

DNA甲基化与检测方法简介

提

到遗传，我们都已经习惯于这样的概念，即基因组的编码信息存在于ACGT这四种碱基的排列顺序中。然而，诸如胞嘧啶的甲基化修饰及其分布，组蛋白的乙酰化等，同样影响着表型。这就构成了表观遗传学(epigenetics)的主要研究内容。其实，早在1942年，

C.H.Waddington就提出了表观遗传学的概念，他指出，表观遗传与遗传相对，主要研究基因型和表型的关系。而现在，对于表观遗传学，比较统一的认识是，其研究在没有细胞核DNA序列改变的情况时，基因功能的可逆的可遗传的改变。也就是说，在不改变基因组序列的前提下，通过DNA和组蛋白的修饰等来调控基因表达，其中又以DNA甲基化(DNA methylation)最为常见，成为表观遗传学的重要组成部分。随着人类基因组计划的开展，科学家们开始在基因组水平来研究表观遗传学，逐步形成表观基因组学(epigenomics)。表观基因组学就是要在整个基因组水平来研究表观遗传过程以及与这些过程密切相关的特定基因组区域的识别与鉴定。2000年10月，人类表观基因组协会(Human Epigenome Consortium)由欧盟赞助，启动了旨在人类6号染色体MHC区域首先做出DNA的甲基化图谱的先导计划(Pilot Project)。该计划顺利完成，引导启动了2003年的人类表观基因组计划(Human Epigenome Project, HEP)。2005年，美国国立卫生院(NIH)下属的国立癌症研究所启动了癌症基因组先导计划。2006年，该所与国立人类基因组研究所一起共同启动癌症基因组计划(Cancer Genome Project)。表观基因组学和DNA甲基化与癌症的研究成为新的热点。本文将简要介绍DNA甲基化与CpG岛，癌症与DNA甲基化以及DNA甲基化的重要检测方法。

DNA甲基化与CpG岛:

在人类表观遗传学研究中，最常见的就是CpG二核苷酸中胞嘧啶的甲基化修饰。其主要过程是，在CpG甲基化结合蛋白(Methyl-CpG Binding Proteins,MBDs)和DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用下，使CpG二核苷酸5'端的胞嘧啶转变成为5'甲基胞嘧啶。在正常人类的DNA中，约有3-6%的胞嘧啶被甲基化。在哺乳动物中，约有50,000,000个CpG二核苷酸，其中70%被甲基化。而那些可被甲基化的CpG二核苷酸并非随机的分布于基因组序列中，相反，在基因组

的某些区域中，通常是基因的启动子区域，5'端非翻译区和第一个外显子区，CpG序列密度非常高，超过均值5倍以上，成为鸟嘌呤和胞嘧啶的富集区，称之为CpG岛(CpG Islands, CGIs)。

CpG岛的概念最早由Adrian Bird提出，他称之为未甲基化的HpaII小片段(HpaII Tiny Fragment, HTF)，更正式的定义是“区域”，该区域的序列长度至少200个碱基对，GC含量超过50%，CpG比值(观测值/期望值)超过0.6。CpG比值的计算方法如下：

最近，为了排除那些Alu重复序列，提出了更

该区域的CpG二核苷酸数 (#CpG)

* 该区域的碱基数 (#N)

该区域的胞嘧啶C的数目 (#C)*鸟嘌呤G的数目 (#G)

