

DOI: 10.13376/j.cblls/2016066

文章编号: 1004-0374(2016)04-0513-08

· 技术与应用 ·

肿瘤细胞DNA甲基化检测技术与研究方法新进展

赖伊杰, 康亚妮*

(上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200240)

摘要: DNA 甲基化作为一种常见的表观遗传学修饰方式, 在基因表达调控中发挥着重要作用, 与肿瘤的发生发展有着密切的联系。检测肿瘤相关基因的甲基化状态对开发肿瘤诊断、治疗等相关技术及研究肿瘤发生机制具有重要意义。现对肿瘤细胞 DNA 甲基化检测技术的优缺点及应用进行综述, 以期为研究者在选择检测方法时提供参考。

关键词: DNA 甲基化; 肿瘤; 基因表达; 检测技术

中图分类号: R394; R730.4 **文献标志码:** A

New progress on detection and research methods of DNA methylation in tumor cells

LAI Yi-Jie, KANG Ya-Ni*

(School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: DNA methylation is a common epigenetic modification, which plays an important role in the regulation of gene expression and is closely related to the process of tumorigenesis. Investigating into the methylation patterns in tumor related genes shares tremendous significance in developing technologies for tumor diagnosis and tumor treatment and in understanding the mechanisms underlying tumorigenesis. This review gives an intensive look into the existing DNA methylation detection methods and a brief comment about their relative merits and applications to provide reference for researchers when selecting a proper detection method.

Key words: DNA methylation; cancer; gene expression; methylation detection method

DNA 甲基化反应是在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 催化作用下, 以 S2 腺苷甲硫氨酸 (S2 adenosylmethionine, SAM) 作为供体将活化的甲基引入 DNA 链中的过程。肿瘤细胞 DNA 甲基化的异常状态与肿瘤的发生发展密切相关。原癌基因的异常低甲基化可诱导细胞异常增殖, 最终诱发肿瘤; 抑癌基因启动子区的异常高甲基化可导致基因沉默, 从而促进肿瘤的发生发展^[1]。与传统的遗传信息序列不一样, 基因的表观遗传学修饰是可逆的, 通过改变细胞生长的环境、甲基化酶抑制剂以及靶向治疗等方法可以抑制肿瘤的生长^[2]。由于 5- 甲基胞嘧啶的存在并不影响碱基的配对, 因此在传统的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增的过程中将会丢失甲基化的信息。研究

人员开发了各种技术对 DNA 进行预处理来保留 DNA 甲基化信息, 依据对目标 DNA 的预处理手段将甲基化检测技术分为 3 类, 即基于限制性酶切预处理、基于亲和富集预处理以及基于亚硫酸盐修饰预处理的甲基化检测技术。在真核生物中, DNA 甲基化主要发生于胞嘧啶 - 磷酸盐 - 鸟嘌呤 (cytosine-

收稿日期: 2015-08-26; 修回日期: 2015-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(91229123, 4137-6151); 国家中医临床研究基地项目(LYTD-21, JDZX-2012123); 上海交通大学SMC-晨星青年学者奖励计划 (15X100090011); 上海交通大学PRP计划(T082-PRP27004/6, T082PRP28006)

*通信作者: E-mail: kangyani@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34207341

phosphate-guanine, CpG) 二核苷酸, 并以 5- 甲基胞嘧啶形式存在^[3]。研究肿瘤细胞的甲基化状态对于理解和认识肿瘤的发生发展机制至关重要, 并为肿瘤基因的靶向治疗提供新的思路。本文对肿瘤细胞 DNA 甲基化检测技术与研究方法的优缺点及其应用进行了综述, 以便为研究者在方法选择上提供意见参考。

1 基于限制性酶切的DNA甲基化检测技术

由于甲基化敏感的限制性酶无法切割甲基化的 DNA, 使用甲基化敏感性不同的限制性内切酶 (如 *HpaII* 和 *MspI*) 处理样本 DNA 继而获得不同的酶切片段, 便可以实现对差异性甲基化片段的区分。

