	4
8	26	17	5	4
9	16	9	3	4
10	30	20	7	3
11	18	10	4	4
12	19	9	6	4
13	25	15	3	7
14	24	10	8	4
15	17	10	4	3
16	29	17	6	6
总计	387	203	95	89

表 3 F-MSAP 分析结果
Table 3. Analysis results of F-MSAP

引物编号	总带数	I 型带数	II 型带数	III 型带数
1	86	37	35	14
2	82	45	33	4
3	104	46	44	14
4	102	49	39	14
5	95	44	31	20
6	86	35	30	21
7	95	47	23	25
8	88	49	23	16
9	98	43	40	15
10	86	39	26	21
11	91	40	27	24
12	49	31	12	6
13	111	57	33	21
14	117	49	41	27
15	116	71	27	18
16	108	58	30	20
总计	1 524	740	494	290

同一样品经过 2 种方法检测后,对数据进行

统计。MSAP 技术检测中,在胶板共找到 387 个位点,其中 I 型条带 203 个,II 型条带 95 个,III 型条带 89 个。在 F-MSAP 技术中,共检测到 1 524 个位点,其中, I 型条带 740 个,II 型条带 494 个,III 型条带 290 个。在 F-MSAP 中 16 对引物所得条带数为 49 ~ 117,MSAP 条带数为 16 ~ 38。2 组数据中均发现, I 型条带数最多,III 型条带数最少。结果表明 MSAP 和 F-MSAP 方法都能应用到鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化检测中,而且 F-MSAP 方法中得到的条带更多,对于后面的结果统计更精确。

3 讨 论

鹿茸是目前已知的唯一可周期再生的哺乳动物附属器官。目前对鹿基因组还未测定,所以鹿茸再生的分子生物学调控机制,尤其是表观遗传学调控机制还知之甚少。如果获得鹿茸再生前后鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化数据,将有可能揭示鹿茸再生的调控机制。MSAP 是一种全基因组 DNA 甲基化技术,是一种经过修饰的 AFLP 技术^[9],目前已经广泛应用在各种动植物基因组 DNA 甲基化研究中,并且被证明是一种能够高效检测基因组 DNA 甲基化方法^[17-18]。在 MSAP 技术中用同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 代替了 AFLP 技术中的 *Mse* I,对基因组进行酶切。同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 能够识别基因组中 CCGG 片段中的胞嘧啶甲基化位点,但这 2 种酶对胞嘧啶位点具有不同甲基化的敏感性,所以通过这 2 种酶分别对基因组进行酶切后就可以产生不同的甲基化条带。甲基化条带与接头连接后通过引物进行 PCR 扩增,最终获得特异性甲基化敏感条带。理论上讲, AFLP 技术推动 MSAP 技术的发展。Huang 和 Sun^[19]在 1999 年应用荧光标记方法改良了 AFLP 技术取得了具有更高可辨性结果,与传统的方法比较能够多检测出 10% ~ 30% 的多态性条带。在 MSAP 和 F-MSAP 实际操作过程中发现,MSAP 在银染过程中存在更多的人为因素,这些因素能够导致银染胶中出现条带模糊现象和重复性差,因而影响最终数据的准确性。而 F-MSAP 技术很少有人为因素参与,其结果不仅重复性非常好,而且可以通过软件自动完成统计,避免了人为统计的错误。很多研究也证明,通过改进的荧光标记系统具有更安全、更灵敏、更便于操作的特点。所

以通过荧光标记的方法对 MSAP 进行改进就形成了现在的 F-MSAP 技术。因此 F-MSAP 方法更适合用于鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化和其他物种基因组 DNA 甲基化检测。

