



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102321745 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110224449. 2

(22) 申请日 2011. 08. 05

(66) 本国优先权数据

201010515336. 3 2010. 10. 14 CN

(71) 申请人 博尔诚(北京)科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
永昌北路甲7号4幢3层

(72) 发明人 夏东元

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

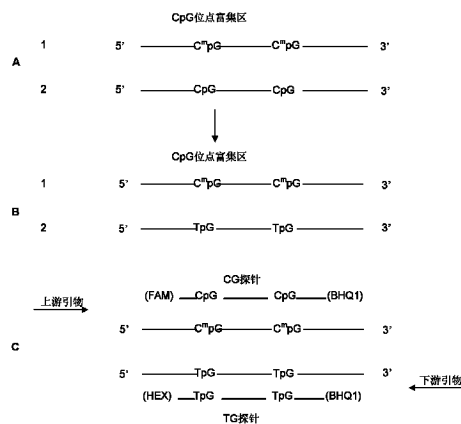
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法及试剂盒。本发明提供的方法,包括:1) 针对待测 DNA 序列设计 PCR 引物,用于扩增待测 DNA ;2) 针对 1) 中扩增得到的 PCR 产物中的 CpG 位点富集区设计一对 TaqMan 探针,其中一条是针对 CpG 位点完全甲基化的 DNA 设计的 CG 探针,另外一条是针对 CpG 位点完全非甲基化的 DNA 设计的 TG 探针,用于特异地与 PCR 产物结合并检测 PCR 产物 ;和 3) 采用 1) 设计的引物和 2) 设计的探针进行实时定量 PCR,检测待测 DNA 的甲基化程度。本发明的方法可以针对特定甲基化位点进行检测,而其他位点的甲基化状态并不影响检测结果。由此制成的试剂盒,可以用于检测 DNA 特定位点甲基化程度。



1. 一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法,其特征在于,所述方法包括:

1) 针对待测 DNA 序列设计 PCR 引物,用于扩增待测 DNA;

2) 针对 1) 中扩增得到的 PCR 产物中的 CpG 位点富集区设计一对 TaqMan 探针,其中一条是针对 CpG 位点完全甲基化的 DNA 设计的 CG 探针,另外一条是针对 CpG 位点完全非甲基化的 DNA 设计的 TG 探针,用于特异地与 PCR 产物结合并检测 PCR 产物;和

3) 采用 1) 设计的引物和 2) 设计的探针进行实时定量 PCR,检测待测 DNA 的甲基化程度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述待测 DNA 先经过化学处理;优选地,所述化学处理为重亚硫酸盐处理。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述步骤 1) 设计的 PCR 引物为兼并引物,其中对应 CpG 位点处的碱基设计为 CG/TG;优选地,所述步骤 2) 中设计的 CG 探针和 TG 探针长度相同,且二者只在 CpG 位点存在差异,其中 CG 探针中所有的对应甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 CG,而 TG 探针中所有的对应非甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 TG。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 可以通过检测到的双探针的 Cq 值,计算待测 DNA 中特定位点的甲基化程度,并且所述甲基化程度分值 (MS) 通过下式计算:

$$MS = 100 / [1 + 2^{(CqM - CqU)}]$$

其中 CqM 和 CqU 分别为 CG 探针和 TG 探针检测的 Cq 值。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中设计的 TaqMan 探针的荧光标记物位于探针的 5' 端,所述荧光标记物优选选自 FAM 和 HEX;优选地,所述步骤 2) 中设计的 TaqMan 探针的 3' 端与荧光淬灭基团相连,所述淬灭基团优选选自 BHQ1。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中的实时定量 PCR 为 TaqMan 法。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其特征在于,所述待测 DNA 可以来源于任何生物样品;优选地,所述待测 DNA 选自细胞、组织(包括蜡块组织)、血液、血清、血浆、唾液、精液、尿液,粪便及其他分泌物。