技术方法

严格的标准：长度至少500碱基对，GC含量超过55%，CpG比值大于0.65。

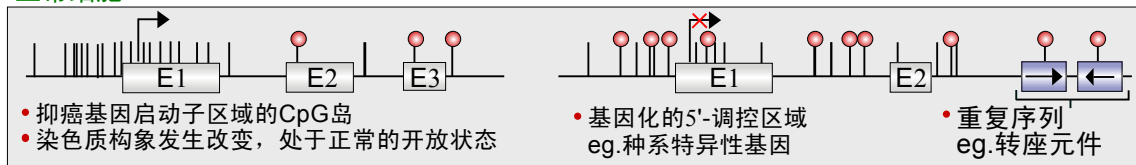
据估计，哺乳动物基因组中的CpG岛约有4万个。在健康人的基因组中，CpG岛中的CpG位点一般处于非甲基化状态，而CpG岛外的CpG位点通常是被甲基化的。研究表明，DNA的甲基化在遗传印记(genetic imprinting)，胚胎发育以及维持正常细胞功能等方面发挥着重要作用。

DNA甲基化与肿瘤发生：

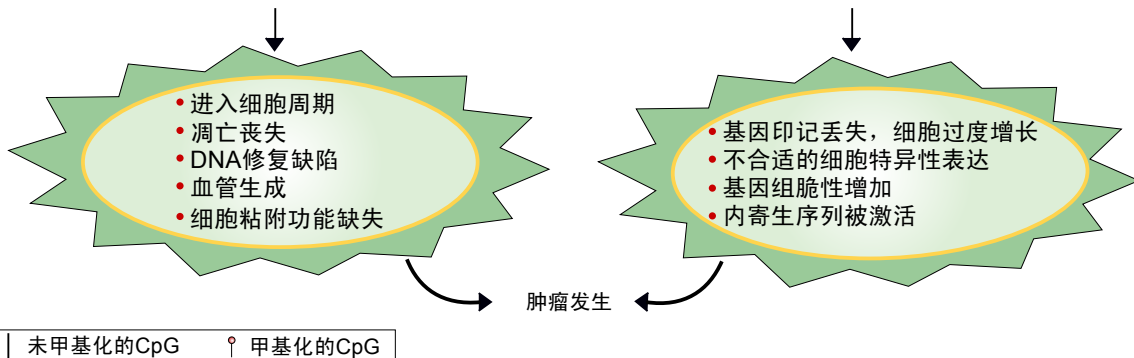
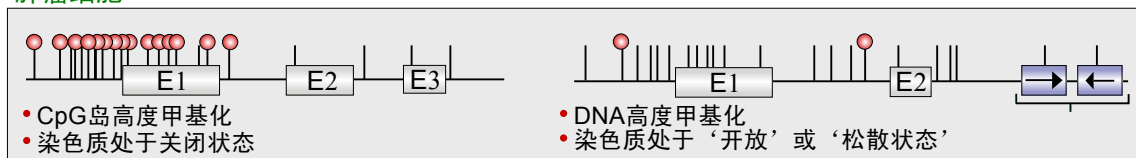
DNA甲基化水平和模式的改变是肿瘤发生的一个重要因素。这些变化包括CpG岛局部的高甲基化和基因组DNA低甲基化状态。如图1左所示，在正常细胞中，位于抑癌基因启动子区域的CpG岛处于低水平或未甲基化状态，此时抑癌基因处于正常的开放状态，抑癌基因不断表达抑制肿瘤的发生。而在肿瘤细胞中，该区域的CpG岛被高度甲基化，染色质构象发生改变，抑癌基因的表达被关闭，从

而导致细胞进入细胞周期，凋亡丧失，DNA修复缺陷，血管生成以及细胞粘附功能缺失等，最终导致肿瘤发生。同样，如图1右所示，对于在正常细胞中处于高度甲基化的一些基因和重复序列，如果其甲基化水平降低，这些基因将表达和重复序列将激活，从而导致基因印记丢失，细胞过度增长，不合适的细胞特异性表达，基因组脆性增加，以及内寄生序列(endoparasitic sequence)激活，最终也导致肿瘤发生。

正常细胞



肿瘤细胞



肿瘤生成中的DNA甲基化改变模式 (取自Esteller M, Nat Rev Genet 2007, 8(4):286-298)