基于限制性酶切预处理的 DNA 甲基化检测技术, 主要包括限制性路标基因扫描技术 (restriction and mark genomic scanning, RLGS)^[4]、甲基化敏感的扩增片段长度多态性技术 (methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism, MS-AFLP)^[5]、差异甲基化杂交技术 (differential methylation hybridization using CGI army, DMH)^[6]、甲基化特异性多重连接探针扩增 (methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)^[7] 以及近期发展的基于限制性酶的单细胞甲基分析技术 (restriction enzyme based single cell methylation assay, RSMA)^[8] 等。这些方法的主要区别在于检测酶切产物片段的方法, 即电泳的维度、是否采用芯片杂交以及样本细胞的个数。

RLGS 是第一个检测 DNA 甲基化图谱的技术, 其使用限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 通过二维电泳的方式对具有放射性的酶切产物进行分离, 电泳图谱上斑点的位置与密度则分别对应于该位点的位置与拷贝数。该方法不需使用 PCR 扩增, 在对全基因组甲基化位点分析上具有优势, 适用于同时分析不同肿瘤中的甲基化模式和寻找肿瘤内 DNA 甲基化的新靶点, 如发现胃癌基因甲基化的新靶点 BACH2^[9] 以及对肺癌细胞的全基因组差异甲基化区域的扫描^[10] 等。但由于其操作复杂, 需使用放射性同位素, 且无法定量分析, 现已基本不使用。

MS-AFLP 使用识别位点不含 CG 的内切酶和识别位点含有 CG 序列的内切酶 (如 *NotI-MseI*) 对 DNA 进行处理, 连接上标记的接头引物, 在 PCR 扩增后通过电泳区分出甲基化情况不同的片段。Ymamotto 等^[11] 评估其敏感性和特异性分别为 78.5% 和 97.1%。随后 Muto 等^[12] 将与荧光阵列杂交相

结合的 FL-MS-AFLP (fluorescence-labeled MS-AFLP) 用于甲基化的定量分析, 发现出现微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 的结肠癌细胞较无柄锯齿状腺瘤细胞 (sessile serrated adenomas, SSA) 有着更高频的低甲基化。DMH 则是在 *MseI* 酶切后将荧光标记的产物与 CGI 芯片进行杂交, 比较荧光强度来检测甲基化状态的差异, 可用于多样本、多位点甲基化的检测, 样本需要量少, 适于临床样本, 但存在假阳性问题, 需进行后续鉴定^[13]。目前 DMH 被广泛用于筛选肿瘤中启动子区域异常甲基化的基因, 如筛选前列腺癌基因中的潜在甲基化位点^[6]。

MS-MLPA 由 Nygren 等^[7] 首先开发, 并可用于石蜡包埋的样本的甲基化分析, 其通过引入可以被限制性酶切割的探针从而实现了特定位点甲基化的定量检测。目标 DNA 在变性之后与探针结合, 在甲基化敏感的限制性酶作用下未甲基化的片段被切割, 从而不会扩增而没有信号, 因此, 在毛细管电泳中仅能检测到甲基化片段的信号。这种方法因为可通过改变探针序列来实现对不同位点的甲基化定量检测, 而在许多癌症基因的甲基化检测中广泛应用^[14-15]。

Kantlehner 等^[8] 在对人类结直肠癌 SW480 细胞 DNA 的甲基化研究中报道了 RSMA 技术。RSMA 主要使用 AmpliGrid 玻片完成对单个细胞的沉积以及 DNA 的准备, 并使用甲基化敏感的限制性内切酶切割基因组 DNA, 经过 PCR 扩增后观察电泳条带。此方法最大的优势是能对单个细胞的甲基化状态进行检测, 从而将表观遗传学的重编程与细胞命运决定联系在一起, 这对于研究肿瘤细胞中不同细胞的基因表达具有重要意义; 但单细胞甲基化分析技术在特定位点甲基化检测上存在困难, 并且在单细胞环境下 DNA 样本容易丢失^[16-19]。

2 基于亲和富集的DNA甲基化检测技术

基于亲和富集的 DNA 甲基化检测技术主要有甲基化 DNA 免疫沉淀技术 (methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP) 与甲基化 CpG 结合蛋白亲和捕获技术 (methyl-CpG binding domain-based proteins, MBDCap)。因为采用的富集蛋白不同, MeDIP 普遍富集 CpG 低密度的甲基化区域, 而 MBDCap 则普遍富集 CpG 高密度的甲基化区域^[20]。在需要确定具体单个 CpG 甲基化位点时, 可将富集操作与亚硫酸盐转化测序 (bisulfite-seq) 相结合以获得单个核苷酸位点的甲基化信息。