8. 一种用于定量检测 DNA 特定甲基化程度位点的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:1) 针对待测 DNA 序列设计的 PCR 引物,用于扩增待测 DNA;和 2) 针对 1) 中扩增得到的 PCR 产物中的 CpG 位点富集区设计的一对 TaqMan 探针,其中一条是针对 CpG 位点完全甲基化的 DNA 设计的 CG 探针,另外一条是针对 CpG 位点完全非甲基化的 DNA 设计的 TG 探针,用于特异地与 PCR 产物结合并检测 PCR 产物;优选地,所述试剂盒还包括重亚硫酸盐,用于对待测 DNA 预先进行化学处理。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中包括的 PCR 引物为兼并引物,其中对应 CpG 位点处的碱基设计为 CG/TG。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中包括的 TaqMan 探针中,CG 探针和 TG 探针长度相同,且二者只在 CpG 位点存在差异,其中 CG 探针中所有的对应甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 CG,而 TG 探针中所有的对应非甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 TG;优选地,所述 TaqMan 探针的荧光标记物位于探针的 5' 端,所述荧光标记物优

选自 FAM 和 HEX ;和 / 或优选地,所述 TaqMan 探针的 3' 端与荧光淬灭基团相连,所述淬灭基团优选选自 BHQ1。

一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 DNA 甲基化的方法及试剂盒,尤其是一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] DNA 甲基化是表观遗传学 (Epigenetics) 的重要组成部分,在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及人类肿瘤发生中起着重要作用,是目前新的研究热点之一。

[0003] DNA 甲基化是最早发现的基因表观修饰方式之一,存在于所有生物的 DNA 遗传物中。DNA 甲基化能关闭或启开某些基因的活性,去甲基化则诱导或钝化了基因的重新活化和表达。甲基化的主要形式有 5- 甲基胞嘧啶, N6- 甲基腺嘌呤和 7- 甲基鸟嘌呤。原核生物中 CCA/TGG 和 GATC 常被甲基化,而真核生物中甲基化仅发生于胞嘧啶。DNA 的甲基化是在 DNA 甲基化转移酶 (DNMTs) 的作用下使 CpG 二核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为 5' 甲基胞嘧啶。这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列,但是它调控了基因的表达^[1]。脊椎动物基因的甲基化状态有三种:持续的低甲基化状态,如管家基因;去甲基化状态,如发育阶段中的一些基因;高度甲基化状态,如女性的一条失活的 X 染色体^[2]。

[0004] 在哺乳动物中, CpG 序列在基因组中出现的频率仅有 1%,远低于基因组中的其它双核苷酸序列。但在基因组的某些区域中, CpG 序列密度很高,可以达均值的 5 倍以上,成为鸟嘌呤和胞嘧啶的富集区,形成所谓的 CpG 岛^[3]。通常, CpG 岛大约含有 500 多个碱基。在哺乳动物基因组中约有 4 万个 CpG 岛,而且只有 CpG 岛的胞嘧啶能够被甲基化^[4], CpG 岛通常位于基因的启动子区或是第一个外显子区^[5]。健康人基因组中, CpG 岛中的 CpG 位点通常是处于非甲基化状态,而在 CpG 岛外的 CpG 位点则通常是甲基化的。这种甲基化的形式在细胞分裂的过程中能够稳定的保留^[6]。当肿瘤发生时,抑癌基因 CpG 岛以外的 CpG 序列非甲基化程度增加,而 CpG 岛中的 CpG 则呈高度甲基化状态,以致于染色体螺旋程度增加及抑癌基因表达的丢失。

[0005] 甲基化状态的改变是引起肿瘤的一个重要因素,这种变化包括基因组整体甲基化水平降低和 CpG 岛局部甲基化水平的异常升高,从而导致基因组的不稳定和抑癌基因的不表达。如果抑癌基因中有活性的等位基因失活,则发生癌症的机率提高^[7]。因此,甲基化的研究,为肿瘤的早期预测、分类、分级及预后评估提供了新的依据。

[0006] 随着对甲基化研究的不断深入,各种各样甲基化检测方法被开发出来以满足不同类型研究的要求。这些方法概括起来可分为三类:序列检测法,甲基化 DNA 特异性内切酶法和化学法。

[0007] Eads 等^[8]2000 年报道的荧光法利用实时 PCR (Real-time PCR) 检测特定位点甲基化的情况,其过程如下:先用重亚硫酸盐处理待测 DNA 片段。设计一个能与待测位点区互补的探针,探针的 5' 端连接报告荧光, 3' 端连接淬灭荧光,随后进行实时定量 PCR。如果探针能够与 DNA 杂交,则在 PCR 用引物延伸时, TaqDNA 聚合酶 5' 到 3' 端的外切酶活性会将探针序列上 5' 端的报告荧光切下,淬灭荧光不再能对报告荧光进行抑制,使得报告荧光发

