

限制内切酶法检测基因特异位点的甲基化

刘革修 万腊香 杨和平

(衡阳医学院分子生物学研究中心 衡阳 421001)

在 DNA 分子中,除含有 A、T、G、C 四种碱基外,还发现有 5-甲基胞嘧啶(5mC)。在真核生物中,5-mC 主要出现在 5'-CpG-3' 序列。DNA 甲基化与基因表达和基因突变有密切的关系。检测 DNA 甲基化常用的内切酶有 Msp I 和 Hpa I,我们从 1988 年起用这二种酶对动脉粥样硬化进行研究,积累了点滴经验,现予介绍。

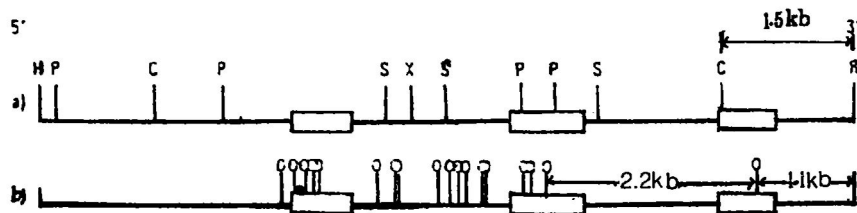
1 DNA 抽提 经过三次酚抽提 DNA 后,将 DNA 样品在 260 和 280 nm 处的光吸收, A_{260} 与 A_{280} 之比应大于 1.75,低于此值则表明 DNA 中留有较多的蛋白质,影响内切酶对基因特异甲基化位点的切割,应加入 SDS 至浓度为 0.5%,再用酚抽提。

2 酶消化 当用 1 μ g DNA/2 unit 酶消化 2 小时后,再加 1 μ g DNA/1 unit 继续消化 2 小时,从中取少许点样鉴定酶切是否完全。若不完全时,再用 1 μ g DNA/1 unit 酶继续消化 2 小时。

3 探针的选择和结果分析 就 c-myc 基因而言,基因全长有 17 个 Msp I/Hpa I 酶切位点(Msp I 是

DNA 甲基化不敏感的内切酶,Hpa I 则是敏感的内切酶)。用 Cla I 和 EcoR I 酶切 c-myc 基因,可得 1.5 kb 的外显子 III 和外显子 III 3' 端一段内含子的序列。而 c-myc 基因中外显子 III CCGG 位点距 EcoR I 酶切位点 1.1 kb,距外显子 III CCGG 位点 2.2 kb(下图)。用 EcoR I 和 Hpa I 对基因组 DNA 进行酶切,以 1.5 kb 探针进行杂交,得如下结果:①出现一条 3.3 kb 基因片段,则 c-myc 外显子 III CCGG 位点发生了甲基化。②出现一条 2.2 kb 和一条 1.1 kb 的片段,则 c-myc 外显子 III CCGG 位点未发生甲基化。③出现 3.3、2.2 和 1.1 kb 的片段,则 c-myc 基因外显子 III CCGG 位点发生部分甲基化。

4 杂交和洗膜条件 我们的经验是:以杂交时间 48 小时较好。洗膜条件是:2 $\times$ SSC、0.5%SDS 室温浸泡 5 分钟;2 $\times$ SSC、0.5%SDS 和 0.1 $\times$ SSC、0.5%SDS 各洗 15 分钟,压片,次日观察结果,视压片的结果确定是否再用 0.1 $\times$ SSC、0.5%SDS(68 $^{\circ}$ C)洗膜。



H=Hind III, P=Pst I, S=Sst I, X=Xba I, R=EcoR I.

c-myc 基因全长有 17 个 Msp I 酶切位点,而外显子 III 只有一个酶切位点。经 Cla I 和 EcoR I 酶切后得到 1.5 kb c-myc 基因探针, Φ 为酶切位点。