MeDIP 方法在将基因组 DNA 超声波打断并变性后, 使用 5- 甲基胞嘧啶特异性抗体富集甲基化片段, 再分离纯化得到甲基化 DNA 片段。MeDIP 得到的 DNA 片段可以与阵列杂交联用 (MeDIP-array) 进行高通量、快速的基因组甲基化分析。如对大鼠皮肤癌的肿瘤特异性甲基化区域的筛选^[21], 也可以与测序相结合 (MeDIP-Seq); 如 Borno 等^[22] 对前列腺癌组织与正常组织进行的基因组 DNA 甲基化模式进行分析, 鉴定了 14.7 万个癌症特异性的差异性甲基化区域, 并基于 TMPRSS2-ERG 基因融合阴性的肿瘤细胞的表现遗传学改变对前列腺癌的发生机制提出了新的解释。

MBDCap 技术与 MeDIP 方法类似, 也需要经过超声波片段化、富集与洗提的步骤。Jadhav 等^[23] 将 MBDCap 技术与测序技术相结合 (MBDCap-Seq), 发现大规模邻近基因群的甲基化情况可以作为乳腺癌的诊断标志; Wang 等^[24] 在 MBDCap 富集 CG 序列之后使用启动子微阵列对胃癌相关基因进行扫描, 发现 XRCC1 基因的启动子区出现高甲基化。

3 基于亚硫酸盐转化的DNA甲基化检测技术

Frommer 等^[25] 于 1992 年首次报道了基于亚硫酸氢钠处理的基因组测序法。经亚硫酸氢盐处理后, 原 DNA 样本中的胞嘧啶 (C) 可转化为尿嘧啶 (U), 而 5- 甲基胞嘧啶脱氨基转化为尿嘧啶的几率极低, 所以, 亚硫酸氢钠处理后再进行 PCR 的产物中, 胞嘧啶只来自于 5- 甲基胞嘧啶。这种方式可有效保留 DNA 的甲基化信息, 被广泛用于特定位点和全基因组的甲基化检测。

3.1 亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing, BS-Seq)

对亚硫酸盐处理后的 DNA 进行测序分析是 DNA 甲基化检测的金标准, 主要分为全基因组测序和靶向位点测序两大类。

全基因组亚硫酸盐测序 (whole genome bisulfite sequencing, WGBS) 是绘制基因组甲基化图谱的最好方法。WGBS 被用于人类结直肠癌、乳腺癌和正常组织甲基化图谱的比较, 以单碱基分辨率最为直观地证明了肿瘤细胞中基因甲基化的改变^[26]。然而, 尽管 WGBS 在全基因组甲基化检测上有着无可比拟的优越性, 但由于人类基因组过于庞大, 在测序大量样品时费用较高, 这限制了其在肿瘤临床检测中的应用。

由于在许多人类细胞中 70%~80% 的 CpG 位点都存在着稳定的甲基化, 对全基因组的甲基化检测

仅能提供十分有限的肿瘤特异性的基因调控信息, 因此, 可以对亚硫酸盐处理后的 DNA 进行肿瘤特异性潜在 CpG 甲基化调控位点的筛选, 以提高测序的效率、降低测序的花费^[27]。BSP 克隆测序法 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 设计特定的引物对亚硫酸盐修饰后的产物进行 PCR, 将目的产物纯化后进行克隆测序, 测序方法包括桑格法 (Sanger) 和下一代测序法 (next generation sequencing, NGS), 是目前实验室里常用的定量特定位点的甲基化检测手段^[28-29]; 减容代表亚硫酸氢盐测序法 (reduced representation bisulfite sequencing, RRBS) 利用限制性内切酶对基因组进行酶切, 通过凝胶电泳将 CpG 位点富集出来, 再对其进行亚硫酸盐转化进行 PCR 扩增以及测序, 虽然降低了测序量, 但在其覆盖范围内, 对结肠癌、腺癌以及淋巴瘤中相关基因的 CpG 岛、启动子区域以及增强子元件的甲基化信息检测仍可达到单碱基分辨率, 并且单细胞 RRBS、单管 RRBS 以及双酶切 RRBS 的发展进一步提高了 RRBS 测序方法覆盖区域的代表性和深度^[30-34]; 亚硫酸盐锁式探针 (bisulfite padlock probe, BSPP) 的捕获臂和亚硫酸盐处理后的 DNA 互补配对时可以扩增并连接成环形, 用核酸外切酶可以筛选出连接成环状的锁式探针, 对扩增产物进行测序就可以得到相应的 DNA 信息, 锁式探针法不局限于限制酶识别的位点, 其也比 RRBS 在选择基因组靶点上有着更大的灵活性^[35]。