光,检测每个循环报告荧光的强度即可得到该位点的甲基化情况及水平;同理,若标记的探针未能与 DNA 杂交,则引物延伸不能跳过未甲基化位点,报告荧光不被切下,不发光。同样的方法,也可对引物进行荧光标记,并通过不同标记的组合,检测多个位点的甲基化水平。高敏感、快速是本方法最显著的特点,而且可以做多样本、多基因位点的快速分析。此外其具备可重复、所需样本量少、不需要电泳分离的特点,可以为临床标本的分子生物学研究提供可靠的技术支持。

[0008] 基于上述设计理念,通常采用一条甲基化探针对样本特异位点进行甲基化检测,以特定位点甲基化绝对量作为甲基化程度评定的标准。但是在实际临床应用过程中,由于难以获得均一的完全病变的临床样本,因此在上述实时 PCR 检测过程中,不可避免的在病变样本中掺入了正常样本的甲基化或非甲基化因素,造成甲基化程度判定的误差,从而影响了检测结果的准确性。在这种情况下,上述实时 PCR 检测特定位点甲基化的方法就受到了限制。

发明内容

[0009] 因此,本发明的目的是提供一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法。

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的试剂盒。

[0011] 本发明的方法是通过以下技术方案来实现的。一方面,本发明提供一种定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的方法,所述方法包括:1) 针对待测 DNA 序列设计 PCR 引物,用于扩增待测 DNA;2) 针对 1) 中扩增得到的 PCR 产物中的 CpG 位点富集区设计一对 TaqMan 探针,其中一条是针对 CpG 位点完全甲基化的 DNA 设计的 CG 探针,另外一条是针对 CpG 位点完全非甲基化的 DNA 设计的 TG 探针,它们可以特异地与 PCR 产物结合并检测 PCR 产物;3) 利用设计的引物和探针进行实时定量 PCR,检测待测 DNA 的甲基化程度。

[0012] 优选地,所述待测 DNA 先经过化学处理;更优选地,所述化学处理为重亚硫酸盐处理。

[0013] 优选地,所述步骤 1) 中设计的 PCR 引物为兼并引物,其中对应 CpG 位点处的碱基设计为 CG/TG,这样的引物可以对甲基化或者非甲基化的待测 DNA 均进行扩增。

[0014] 优选地,所述步骤 2) 中设计的 CG 探针和 TG 探针长度相同,且二者只在 CpG 位点处存在差异,其中 CG 探针中所有的对应甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 CG,而 TG 探针中所有的对应非甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 TG。

[0015] 优选地,所述步骤 3) 可以通过检测到的双探针的 Cq 值,计算待测 DNA 中特定位点的甲基化程度,并且所述甲基化程度分值 (Methylation score, MS) 通过下式计算:

$$[0016] \quad MS = 100 / [1 + 2^{(CqM - CqU)}]$$

[0017] 其中 CqM 和 CqU 分别为 CG 探针和 TG 探针检测的 Cq 值。

[0018] 优选地,所述步骤 2) 中设计的 TaqMan 探针的荧光标记物位于探针的 5' 端;更优选地,所述荧光标记物选自 FAM 和 HEX。

[0019] 优选地,所述步骤 2) 中设计的 TaqMan 探针的 3' 端与荧光淬灭基团相连;优选地,所述淬灭基团选自 BHQ1。

[0020] 优选地,所述步骤 3) 中的实时定量 PCR 为 TaqMan 法。

[0021] 优选地,所述待测 DNA 可以来源于任何生物样品;更优选地,所述待测 DNA 选自细

胞、组织（包括石蜡包埋组织）、血液、血清、血浆、唾液、精液、尿液、粪便、及其他分泌物。

[0022] 另一方面，本发明提供一种用于定量检测 DNA 特定位点甲基化程度的试剂盒，所述试剂盒包括：1) 针对待测 DNA 序列设计的 PCR 引物，用于扩增待测 DNA；和 2) 针对 1) 中扩增得到的 PCR 产物中的 CpG 位点富集区设计的一对 TaqMan 探针，其中一条是针对 CpG 位点完全甲基化的 DNA 设计的 CG 探针，另外一条是针对 CpG 位点完全非甲基化的 DNA 设计的 TG 探针，它们可以特异地与 PCR 产物结合并检测 PCR 产物。

