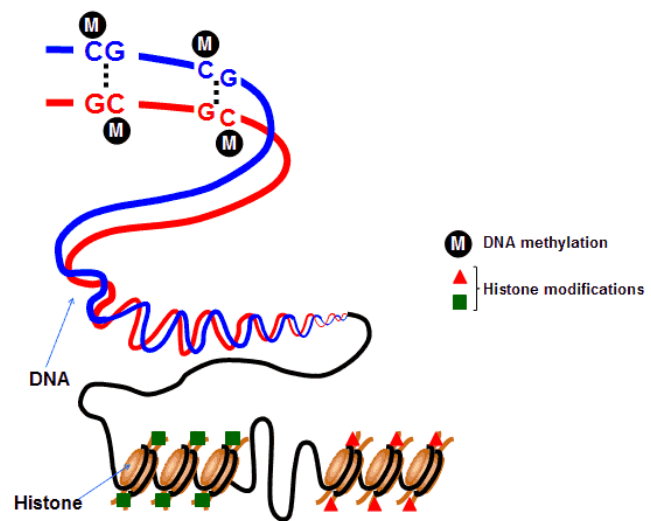


基因甲基化检测技术

甲基化是在 DNA 甲基转移酶（DNA Methyltransferase, DNMT）催化作用下，利用 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)提供甲基，在 CpG 二核苷酸中胞嘧啶嘧啶环的五号碳原子上加上甲基的共价修饰过程。

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式，它不改变 DNA 的一级结构，却在细胞的发育、基因的表达、及基因组的稳定性中起着重要的作用。

CpG 岛的高甲基化是肿瘤中存在的普遍现象，而启动子 CpG 岛的高甲基化是除突变和缺失外肿瘤中抑癌基因失活的第三种机制。



因此，基因启动子甲基化检测在临床诊断、药物敏感性检测、个性化治疗等方面具有很高的应用价值。[仪方生物](#)提供多种基因甲基化检测的方法，包括甲基化芯片、MS-PCR、BSP、COBRA等。

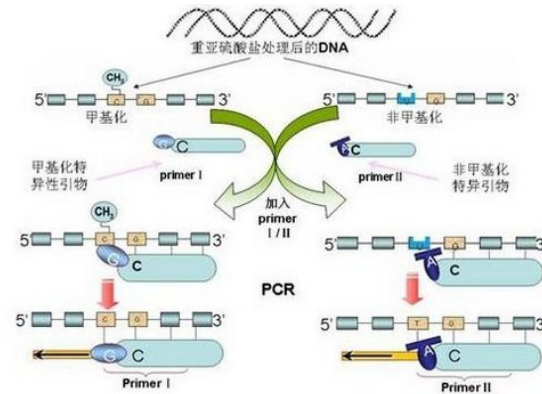
甲基化特异性 PCR (MS-PCR)

这种方法经济实用，无需特殊仪器，因此是目前应用最为广泛的方法。在亚硫酸氢盐处理后，即可开展 MS-PCR。在传统的 MSP 方法中，通常设计两对引物，一对 MSP 引物扩增经亚硫酸氢盐处理后的 DNA 模板，而另一对扩增未甲基化片段。若第一对引物能扩增出片段，则说明该检测位点存在甲基化，若第二对引物能扩增出片段，则说明该检测位点不存在甲基化。

这种方法灵敏度高，可用于石蜡包埋样本，且不受内切酶的限制。不过也存在一定的缺陷，你要预先知道待测片段的 DNA 序列，并设计出好的引物，这至关重要。另外，若存在亚硫酸氢盐处理不完全的情况，那可能导致假阳性。

亚硫酸氢盐处理+测序

这种方法一度被认为是 DNA 甲基化分析的金标准。它的过程如下：经过亚硫酸氢盐处理后，用 PCR 扩增目的片段，并对 PCR 产物进行测序，将序列与未经处理的序列进行比较，判断 CpG 位点是否发生甲基化。这种方法可靠，且精确度高，能明确目的片段中每一个 CpG 位点的甲基化状态，但需要大量的克隆测序，过程较为繁琐、昂贵。



联合亚硫酸氢钠的限制性内切酶分析法（COBRA）

DNA 样本经亚硫酸氢盐处理后，利用 PCR 扩增。扩增产物纯化后用限制性内切酶（BstUI）消化。若其识别序列中的 C 发生完全甲基化(5mCG5mCG)，则 PCR 扩增后保留为 CGCG，BstU I 能够识别并进行切割；若待测序列中，C 未发生甲基化，则 PCR 后转变为 TGTG，BstUI 识别位点丢失，不能进行切割。这样酶切产物再经电泳分离、探针杂交、扫描定量后即可得出原样本中甲基化的比例。

这种方法相对简单，可快速定量几个已知 CpG 位点的甲基化，且需要的样本量少。然而，它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 中存在甲基化的可能。