由于CpG岛的局部高度甲基化要早于细胞恶性增生，故其甲基化的检测可用于肿瘤的预测，而全基因组水平的低水平甲基化状态，则随着肿瘤恶性程度的增加而进一步降低，使其可用于肿瘤的诊断以及分级。近年来，不断有研究显示人类肿瘤的发生、发展与DNA甲基化的异常有关，而且早在肿瘤临床确诊之前就可检测出特异基因的甲基化异常现象。所以甲基化可以作为肿瘤等早期诊断的生物标记物和预后评估指标，对肿瘤的筛查和风险评估、早期诊断、分期分型、预后判断及治疗监测都具有重要的意义。

DNA甲基化检测方法:

随着DNA甲基化研究的不断深入，其检测方法也层出不穷。这些方法针对不同研究目的，运用不同的处理方法，几乎涵盖了从基因到基因组各个层次水平的研究。据检测样本不同，可以分为DNA和mRNA。现有方法，绝大部分都是取样于细胞的DNA，根据研究水平，又将这些方法归为3大类，即：基因组甲基化水平(Methylation Content)的分析，候选基因甲基化的分析以及基因组层次的DNA甲基化模式(Methylation pattern)与甲基化谱(Methylation Profiling)的分析。主要方法分述如下：

A. 基因组甲基化水平 (Methylation Content) 的分析:

1. 高效液相色谱 (High-performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC是一种比较传统的方法，是根据DNA或蛋白分子量和构象的不同而使其加以分离。由于在动态相和静态相下分子的光吸收度并不相同而加以定量。随着系统的压强的增加，其分辨率增高。故而能够定量测定基因组整体水平DNA甲基化水平。该方法由Kuo等1980年首次报道。过程是将DNA样品先经盐酸或氢氟酸水解成碱基，水解产物通过色谱柱，结果与标准品比较，用紫外光测定吸收峰值及其量，计算 $5\text{mC}/(5\text{mC}+5\text{C})$ 的积分面积就得到基因组整体的甲基化水平。这是一种检测DNA甲基化水平的标准方法。

2. 高效毛细管电泳法 (High-performance Capillary Electrophoresis, HPCE)

这是一种利用窄孔熔融石英毛细管来从复合物中分离不同化学组分的技术。其基础是在强电场下不同分子的由于其所带电荷，大小，结构以及疏水性等不同而相互分开。用HPCE方法处理DNA水解产物来确定5mC水平，简便，经济且敏感性高。

在这两种方法的基础上，不断有新方法改进，包括，变性高效液相色谱(DHPLC)，逆向高效液相色谱(Reversed phase HPLC)以及HPLC与薄层色谱(Thin-layer Chromatography, TLC)相结合的方法。除上述方法外，还有其他

原理的检测方法，如单纯的TLC方法以及最佳近邻TLC(Nearest neighbour TLC)，基于抗5mC的免疫学技术(Anit-5mC immunological techniques)，SssI 甲基转移酶法(SssI methyl Acceptance Assay)，在重亚硫酸盐处理的基础上而进行的氯乙醛反应法(Chloacetaldehyde reaction)和酶区甲基化分析(Enzymatic Regional methylation Assay, ERMA)。

必须指出，以上各种方法虽然能够明确检测出目的序列中所有CpG位点的甲基化状况，但并不能对甲基化位点进行定位。

B. 候选基因 (Candidate Gene)甲基化分析:

1. 甲基化敏感性限制性内切酶-PCR/Southern法 (methylation-sensitive restriction Endonuclease -PCR/Southern, MSRE-PCR/Southern)

这种方法利用甲基化敏感性限制性内切酶对甲基化区的不切割的特性，将DNA消化为不同大小的片段后，进行Southern或PCR扩增分离产物，明确甲基化状态再进行分析。常使用的甲基化敏感的限制性内切酶有Hpa II -Msp I (CCGG)和Sma I -XmaI(CCCGGG)等。

2. 重亚硫酸盐测序法 (Bisulphite Sequencing)