[0023] 优选地，所述试剂盒还包括重亚硫酸盐，用于对待测 DNA 预先进行化学处理。

[0024] 优选地，所述试剂盒还包括实时定量 PCR 所需的 DNA 聚合酶、氯化镁、dNTP 和缓冲液等。

[0025] 优选地，所述试剂盒中包括的 PCR 引物为兼并引物，其中所包含的 CpG 位点处序列设计为 CG/TG，能够同时扩增甲基化和非甲基化的待测 DNA。

[0026] 优选地，所述试剂盒中包括的 CG 探针和 TG 探针长度相同，且二者只在 CpG 位点存在差异，其中 CG 探针中所有对应甲基化 CpG 位点处的碱基都设计为 CG，而 TG 探针中所有对应非甲基化 CpG 位点处的碱基都设计成 TG。优选地，所述试剂盒中包括的 TaqMan 探针的荧光标记物位于探针的 5' 端；更优选地，所述荧光标记物选自 FAM 和 HEX。

[0027] 优选地，所述试剂盒中包括的 TaqMan 探针的 3' 端与荧光淬灭基团相连；优选地，所述淬灭基团选自 BHQ1。

[0028] 优选地，所述待测 DNA 可以来源于任何生物样品；更优选地，所述待测 DNA 选自细胞、组织（包括石蜡包埋组织）、血液、血清、血浆、唾液、精液、尿液、粪便、及其他分泌物。

[0029] 综上所述，本发明提供一种利用特异的不含甲基化位点的引物扩增待测的甲基化 DNA，同时利用双探针和 PCR（多聚酶链反应）产物相结合并通过实时定量 PCR 对 DNA 特定位点的甲基化进行定量分析的方法及其相应的试剂盒。具体地，所述方法包括以下步骤：1) 针对待测 DNA 设计引物，该引物可同时扩增预先用重亚硫酸盐处理过的甲基化和非甲基化 DNA 片段；2) 设计一对 CG 和 TG 荧光标记探针，这对探针可以分别和甲基化或非甲基化的 PCR 产物结合，检测 PCR 所有产物；以及 3) 通过实时定量 PCR 检测重亚硫酸盐处理过的 DNA 片段的甲基化程度。基于所述方法而制备的试剂盒包括以下成分：1) 针对待测序列设计的特异 PCR 引物；2) 针对甲基化和非甲基化的 PCR 产物设计的 CG 和 TG 的双探针；以及 3) 用于对待测 DNA 预先进行化学处理的重亚硫酸盐。

[0030] 由此可见，本发明提供了一种简便的实时定量 PCR 方法，用于检测 DNA 特定位点的甲基化状态，尤其是在 CpG 岛中检测特定位点的甲基化程度。具体地，本发明的方法利用针对已知的 DNA 序列设计 PCR 引物将待检测的序列扩增出来；同时利用一对 TaqMan 探针与甲基化或非甲基化的 PCR（多聚酶链反应）产物相结合，并通过实时定量 PCR 对待测样本 DNA 的甲基化程度进行分析，具体方法原理图见图 1。采用本发明的方法检测的结果只和特定甲基化位点相关，而与其他位点无关，并且其他位点的甲基化状态并不影响检测结果。重要的是，本发明能对非均一样本进行甲基化程度的判定。在这种情况下，采用本发明的方法和试剂盒对特定甲基化位点进行检测，就能够有效地排除待测样本中正常样本的干扰，确保检测结果的准确性。

附图说明

[0031] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0032] 图 1 为本发明提供的利用双探针与特异引物的实时定量 PCR 法检测 CpG 岛内特定位点甲基化方法的原理图,其中 A 显示,以待检测序列的 CpG 位点富集区为检测位点,其中可能是甲基化或非甲基化的 C;B 显示,化学处理后的特异位点序列;C 显示,针对 CpG 位点富集区的一对探针中,CG 探针有与甲基化 C 序列相同的 C, TG 有和非甲基化 C 转化为 T 后序列相同的 T。