本研究首次应用 MSAP 和 F-MSAP 技术检测了鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化水平。结果表明 F-MSAP 方法相对于 MSAP 方法具有以下优点: 选择性扩增引物通过荧光标记并结合自动化的 DNA 测序仪, 更好地提高了对扩增产物的分辨率和检测结果; 扩增片段不受胶条大小的限制, 所有片段能够更好地完成分离; 无需进行银染操作, 更加安全和快捷, 提高了试验的灵活性, 可以在任何时间进行片段扩增和进行 F-MSAP 检测, 与 MSAP 技术对比, 节省了大量的试验时间; 通过 DNA 测序仪对样品进行检测, 使几乎所有的扩增片段都可以通过荧光信号检测出来, 增加了数据的准确性。杨春^[20]利用 MSAP 和 F-MSAP 方法, 分析比较了猪肌肉组织 DNA 甲基化, 结果表明 F-MSAP 比 MSAP 技术存在优越性, 本研究结果与其相同。综上所述, 相对于 MSAP 技术, F-MSAP 技术在实际应用中具有更加安全、高通量、高分辨率等优点。另外, 通过自主开发的软件对 F-MSAP 数据进行分析节省时间, 避免人工统计中出现的人为错误, 使数据的统计更加准确。所以 F-MSAP 更适合应用到对鹿茸干细胞及其他物种的基因组 DNA 甲基化检测中, 为今后深入研究鹿茸再生与表观遗传学间相互关系奠定了基础。

参考文献:

- [1] 谭建新, 孙玉洁. 表观基因组学研究方法与评价[J]. 遗传, 2009, 31(1): 3-12.
- [2] Yakushiji N, Suzuki M, Satoh A, et al. Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians[J]. Developmental Biology, 2007, 312(1): 171-182.
- [3] Iskandar B J, Rizk E, Meier B, et al. Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation[J]. Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(5): 1603-1616.
- [4] Hirose K, Shimoda N, Kikuchi Y. Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin[J]. Epigenetics, 2013, 8(9): 899-906.
- [5] Powell C, Elsaecidi F, Goldman D. Injury-dependent Muller glia and ganglion cell reprogramming during tissue regeneration requires Apobec2a and Apobec2b[J]. J Neurosci, 2012, 32(3): 1096-1109.
- [6] Tyaqi S C, Joshua I G. Exercise and nutrition in myocardial matrix metabolism, remodeling, regeneration, epigenetics, microcirculation, and muscle[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92: 521-523.
- [7] Stocum D L. Regenerative biology and medicine[M]. New York: Academic Press, 2012.
- [8] Li C Y, Mackintosh C G, Martin S K, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion[J]. Cell and Tissue Research, 2007, 328: 65-75.
- [9] Li C Y, Yang F H, Sheppard A. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration-Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers[J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4: 237-251.
- [10] 张梅, 陈佳林, 周晓穗, 等. MSAP 在水稻害虫白背飞虱中的应用研究[J]. 中山大学学报, 2015, 54(1): 98-102.
- [11] 李金龙, 唐韶青, 赵萌, 等. 北京油鸡肌肉和卵巢组织基因组 DNA 甲基化状态检测与分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(11): 1784-1792.
- [12] 朱红菊, 刘文革, 赵胜杰, 等. NaCl 胁迫下二倍体和同源四倍体西瓜幼苗 DNA 甲基化差异分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 4045-4055.
- [13] Xu Q, Zhang Y, Sun D, et al. Analysis on DNA methylation of various tissues in chicken[J]. Anim Biotechnol, 2007, 18(4): 231-241.
- [14] Zhang Yonghong, Guo Jiang, Gao Yan, et al. Genome-wide methylation changes are associated with muscle fiber density and drip loss in male three-yellow chickens[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(5): 3214-3216.
- [15] Yang C, Zhang M J, Niu W P, et al. Analysis of DNA methylation in various swine tissues[J]. Plos One, 2011, 6(1): e16229.
- [16] Lu Y L, Rong T Z, Cao M J. Analysis of DNA methylation in different maize tissues[J]. J Genet Genomics, 2008, 35(1): 41-48.
- [17] Vanyushin B F. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell[J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 70: 488-499.
- [18] 杨春, 刘振, 路晓, 等. 鹿茸干细胞 MSAP 分析技术体系的建立及引物筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(4): 463-468.
- [19] Huang J, Sun M. A modified AFLP with fluorescence-labeled primers and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants[J]. Biotechnol Tech, 1999, 13: 277-278.
- [20] 杨春. 猪不同组织和不同品种肌肉组织基因组 DNA 甲基化分析[D]. 长春: 吉林大学, 2011.

(责任编辑: 林海涛)