该方法首先用重亚硫酸盐使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，行PCR扩增所需片段，则尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶，最后，对PCR产物进行测序并且与未经处理的序列比较，判断是否CpG位点发生甲基化。此方法是精确度很高，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。

3. 甲基化特异性的PCR (methylation-specific PCR, MS-PCR)

同样，该方法中，DNA先用重亚硫酸盐处理，随后行引物特异性的PCR。其设计两对引物，分别与重亚硫酸盐处理后的序列互补配对，即一对结合处理后的甲基化DNA链，另一对结合处理后的非甲基化DNA链。检测MS-PCR扩增产物，如果用针对处理后甲基化DNA链的引物能扩增出片段，则说明

该被检测的位点存在甲基化；反之亦然。

4. 甲基化荧光法

(MethylLight)

结合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，这样报告荧光发光，测定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。本方法高效，迅速，具备可重复、所需样本量少、不需要电泳分离的特点。

5. 焦磷酸测序

(Pyrosequencing)

该方法，由4种酶催化同一反应体系中的酶级联化学发光反应，在每一轮测序反应中，只加入一种dNTP，若该dNTP与模板配对，聚合酶就能将其加入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸(PPi)。PPi可最终转化为可见光信号，并由PyrogramTM转化为一个峰值，其高度与核苷酸数目成正比。当用于甲基化检测时，经重亚硫酸盐处理的序列可以看作是C-T型的SNP改变。其操作简单，结果准确可靠，可以进行大规模分析。

6. 结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法

(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)

这种方法对标本DNA行重亚硫酸盐处理及PCR扩增，处理后原甲基化的胞嘧啶被保留，而非甲基化的胞嘧啶变为胸腺嘧啶。随后用限制性内切酶对转化

后PCR产物切割的特性以识别原标本DNA的甲基化状况。该方法相对简单，不需预先知道CpG位点及样本序列。

C. 基因组范围的DNA甲基化模式 (Methylation pattern) 与甲基化谱 (Methylation Profiling) 分析:

1. 限制性标记基因组扫描 (Restriction Landmark Genomic Scanning, RLGS)

RLGS是最早适用于基因组范围DNA甲基化分析的方法之一。该方法先用甲基化敏感的稀频限制性内切酶Not I消化基因组DNA，甲基化位点保留，标记末端、切割、行一维电泳，随后再用更高频的甲基化不敏感的内切酶切割，行二维电泳，这样甲基化的部分被切割开并在电泳时显带，得到RLGS图谱与正常对照得出缺失条带即为甲基化的可能部位。

2. 甲基化间区位点扩增 (amplification of inter-methylated sites, AIMS)

AIMS是基于任意引物PCR (Arbitrary Primed PCR)的一种方法，由于任意引物PCR使用寡核苷酸连接子(linker)进行连接，不需要依赖任何序列的先验信息。在该方法中，用来进行扩增的模板序列首先通过甲基化敏感的限制性内切酶进行消化而富集，其特异性由该酶酶切片断一端的特定序列结合连接子来保证。随后，由内切酶进行第二次消化，再次连接，提纯进行PCR扩增，最后电泳，提取目的序列进行测序。

3. 甲基化 CpG 岛扩增 (Methylated CpG-island amplification, MCA)

MCA也是基于任意引物

PCR的方法，该方法使用两种对甲基化具有不同敏感度的限制性内切酶(如SmaI和XmaI)先后进行消化，然后对甲基化敏感的限制性酶切片断进行接头(Adaptor)连接，行PCR，那些富含CpG的序列就会被选择性的扩增。该方法对甲基化分析和克隆甲基化差异性基因都非常有帮助。

4. 差异甲基化杂交 (Differential Methylation Hybridization, DMH)