[0033] 图 2 为实施例 1 中针对特异甲基化位点设计的引物的 PCR 结果。

[0034] 图 3 为实施例 1 中进行实时定量 PCR 反应的结果图。其中 A 为采用 CG 探针检测结肠癌样本的结果;B 为采用 TG 探针检测结肠癌样本的结果;C 为采用 CG 探针检测正常结肠样本的结果;D 为采用 TG 探针检测正常结肠样本的结果。

具体实施方式

[0035] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0036] 实施例 1

[0037] Vimentin 基因 MSP29 位点的甲基化和结肠癌有明显的相关性。本实施例采用本发明提供的方法,检测该基因的甲基化程度,具体详述如下。

[0038] 1)DNA 重亚硫酸盐处理

[0039] 提取 200ug 正常结肠或结肠癌样本的 DNA。

[0040] 采用重亚硫酸盐处理和转化(采用甲基化 DNA 转化试剂盒 K5082100, BioChain Institute Inc. Hayward, CA94545USA)提取的 DNA 样品,结肠癌样本标示为样品 1,正常结肠样本标示为样品 2。

[0041] 将所有的未甲基化的 C 完全转化为 T,转化后的 DNA 保存于 -20℃。

[0042] 2) 设计针对特异甲基化位点的引物

[0043] 设计能够同时扩增甲基化和非甲基化模板待检测特定甲基化位点片段的上下游引物(由上海博尚生物技术有限公司合成),序列如下:

[0044] 正向引物:5' -GGCGGGTTTAGTTTTTGT -3'

[0045] 反向引物:5' -ACACGAACCTAATAAACATAACTAC-3'

[0046] 使用该引物对重亚硫酸盐处理过的 DNA 片段进行 PCR。

[0047] PCR 反应体系:氯化镁 3mM, dNTP 各 0.2mM, 上下游引物各 0.25uM, DNA 聚合酶 1.5U, 模板 DNA 50ng。

[0048] PCR 反应条件:95℃ 10 分钟;(95℃ 30 秒,56℃ 30 秒,72℃ 30 秒)×40 次循环;72℃ 5 分钟。

[0049] 无论在 MSP29 位点是否发生甲基化,DNA 片段经引物扩增均能产生 178bp 的 PCR 产物,电泳检测结果见图 2,其中 1 为正常结肠样本 DNA,2 为结肠癌样本 DNA。

[0050] 3) 设计 CG 探针和 TG 探针

[0051] 在 2) 中的两个引物之间设计探针,用于实时定量 PCR 分析。以 CpG 位点完全甲基化或完全非甲基化为模板设计一对探针,CG 探针在 CpG 位点的碱基设计为 CG,用于检测甲基化产物,TG 探针在 CpG 位点的碱基设计为 TG,用于检测非甲基化产物。两种探针分别用

FAM 和 HEX 荧光标记。探针序列（由上海博尚生物技术有限公司合成）如下：

[0052] CG 探针 :5' -FAM-TCGTTTCGAGGTTTTTCGCGTTAG-BHQ1-3'

[0053] TG 探针 :5' -HEX-TTGTTTTGAGGTTTTTGTGTTAGAGATG-BHQ1-3'

[0054] 4) 实时定量 PCR

[0055] PCR 反应是用等摩尔的引物和探针同时包括 dNTP 和 DNA 聚合酶。

[0056] PCR 反应体系 :氯化镁 3mM, dNTP 各 0. 2mM, 上下游引物各 0. 25uM, 探针 0. 25uM, DNA 聚合酶 1. 5U。

[0057] PCR 反应条件 :95℃ 10 分钟 ;(95℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒) × 40 次循环

[0058] 结果见图 3。其中 A 所示为采用 CG 探针（特异性检测甲基化的模板）检测结肠癌样本的结果, B 所示为采用 TG 探针（特异性检测非甲基化的模板）检测结肠癌样本的结果, 由于结肠癌样本中 DNA 甲基化程度较高, 因此 CG 探针测定 C_q 值较低而 TG 探针测定 C_q 值较高。C 所示为采用 CG 探针（特异性检测甲基化的模板）检测正常结肠样本的结果, D 所示为采用 TG 探针（特异性检测非甲基化的模板）检测正常样本的结果, 正常结肠样本 DNA 甲基化程度很低, 因此 CG 探针测定 C_q 值较高而 TG 探针测定 C_q 值较低。按照前述的甲基化程度分值 (MS) 公式计算, 结肠癌组织中 MS = 88. 89, 正常结肠组织中 MS = 1. 11。可见, 两种探针测定的 C_q 值比较明显地反映出样本甲基化程度的不同。

[0059] 参考文献

[0060] [1] Dahl C, Guldborg P. DNA methylation analysis techniques [J]. Biogerontology, 2003, 4(4) :233-250.

