

DNA 甲基化检测方法研究进展

邢宝松¹, 郭启祥², 马 强¹, 阎祥洲¹, 白红杰¹

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南省出入境检验检疫局, 河南 郑州 450003)

中图分类号: Q75 文献标识码: B 文章编号: 1004-3268(2007)11-0017-03

DNA 甲基化是一种重要的遗传外修饰, 是表观遗传学(epigenetics)的重要组成部分^[1]。它参与了动物胚胎发育、基因印迹和 X 染色体失活等过程, 在基因表达的调控中具有重要作用, 异常甲基化可以导致肿瘤的形成。DNA 甲基化与组蛋白去乙酰化协同调节基因的表达。DNA 甲基化可以随着外界环境因素的变化而改变。在哺乳动物胚胎移植和体细胞核移植(SCNT)过程中, 人工操作会引起 DNA 甲基化修饰改变, 从而影响成功率。2003 年, 继人类基因组计划结束后, 人类表观基因组协会(HEC)宣布开始投资和实施人类表观基因组计划(HEP)^[2]。其主要任务是绘制出人类基因组中甲基化可变位点图谱。在农业方面, 已经将 DNA 甲基化作为一种分子标记应用于农作物以及家畜动物杂交育种相关理论研究^[3~5], 通过分析亲子代 CpG 岛甲基化的变化差异及其对杂种表现的影响, 从表观遗传学角度揭示杂种优势的生物学基础, 为提高农作物以及畜禽生产力提供新的途径, 也为鉴定和

分离与杂种优势有关的基因提供一些新的思路。因此, DNA 甲基化的研究逐渐成为新的研究热点。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。因此, 探讨甲基化形成与改变的可能机制, 建立准确性高, 灵敏度高, 操作简单的 DNA 甲基化检测方法, 对探讨甲基化调控规律, 提高哺乳动物体细胞核移植效率、揭示杂种优势的表观遗传学基础意义重大。

1 DNA 甲基化的研究方法

1.1 甲基化敏感限制酶方法

甲基化敏感限制酶方法是经典的甲基化分析方法, 主要根据一些限制性内切酶不能切开甲基化的 DNA 序列。由于在真核 DNA 或者哺乳动物 DNA 中, 只有 CG 相连的胞嘧啶能够被甲基化, 因此, 在酶切位点内包含 CG 序列的限制性内切酶就会遇到问题。这种方法所使用的两个经典酶对是 Hpa II—Msp I (CCGG)和 Sma I—Xma I (CCCGG)。

收稿日期: 2007-07-20

作者简介: 邢宝松(1969-), 男, 河南新密人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。

- [24] 吴保国, 温亮宝. 森林重大病虫害诊治专家咨询系统的研究[J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(6): 113—118.
- [25] 闫飞燕, 文仁来, 张述宽, 等. 广西玉米病虫害诊断决策专家系统的建立与应用[J]. 广西农业科学, 2006, 37(4): 374—378.
- [26] 邵刚, 李志红, 王维瑞, 等. 北京地区蔬菜病虫害远程诊治专家系统 VPRDES 的研究[J]. 植物保护, 2006, 32(1): 51—54.
- [27] 郑永利, 程家安, 章强华. 专家系统及其在植保领域中的应用和发展[J]. 中国稻米, 2004(2): 31—33.
- [28] 杨怀卿, 李生才, 景晓红. 棉田有害生物综合治理多媒体辅助系统[J]. 计算机与农业, 2001(8): 21—23.
- [29] 薛冬娟, 张冬冬, 蒋文科, 等. 作物病虫害综合治理地理信息系统[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(5): 104—109.
- [30] 孙莉, 包安明, 陈嘻, 等. 3S 技术在新疆棉花精准种植中的应用[J]. 中国棉花, 2004, 31(6): 7—9.
- [31] 张映梅, 李修炼, 赵惠燕. 人工神经网络及其在小麦等作物病虫害预测中的应用[J]. 麦类作物学报, 2002, 22(4): 19.
- [32] 高苹, 居为民, 陈宁, 等. 人工神经网络方法在赤霉病预报中的应用研究[J]. 中国农业气象, 2001, 22(2): 21—24.
- [33] 余水清, 朱伟兴, 等. 基于 Net 和 Web Service 的移动专家系统的研究—以番茄病虫害诊断为例[J]. 农机化研究, 2006(1): 206—300.