DMH属于一种芯片技术，在该技术中，包括扩增子(Amplicon)生成和CGI文库筛选两个重要组成部分。在扩增子生成中，首先用MseI来酶切DNA样本，然后接上连接子，并去除重复序列，这时的样本一分为二，其一直接进行PCR扩增，生成仅由MseI处理过的扩增子，而另一半则用甲基化敏感的酶BstUI进行消化，然后进行PCR扩增，生成由MseI/BstUI共同处理过的扩增子。CGI文库通过筛查出重复序列，然后进行PCR，选出含有BstUI位点的克隆，最后这些克隆一式两份点到芯片上，制备成CGI芯片。然后把两种不同的扩增子分别杂交到相应的CGI克隆点上，最后通过差异性对比检测出那些未甲基化位点。

5. 由连接子介导PCR出的HpaII小片断富集分析 (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR, HELP)

该方法用HpaII与其对甲基化敏感同裂酶MspI对同一基因组序列进行消化，产生不同的代表性序列，然后对此序列进行连接子介导的PCR，瑞和进

行电泳等比较分析或将此DNA样本共杂交到基因组芯片上进行分析。这种方法已经揭示了大量的组织特异性, 差异甲基化区域, 并用于正常细胞和癌症细胞的基因组比较分析。

6. 甲基化DNA免疫沉淀法 (Methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP)

这是一种高效富集甲基化DNA的方法。在该方法中, 可与5mC特异性结合的抗体加入到变性的基因组DNA片段中, 从而使甲基化的基因组片段免疫沉淀, 形成富集。通过与已有DNA微芯片技术相结合, 从而进行大规模DNA甲基化分析。该方法简便, 特异性高, 适合DNA甲基化组学(DNA Methylome)的分析。

通过以上论述, 不难看到检测甲基化的方法不断涌现, 一方面说明其研究难度之大, 另一方面也说明种种方法都有其局限性, 诸如对酶的依赖, PCR扩增的问题, 芯片数据分析的标准化问题等等。

综上所述, 各种表观基因组学技术方法使我们可以绘制出诸如DNA甲基化以及组蛋白修饰模式的详细图谱, 为我们研究甲基化的生物学功能, 以及在肿瘤生成中的作用, 以致肿瘤预防, 诊断, 治疗和预后方面提供更多信息。然而, 为了实现这个宏远目标, 需要的不仅仅是支助的增加, 还有国际同行的密切合作。

参考文献

- [1] Esteller M: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007, 8(4):286-298.
- [2] Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A et al: DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* 2004, 2(12):e405.
- [3] Bradbury J: Human epigenome project--up and running. *PLoS Biol* 2003, 1(3):E82.
- [4] Brena RM, Huang TH, Plass C: Toward a human epigenome. *Nat Genet* 2006, 38(12):1359-1360.
- [5] Ira G: [CpG islands--the only unmethylated fragments of DNA in the vertebrate genome]. *Postepy Biochem* 1997, 43(3):189-198.
- [6] Laird PW: The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(4):253-266.
- [7] Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R, Ehrlich M: Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res* 1980, 8(20):4763-4776.
- [8] Fraga MF, Uriol E, Borja Diego L, Berdasco M, Esteller M, Canal MJ, Rodriguez R: High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis* 2002, 23(11):1677-1681.
- [9] Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Levenson Chernokhvostov VV: MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(10):e93.
- [10] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(5):1827-1831.
- [11] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(18):9821-9826.
- [12] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(8):E32.

- [13] Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R: Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003, 35(1):146-150.
- [14] Xiong Z, Laird PW: COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(12):2532-2534.
- [15] Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, Komatsubara H, Mukai T: A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(21):9523-9527.
- [16] Frigola J, Ribas M, Risques RA, Peinado MA: Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res* 2002, 30(7):e28.
- [17] Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP: Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999, 59(10):2307-2312.
- [18] Huang TH, Perry MR, Laux DE: Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999, 8(3):459-470.
- [19] Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C et al: Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 2006, 16(8):1046-1055.
- [20] Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D: Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005, 37(8):853-862.



何西淼 撰稿



视频教学

www.LifeOmics.com