3.2 甲基化特异性PCR (methylation-specific PCR, MSP)及其衍生方法

甲基化特异性 PCR (MSP) 是一种快速、实用的基因甲基化检测方法, 灵敏度高、特异性强, 能同时检测多个 CpG 位点的甲基化情况, 定量分析基因启动子区 CpG 岛每个 CpG 位点的甲基化水平, 对于深入研究肿瘤相关基因表达调控机制具有重要意义, 可以更好地揭示启动子区 CpG 岛所包含的表观遗传学信息, 以明确 DNA 甲基化模式在基因差异表达机制中的作用。在 MSP 的基础上研发的 MethyLight 技术使用荧光定量 PCR 和荧光水解探针, 不需要放射性标记探针以及凝胶电泳的繁琐过程; 由于其可以闭管高通量进行检测, 对微量模板 DNA 的甲基化检测也十分敏感, 常被用于定量检测肿瘤基因的甲基化情况, 但探针的引入会增加设计的复杂性, 且探针有可能无法检出杂合甲基化^[36]。Bonanno 等^[37] 所报道的甲基化特异性荧光扩增 (methylation-specific fluorescent amplicon generation,

MS-FLAG) 是利用热稳定的 *PspGI* 核酸内切酶切割双链 PCR 产物 5' 端的淬灭荧光基团产生实时荧光信号来定量检测甲基化, 无需设计荧光探针, 此法被用于检测肺腺癌的 3 个抑癌基因的甲基化情况, 有着高特异性、高敏感性 (2~3 个质粒拷贝) 与高选择性 (0.01% 甲基化 DNA)。为了增加对多基因样本同时甲基化分析的敏感性和特异性, Lan 等^[38] 在研究前列腺癌相关基因 *GSTP1* 和 *RASSF1A* 时开发了甲基化特异性的斑点杂交技术 (methylation specific dot blot assay, MSP-DB), 即先用引物扩增出富含 CpG 位点的标记探针, 再将其与用紫外线固定在尼龙膜上的 MSP 产物进行杂交, 利用此方法可以将 CpG 富集区域的甲基化状态的检测敏感度提高至 0.01%^[38]。

3.3 甲基化敏感熔解曲线分析(methylation-sensitive high-resolution melting, MS-HRM)

通过熔解曲线分析技术可检测亚硫酸盐处理后获得的甲基化与未甲基化 DNA 间序列的差异。使用在插入 DNA 双链时不会干扰 PCR 的新一代荧光染料 SYTO9 (高温解链时脱离下来, 从而造成荧光的迅速衰减) 进行荧光定量 PCR, 因为甲基化 DNA 在经过处理之后含有更多的 GC 相对更难解链, 在 HRM 的过程中对荧光信号进行实时分析便可以知道 DNA 的序列信息以及甲基化情况的定量结果。

MS-HRM 继承了 HRM 方法的高敏感性、高通量、低污染的特点, 可以鉴定由于亚硫酸盐转化不完全与错误起始而造成的假阳性结果, 以及同源和异源甲基化, 这些特点都要优于基于电泳结果的分析。Amornpisutt 等^[39] 使用此法对胆管癌中 *OPCML* 和 *SFRP1* 基因的甲基化状态进行了定量检测, 发现其均处于高甲基化状态, 并且 MS-HRM 的敏感性、特异性和准确性均在 80% 以上。

3.4 重亚硫酸盐限制性内切酶联合分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)

COBRA 将亚硫酸盐处理后 DNA 的 PCR 产物用识别位点包含 CG 序列的限制性内切酶消化并进行电泳分离, 对产物进行探针杂交、扫描定量, 即可得出原样本中酶切位点发生甲基化的比例。Jacob 等^[40] 应用 COBRA 与测序相结合 (COBRA-Seq) 检测出在卵巢癌中 *GBGT1* 基因启动子区出现高甲基化。