荧光定量法（Methylight）

此种方法利用 TaqMan® 探针和 PCR 引物来区分甲基化和未甲基化的 DNA。首先用亚硫酸氢盐处理 DNA 片段，并设计一个能与待测位点互补的探针，随后开展实时定

量 PCR。这种方法最大的优势在于其高通量和高敏感性，且无需在 PCR 后电泳、杂交等操作，减少了污染和操作误差。

Qiagen 就提供了多种预制的 MethyLight 分析。EpiTect MethyLight PCR Kit 包括了两条甲基化敏感的 TaqMan 探针和 2 条甲基化不敏感的 PCR 引物。随着目标序列甲基化状态的不同，只有 FAM 标记的亚硫酸氢盐转化的甲基化 DNA 特异的 TaqMan 探针，或只有 VIC 标记的亚硫酸氢盐转化的未甲基化的 DNA 特异的 TaqMan 探针能与目标序列杂交。如果探针与 DNA 杂交则释放出荧光信号。信号强度与 PCR 产物的量成正比，据此可计算出样品的甲基化程度。

甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析

亚硫酸氢盐处理后，甲基化与未甲基化 DNA 会存在序列差异，这种差异可通过熔解曲线分析来发现，因为甲基化 DNA 含有更多的 GC，相对更难熔解。根据熔解温度及峰型的变化，可轻易区分完全甲基化、完全非甲基化或杂合甲基化。高分辨率熔解（HRM）技术可检出极微小的差别。

使用这种方法进行甲基化分析仅需一对引物，相比以往的方法更加快捷、简便和精确。不过对仪器的要求颇高，需要带 HRM 模块的荧光定量 PCR 仪。目前市场上有多款 PCR 仪可满足要求，包括 Illumina 的 Eco、QIAGEN 的 Rotor-Gene Q、罗氏 LightCycler 480 等。

焦磷酸测序

焦磷酸测序技术（Pyrosequencing）作为一种新的序列分析技术，能够快速地检测甲基化的频率，对样品中的甲基化位点进行定性及定量检测，为甲基化研究提供了新的途径。

通过准确定量单个连续的 CpG 位点上的甲基化频率，焦磷酸测序本身能检测并定量甲基化水平上的细微改变。在序列延伸过程中，根据 C 和 T 的掺入量来定量确定单个位点的 C-T 比例。因此，不同位点的甲基化变异就能被准确检测。由于焦磷酸测序提供了真实的序列数据，甲基化状态也就以序列形式呈现。

QIAGEN 目前提供三种焦磷酸测序仪器, 通量由低到高, 适合不同的应用。PyroMark Q24 的强项在于可对多达 24 个样品进行焦磷酸测序。需要大样品量的应用更适合在 PyroMark Q96 ID 上进行。在考虑到处理成百上千个样品所需的大量试剂时, 运行通量最大化可能会使实验成本变得很高。而 PyroMark Q96 MD 装有一台高度灵敏的光检测摄像头, 可以在减少试剂量的情况下对少量的 DNA 模板进行准确测序。

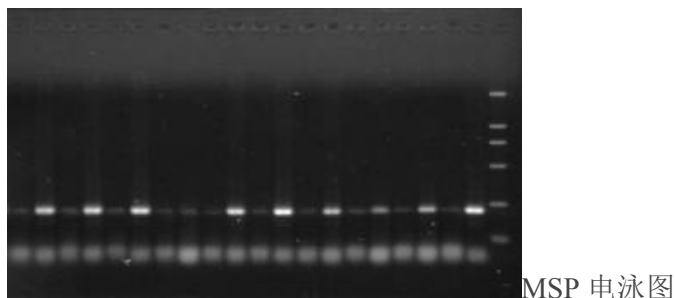
为配合焦磷酸测序, QIAGEN 还推出了 PyroMark CpG Assays。这些预设计的甲基化分析使用特别定制的算法来设计出焦磷酸分析所用的 PCR 和测序引物, 从而实现了基因组内特异靶点的甲基化分析。

目前甲基化特异性 PCR(Methylion Specific PCR, MSP)及其改进方法是检测基因甲基化的经典方法。MSP 法的原理是首先用亚硫酸氢钠修饰处理基因组 DNA, 所有未发生甲基化的胞嘧啶都被转化为 尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不变。然后设计针对甲基化和非甲基化序列的引物并进行聚合酶链反应(PCR)扩增, 最后通过琼脂糖凝胶电泳分析, 确定与引物互补的 DNA 序列的甲基化状态。MSP 法灵敏度较高, 应用范围广。

甲基化检测分析原理和实验流程

MSP 实验流程:

1. 基因组抽提;
2. 基因组 DNA 定量;
3. 重亚硫酸盐转化 (C 转化为 U), 本步实验至关重要, 转化效率高直接会影响实验结果, 所以, 需要实验者在实验过程中不断摸索合适的实验条件以确保较高的转化效率;
4. 引物设计 (每个基因设计两对引物, 分别为: 甲基化引物 M, 非甲基化引物 U, 对应扩增甲基化和非甲基化的目的片段), 有时需设计巢式引物;
5. PCR 扩增: 对甲基化和非甲基化的目的片段分别扩增, 此时尽可能使用梯度 PCR 仪, 可以同时使用不同的退火温度, 以筛选合适的退火温度;
6. PCR 产物电泳;
7. 电泳结果分析 (定性即有无甲基化, 半定量即甲基化程度高低)。



BSP（亚硫酸盐测序法）实验流程：

1. 基因组抽提；
2. 基因组 DNA 定量；
3. 重亚硫酸盐转化（C 转化为 U），本步实验至关重要，转化效率高低直接影响实验结果，所以，需要实验者在实验过程中不断摸索合适的实验条件以确保较高的转化效率；
4. 引物设计（每个基因设计一对引物，引物位置尽可能的避开 DNA 中的 CG 位点），有时需设计巢式引物；
5. PCR 扩增：对实验样本进行 PCR 扩增，此时尽可能使用梯度 PCR 仪，可以同时使用不同的退火温度，以筛选合适的退火温度。
6. PCR 产物电泳；
7. 对目的条带进行切胶回收；
8. 回收后的 PCR 产物连接克隆载体（T 载体）；
9. 转化 E.coli H5 α ；
10. 挑选阳性克隆测序；
11. 测序结果分析：实验专业甲基化分析软件对测序序列进行甲基化分析，可以得到如下数据，
 - A. 测序序列与目的序列的相似度（%）；
 - B. C-T 转化效率（%）；
 - C. 目的片段中每个 CG 的甲基化情况（点状图）；
 - D. 每个 CG 的甲基化率(%)；

Sequenom MassArray DNA 甲基化分析技术

MassARRAY®EpiTYPER™ DNA 甲基化分析技术结合了碱基特异性酶切反应和 MALDI-TOF 检测原理用于 DNA 甲基化定量分析。可实现多重 CpG 的分析检测，是用于 DNA 甲基化定量分析及在基因组任何区域或者候选基因中鉴定甲基化定量分析的首选方法。

碱基特异性酶切 (MassCLEAVE) 实验由亚硫酸盐处理待测 DNA 开始。经过亚硫酸盐处理，DNA 中的未甲基化的胞嘧啶 (C) 转变为尿嘧啶 (U)，由此在 DNA 模板中产生甲基化特异的序列变化。利用 5' 末端带有 T7-启动子的引物进行 PCR 扩增，产物经 SAP (虾碱性磷酸酶) 处理后用于碱基特异性的酶切反应。酶切后 DNA 片段的大小和分子量取决于亚硫酸盐处理后的碱基变化，飞行质谱能测出每个片段的分子量，配套软件 EpiTYPER 则能自动报告每个相应片段的甲基化程度。[仪方生物](#)提供灵活、高质量的甲基化定制服务。



服务流程

- > 客户提供 DNA 或者生物样本
- > 样本前处理
- > PCR 扩增、SAP、Transcription、Cleavage
- > 点样

- > 质谱检测
- > 分析报告



技术特点

- > 高性能
 - 能够分析覆盖长达 600bp 的多个 CpG 位点
 - 能够分析福尔马林处理的石蜡组织
 - 无需任何荧光标记
- > 高灵敏度
 - 精度高 (5%CV)
 - 检测低至 5% 的甲基化水平
 - 分析需要的起始样本量少 (<5pg)
- > 高性价比
 - 用 384 孔板进行 PCR 反应
 - 一个扩增产物可以进行多重 CpG 位点分析
 - 无需后续验证, 可直接发表结果
- > 操作简便
 - 无需设计 CpG 位点特异性引物
 - 无需进行 PCR 产物纯化
 - 研究几个到几百个甲基化位点的理想手段

Reference:

Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, et al. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional activity. *Nat Cell Biol.* 2010;12:235-246.

Docherty SJ, Davis OSP, Haworth CMA, Plomin R, Mill J. DNA methylation profiling using bisulfite-based epityping of pooled genomic DNA. *Methods.* 2010;52(3):255-8.

Khoury H, Suarez-Saiz F, Wu S, Minden MD. An upstream insulator regulates DLK1 imprinting in AML. *Blood* 2010;115(11): 2260-2263.

Nygren AOH, Dean J, Jensen TJ, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylationbased DNA discrimination. *Clin Chem.* 2010;56:1627-1635.

Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genetics.* 2009;18(21):4046-4053.

van den Boom D, Ehrich M. Mass spectrometric analysis of cytosine methylation by base-specific cleavage and primer extension methods. *DNA Methylation: Methods and Protocols.* Vol. 507, 2nd ed. 2008:207-227. doi:10.1007/978-1-59745-522-0_16.

Wong CCY, Caspi A, Williams, B, et al. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics.* 2010;5(6):1-11.

Wu H, Coskun V, Tao J, et al. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science.* 2010;329(5990):444-448.