[0061] [2] 董玉玮, 侯进慧, 朱必才等. 表观遗传学的相关概念和研究进展 [J]. 生命的化学, 2005, 22(1) :1-3.

[0062] [3] 武立鹏, 朱卫国. DNA 甲基化的生物学应用及检测方法进展 [J]. 中国检验医学杂志, 2004, 27(7) :468-474.

[0063] [4] Riggs A D, Jones P D. 5-methylcytosine, gene regulation and cancer [J]. Adv Cancer Res, 1984, 40 :1-30.

[0064] [5] Bird A P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation [J]. Nature, 1986, 321 :209-213.

[0065] [6] Cottrell S E. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology [J]. Clin Biochem, 2004, Jul, 37(7) :595-604.

[0066] [7] Feinberg A P, Tycko B. The history of cancer epigenetic [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2) :143-153.

[0067] [8] Eads C A, Danenberg K D, Kawakami K, et al. MethyLight : a high throughput assay to measure DNA methylation [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28 :E32.

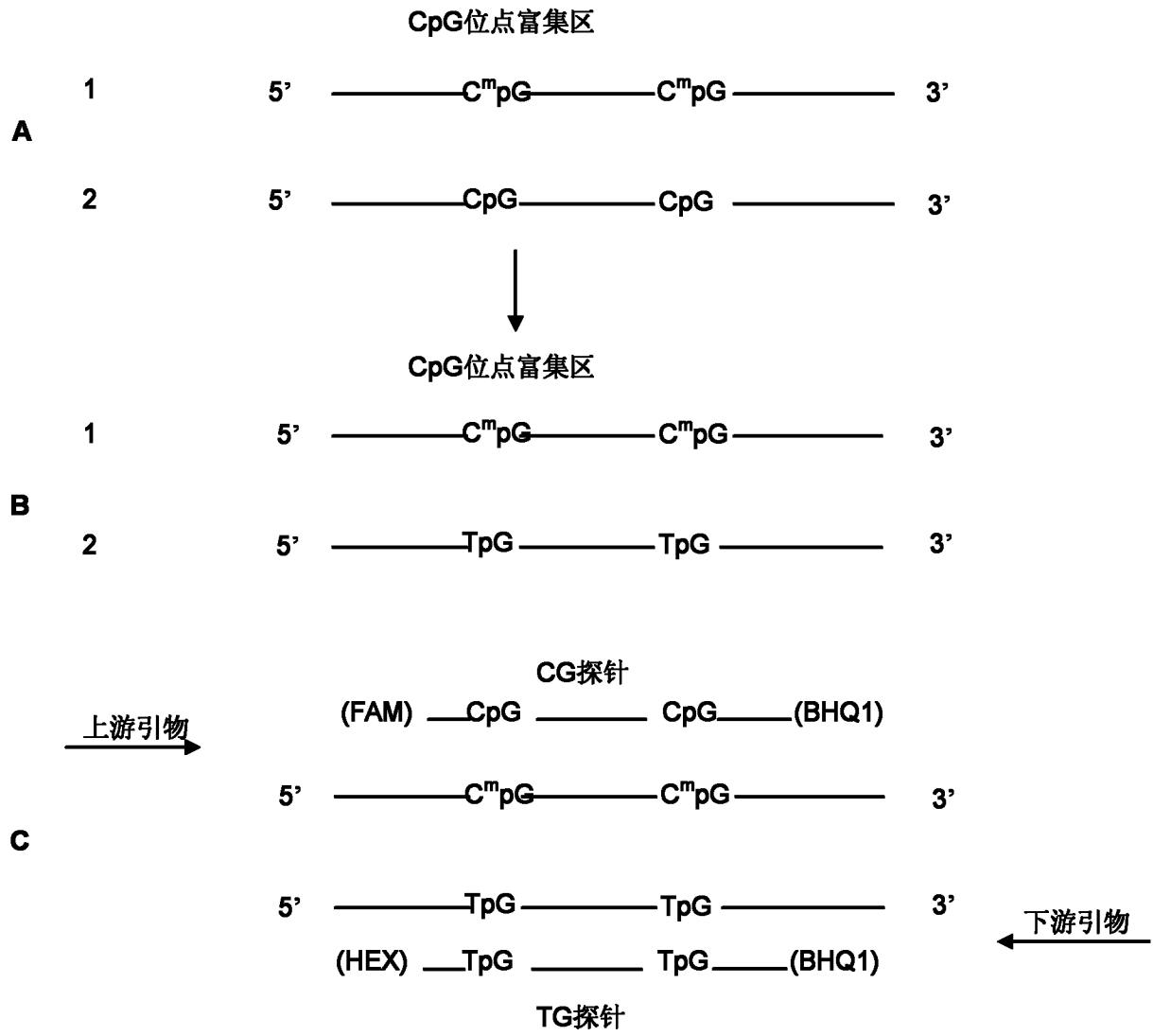


图 1

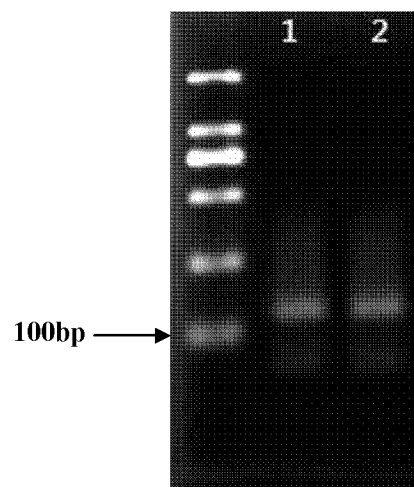


图 2

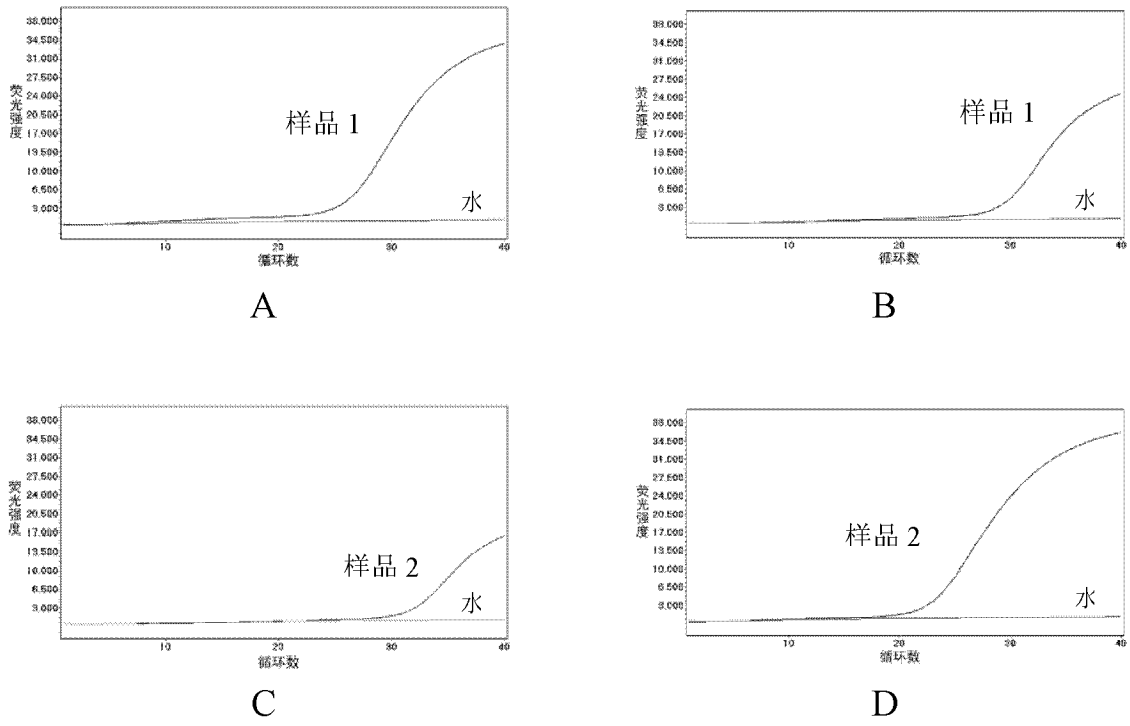


图 3