3.5 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)

基因组 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后 PCR 扩增并

逆转录, 经鸟嘌呤特异性的 RNase TI 酶切后用 MALDI-TOF 检测可检测出原 DNA 中甲基化的胞嘧啶的位点。Sequenom 公司推出的 EpiTYPER 质谱反转录测序平台实现了质谱分析 DNA 甲基化的自动化、高通量化^[41]。虽然 MALDI-TOF-MS 质谱检测法具有高通量的特性, 在宫颈癌、肝母细胞瘤等研究中得到应用, 且在一定程度上可实现自动化, 但由于其设备昂贵、方法繁琐, 限制了其临床应用^[42]。

3.6 基于阵列杂交的检测平台infinium human methylation 450 BeadChip (Infinium 450K)

Infinium 450K 甲基化检测平台的原理是用两种不同的微珠来检测 CpG 的甲基化状态: U 微珠与未甲基化的 CpG 位点配对, M 微珠与甲基化的位点配对。未甲基化的靶点与 U 微珠上的探针配对, 实现碱基的延长与检测, 然而, 其与 M 微珠上的探针存在一个碱基的差异, 所以不能顺利延伸。此平台具有高通量与高基因组覆盖性的特点, 其能覆盖 99% RefSeq (NCBI reference sequence) 中的基因, 具有单核苷酸分辨率, 且能靶向同一个基因中的多个位点 (约 17 个探针)。除了每个基因的启动子区域外, 其探针还包括许多非 CGI (CpG island) 区域, 如 5'-UTR、第一外显子、基因体与 3'-UTR。相比于前一款 illumina infinium human methylation 27 BeadChip (Infinium 27K) 检测平台, 由于 Infinium 450K 在 27K 已有探针的基础上增加了使用两种不同染料以区分甲基化与未甲基化信号的新探针, 其覆盖位点更为全面, 可以帮助人们发现更多新的、位于传统 CpG 岛外的基因调控区域, 且排除了相邻 CpG 位点的甲基化差异的干扰^[43]。

3.7 变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)

Deng 等^[44] 借鉴了 DHPLC 检测点突变的方法, 把发生甲基化的多个 CpG 位点作为多位点突变。原理为, 先用亚硫酸氢盐修饰 DNA, 再用 PCR 扩增含 CpG 位点的靶序列, 采用 DHPLC 在部分变性温度下测定靶序列的保留时间。靶序列发生甲基化后, 其保留时间比未甲基化的靶序列明显增长。

DHPLC 法可以进行甲基化基因的筛查, 能够测定整个扩增区域内 CpG 位点的甲基化, 但是不能对甲基化 CpG 位点进行精确定位。如果靶 CpG 位点不是完全甲基化, 则 MSP 法和酶切法的非甲基化测定结果可能毫无意义, 而 DHPLC 法由于能够显示整个目标片段中所有 CpG 位点的总甲基化状态, 测定结果更可靠^[45]。

4 总结

4.1 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术分类

肿瘤细胞 DNA 甲基化检测技术根据 DNA 样本的预处理方式可以分为基于限制性酶切、基于亲和富集和基于亚硫酸盐转化三种类型, 这三种类型的预处理与不同的甲基化信息读取手段的灵活组合可以适用于不同细胞、组织的 DNA 甲基化检测。检测方法归类见表 1。

4.2 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术优缺点分类总结

DNA 样本预处理方法的选择主要由样本状况和通量需求来决定。如样本为经过福尔马林固定、石蜡包埋等处理, 则 DNA 的纯度和完整性都会有所下降, 这时使用限制性酶切的方法就很可能导致结果的偏差, 而使用对样本状况敏感性较低的亲和富集和亚硫酸盐处理则效果较好; 使用亲和富集的方法要求充足的样本 DNA 量, 而在样本较少或者样本细胞间个体差异明显时, 使用另外两种方法则更好; 由于限制性酶切与亲和富集方法操作的自动化程度低, 在需要高通量分析甲基化状态时则要选择亚硫酸盐处理的方法。

而在甲基化信息获取方法的选择上, 主要由分析的范围(全基因组或特定位点)与量化程度(定量或定性)来选择, 如测序虽能获得良好的量化分析与位点特异性的信息, 但进行全基因组的筛查成本太高; 凝胶电泳操作方便, 但不能用于定量分析等。具体的优缺点分析及总结如下(表 2、表 3、表 4)。

5 展望

目前的甲基化检测方法中, 就耗时长短来说, 传统的限制性酶切、亲和富集与亚硫酸盐修饰法耗时较长且操作繁琐, 在检测的便利性与实时性上打了一些折扣; 高通量测序平台快速、高效, 但价格不菲。目前迅速发展的纳米孔测序(nanopore sequencing)在甲基化检测中已经有了应用, 设备简单、操作方便, 无需预处理, 但是由于其样本 DNA 较少, 假阳性以及样本丢失的现象很严重, 并且由于 DNA 通过小孔的速率过快, 很多方法并不能满足检测所需要的碱基分辨率, 应用也相当局限^[47]。另外, Xu 等^[48]报道的化学氧化切割触发的指数扩增反应(chemical-oxidation cleavage triggered exponential amplification reaction, COEXPAR)可在 5 h 内实现等温的甲基化检测反应, 省去了样品准备时间, 也无需精确的热循环仪器, 并且可以通过改变氧化切割反应试剂实现对 5-hmC 的检测, 这对于发展甲基化检测方法是一个重要的启发。

DNA 甲基化异常和肿瘤的发生、发展有着密切的关系, DNA 的甲基化改变也为癌症的诊断和治疗提供了一条新途径, 可靠的甲基化检测结果对发病风险评估、早期诊断、疗效评价及预测复发等具有重要意义。然而, 就基因甲基化对表达的调控作用这一点来讲, 一个目的 CpG 岛上不同区段甲基化位点对基因转录活性的影响存在很大的差别, 在基因特异性 DNA 甲基化分析时存在的最大问题

表1 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术分类表

甲基化信息获取方式	DNA样本预处理方式		
	基于限制性酶切	基于亲和富集	基于亚硫酸盐转化
基于测序(Sanger、NGS)	RRBS	MeDIP-Seq MBDCap-Seq	RRBS BSPP COBRA-Seq
基于阵列杂交	DMH FL-MS-AFLP	MeDIP-array MBDCap- array	Infinium 450K
基于凝胶电泳	RLGS MS-AFLP RSMA	---	MSP
基于qPCR	---	---	Methylight MS-FLAG MS-HRM
基于斑点杂交	---	---	MSP-DB
基于飞行质谱	---	---	MALDI-TOF-MS (EpiTYPER)
基于毛细管电泳	MS-MLPA	---	---
基于变性高效液相色谱	---	---	DHPLC

表2 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术优缺点比较表(基于样本预处理方式)

优缺点	DNA样本预处理方式		
	基于限制性酶切	基于亲和富集	基于亚硫酸盐转化
优点	1. 检测CpG岛甲基化灵敏度高 2. 无需预知被检DNA的序列	1. 基因组检测速度快 2. 对样本DNA纯度、完整性要求低 3. 无需预知被检DNA序列	1. 对样本纯度、完整性要求较低 (如Illumina的检测平台等多可用于福尔马林固定、石蜡包埋的样本) 2. 易自动化, 易高通量检测 3. 不易受拷贝数变化的影响
缺点	1. 酶切不完全易造成假阳/阴性结果 2. 限于检测限制酶识别的位点 3. 样本DNA需纯度高、完整性高, 酶切时多须为双链DNA 4. 自动化程度低, 通量受限 5. 检测甲基化绝对程度时受拷贝数影响较大(如肿瘤细胞非整倍性)	1. CpG位点的密度影响富集的效率 2. 自动化程度低, 通量受限 3. 检测甲基化绝对程度时受拷贝数影响较大(如肿瘤细胞非整倍性)	1. 转化过程中样本易降解, 致产物不纯、完整性下降 2. 转化不完全造成偏差 3. 降低了序列复杂度, 易遗漏等位基因甲基化, 降低了阵列杂交的特异性

表3 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术优缺点比较表(基于甲基化信息获取方式)

获取方式	优点	缺点
基于测序	1. 分辨率高, 可达单碱基分辨率 2. 已有许多成熟的商业化平台 3. 可知确切甲基化位点	1. 人类细胞全基因组测序成本高昂
基于阵列杂交	1. 高通量检测准确度高、成本低 2. 全基因组筛查成本较低、覆盖广 3. 已有成熟的商业化平台(如Illumina Infinium 450K)	1. 探针组成对结果影响巨大
基于凝胶电泳	1. 操作简单 2. 结果易理解 3. 成本低廉	1. 不能定量分析 2. 一次分析的位点较少
基于qPCR	1. 可定量分析甲基化程度	1. 需qPCR仪, 成本较高
基于斑点杂交	1. 可同时分析一个系列的多个基因 2. 增加了MSP的特异性和准确性	1. 探针易被污染, 洁净度要求高
基于飞行质谱	1. 有自动化的平台(如EpiTYPER), 可高通量检测	1. 成本较为昂贵
基于毛细管电泳	1. 需要样本量少(20 ng) 2. 可以分析多个基因 3. 可用于石蜡包埋的组织	1. 分辨率不足, 易遗漏罕见的亚克隆 ^[46]

表4 肿瘤细胞DNA甲基化检测技术分类表(基于检测范围与量化程度)

量化程度	基于甲基化图谱检测	基于甲基化分型检测
定量或半定量	MeDIP-Seq MBDCap-Seq WGBS Infinium 450K FL-MS-AFLP DHPLC	MS-MLPA BSP(Sanger, Pyro-sequencing) RRBS BSPP Methylight MS-FLAG MS-HRM COBRA MALDI-TOF-MS (EpiTYPER)
定性	RLGS MS-AFLP DMH MeDIP-array MBDCap- array	RSMA MSP MSP-DB

是不了解这一点随意使用引物, 使研究的生物学意义不明, 而且用不同引物所得的研究结果没有办法横向比较, 甚至相互矛盾。为了获取更为精确的甲基化数据、更好地解读甲基化与基因表达的关系, 除了继续优化甲基化检测方法之外, 人们还需要将不同的分析方法联合使用, 融合多学科优势来确定关键性的 CpG 位点, 并准确地阐明甲基化与基因表达的关系。

[参 考 文 献]

- [1] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007, 128: 683-92
- [2] Nazarian R, Jazirehi AR. Epigenomics and targeted therapy in cancer. *Epigenomics*, 2014, 6: 571-5
- [3] Walter K, Holcomb T, Januario T, et al. Discovery and development of DNA methylation-based biomarkers for lung cancer. *Epigenomics*, 2014, 6: 59-72
- [4] Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, et al. A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9523-7
- [5] Yamamoto F, Yamamoto M, Soto JL, et al. *NotI*-*MspI* methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1946-56
- [6] White-Al Habeeb NM, Ho LT, Olkhov-Mitsel E, et al. Integrated analysis of epigenomic and genomic changes by DNA methylation dependent mechanisms provides potential novel biomarkers for prostate cancer. *Oncotarget*, 2014, 5: 7858-69
- [7] Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e128
- [8] Kantlehner M, Kirchner R, Hartmann P, et al. A high-throughput DNA methylation analysis of a single cell. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e44
- [9] Haam K, Kim HJ, Lee KT, et al. Epigenetic silencing of BTB and CNC homology 2 and concerted promoter CpG methylation in gastric cancer. *Cancer Lett*, 2014, 351: 206-14
- [10] Park JY, Kim D, Yang M, et al. Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer. *Lung Cancer*, 2013, 79: 198-204
- [11] Yamamoto F, Yamamoto M. A DNA microarray-based methylation-sensitive (MS)-AFLP hybridization method for genetic and epigenetic analyses. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271: 678-86
- [12] Muto Y, Maeda T, Suzuki K, et al. DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC Cancer*, 2014, 14: 466
- [13] Shi H, Yan PS, Chen CM, et al. Expressed CpG island sequence tag microarray for dual screening of DNA hypermethylation and gene silencing in cancer cells. *Cancer Res*, 2002, 62: 3214-20
- [14] Kok-Sin T, Mokhtar NM, Ali Hassan NZ, et al. Identification of diagnostic markers in colorectal cancer via integrative epigenomics and genomics data. *Oncol Rep*, 2015, 34: 22-32
- [15] Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 375-85
- [16] El Hajj N, Trapphoff T, Linke M, et al. Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes. *Epigenetics*, 2011, 6: 1176-88
- [17] Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res*, 2013, 23: 2126-35
- [18] Guo H, Zhu P, Yan L, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature*, 2014, 511: 606-10
- [19] Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*, 2014, 11: 817-20
- [20] Nair SS, Coolen MW, Stirzaker C, et al. Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics*, 2011, 6: 34-44
- [21] Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, et al. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Mol Carcinog*, 2015, 54: 178-88
- [22] Borno ST, Fischer A, Kerick M, et al. Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation. *Cancer Discov*, 2012, 2: 1024-35
- [23] Jadhav RR, Ye Z, Huang RL, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals estrogen-mediated epigenetic repression of metallothionein-1 gene cluster in breast cancer. *Clin Epigenetics*, 2015, 7: 13
- [24] Wang P, Tang JT, Peng YS, et al. XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis. *J Dig Dis*, 2010, 11: 343-51
- [25] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1827-31
- [26] Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*, 2011, 43: 768-75
- [27] Ziller MJ, Gu HC, Muller F, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 2013, 500: 477-81
- [28] Rong C, Cui X, Chen J, et al. DNA methylation profiles in placenta and its association with gestational diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2015, 123: 282-8
- [29] Lee EJ, Luo J, Wilson JM, et al. Analyzing the cancer

- methylome through targeted bisulfite sequencing. *Cancer Lett*, 2013, 340: 171-8
- [30] Ashktorab H, Daremipouran M, Goel A, et al. DNA methylome profiling identifies novel methylated genes in African American patients with colorectal neoplasia. *Epigenetics*, 2014, 9: 503-12
- [31] Kucuk C, Hu X, Jiang B, et al. Global promoter methylation analysis reveals novel candidate tumor suppressor genes in natural killer cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1699-711
- [32] Guo HS, Zhu P, Wu XL, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res*, 2013, 23: 2126-35
- [33] Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 2011, 27: 1571-2
- [34] Wang JW, Xia YD, Li LL, et al. Double restriction-enzyme digestion improves the coverage and accuracy of genome-wide CpG methylation profiling by reduced representation bisulfite sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14: 11
- [35] Porreca GJ, Zhang K, Li JB, et al. Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nat Methods*, 2007, 4: 931-6
- [36] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E32
- [37] Bonanno C, Shehi E, Adlerstein D, et al. MS-FLAG, a novel real-time signal generation method for methylation-specific PCR. *Clin Chem*, 2007, 53: 2119-27
- [38] Lan VT, Trang NT, Van DT, et al. A methylation-specific dot blot assay for improving specificity and sensitivity of methylation-specific PCR on DNA methylation analysis. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20: 839-45
- [39] Amornpisutt R, Prongvitaya S, Jearanaikoon P, et al. DNA methylation level of OPCML and SFRP1: a potential diagnostic biomarker of cholangiocarcinoma. *Tumour Biol*, 2015, 36: 4973-8
- [40] Jacob F, Hitchins MP, Fedier A, et al. Expression of GBGT1 is epigenetically regulated by DNA methylation in ovarian cancer cells. *BMC Mol Biol*, 2014, 15: 24
- [41] Suchiman HE, Sliker RC, Kremer D, et al. Design, measurement and processing of region-specific DNA methylation assays: the mass spectrometry-based method EpiTYP-ER. *Front Genet*, 2015, 6: 287
- [42] Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, et al. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer*, 2013, 13: 608
- [43] Sandoval J, Heyn HA, Moran S, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, 2011, 6: 692-702
- [44] Deng DJ, Deng GR, Smith MF, et al. Simultaneous detection of CpG methylation and single nucleotide polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: E13
- [45] Couvert P, Poirier K, Carrie A, et al. DHPLC-based method for DNA methylation analysis of differential methylated regions from imprinted genes. *Biotechniques*, 2003, 34: 356-62
- [46] Moelans CB, de Groot JS, Pan X, et al. Clonal intratumor heterogeneity of promoter hypermethylation in breast cancer by MS-MLPA. *Mod Pathol*, 2014, 27: 869-74
- [47] Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 349-53
- [48] Xu Y, Niu C, Xiao X, et al. Chemical-oxidation cleavage triggered isothermal exponential amplification reaction for attomole gene-specific methylation analysis. *Anal Chem*, 2015, 87: 2945-51