由于第二对限制酶识别序列非常罕见,所以一般都用 *Hpa* II—*Msp* I (CCGG)。两个酶都识别 CCGG 序列,而当其中的胞嘧啶甲基化时,*Hpa* II 不能够将其切开,这就使得 *Hpa* II—*Msp* I 能够作为快速甲基化分析的工具。但是这个方法有些不足:首先,并不是所有的 CG 都位于 CCGG 序列内,意味着一些可能的甲基化位点没有被检测到;另外一个问题是必须用复杂的 Southern Blot 杂交。这种方法还要求有高分子量 DNA 及有较多甲基化的等位基因,而且仅能检测到限制性内切酶能够识别的 CpG 序列^[6]。尽管如此,甲基化敏感限制酶法仍然是甲基化分析的首选方法。

1.2 限制性酶及 PCR 的方法

Herman 等^[7] 1996 年在使用重亚硫酸盐处理的基础上新建的一种方法。即用限制性内切酶(对甲基化不敏感与敏感的同裂酶)切割后,再用含有酶切位点序列的引物进行 PCR 扩增。检测甲基化敏感酶的 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;若用针对处理后的非甲基化 DNA 链的引物扩增出片段,则说明被检测的位点不存在甲基化。这种方法虽然可以提高 DNA 量少时检测的敏感性,但它同样存在不足,比如在限制性酶消化不完全情况下会出现假阳性结果。

1.3 直接测序法

直接测序法之一是基因组直接测序法。基因组 DNA 经 Maxam—Gilbert 化学裂解法进行处理,并以连接接头介导的 PCR(linker mediated PCR, LM—PCR)对信号强度进行放大,可以增加甲基化检测的敏感性,这是过去一直沿用的研究 DNA 甲基化方法。这种方法的缺点是技术要求较高,而且容易出现假阳性及假阴性。另外一种是由 Frommer 等提出的研究 DNA 甲基化方法^[8]。其过程是:重亚硫酸盐使 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶(C)脱氨基转变成尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶保持不变,进行 PCR 扩增所需片段后,尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶(T),最后对 PCR 产物进行测序并且与未经处理的序列比较,判断 CpG 位点是否发生甲基化。这种方法的可靠性及精确度都很高,能检测到目的片段中每一个 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,费用也比较高^[9]。

1.4 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP)

亚硫酸氢盐可以氧化去除基因组 DNA 中胞嘧

啶的氨基,在此反应中除 m5C 外其余胞嘧啶均可被转变为尿嘧啶。然后将这些靶序列用特异引物扩增,经过扩增的 DNA,所有尿嘧啶均转化为可检测的胸腺嘧啶,只有 m5C 以胞嘧啶形式被扩增。这种方法是目前所使用的在给定基因组靶序列中分析 m5C 最常用的方法。可以检测到每个 CpG 位点的甲基化情况。基于此原理,发展出亚硫酸氢盐去氨基反应后,结合 PCR 扩增的快速方法来检测 m5C,称为甲基化特异 PCR (MSP),这种 MSP 方法运用特别设计的针对甲基化的和非甲基化序列的引物,从而得到特异扩增的甲基化或非甲基化靶序列。目前已经被广泛应用到 CpG 岛甲基化检测。此方法适用范围很广,可以检测包括已知的、接近 PCR 引物的及限制性酶切范围的 CpG 双核苷酸序列的甲基化状况^[10]。

1.5 其他甲基化分析方法

前面 4 种方法以及络合物介导 PCR/脲反应/高锰酸盐反应、原位 MSP 杂交法、甲基化敏感性单核苷酸引物延伸法 (methylation—sensitive single nucleotide primer extension, Ms—SnuPE)、结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 以及甲基化敏感性单链构象分析法 (methylation—specific single—strand conformation analysis, MS—SSCA) 等主要应用于单基因序列特异性甲基化分析和特异性位点 DNA 甲基化分析;目前应用于全基因组序列特异性甲基化分析的方法有:甲基化差异性杂交显示 (differential methylation hybridization, DMH)、寡核苷酸微阵列法、基因组限制性酶切扫描法 (restriction landmark genome scanning, RLGS)^[6]、MBD (methyl—CpG binding domain column chromatography, 甲基化结合区) 柱层析法^[11]、联合甲基化敏感性限制性内切酶的 MBD (combination of methylated—DNA precipitation and methylation—sensitive restriction enzymes, COMPARE—MS)^[12]。

研究甲基化的方法之多,一方面说明了甲基化研究难度大,另一个方面也说明这些方法都存在着一定的限制。面对具体问题,选择最合适的解决方法就显得尤为重要。首先,根据研究目的选择合适方法。应该明确是研究整体水平的甲基化还是特定位点的甲基化,或是要发现全基因组中新的甲基化位点;其次,根据客观条件筛选方法,如:目标序列是否已知,是定量研究还是定性研究,样本来源及数量如何,是否需要高通量的样本检测方法;最后,全面

分析,选取敏感、可靠、经济、简便的方法,以达到理想的效果。

2 问题与展望

DNA 甲基化在哺乳动物中起着重要的调节作用。有充分证据说明 DNA 甲基化在发育和细胞分化过程中对特异基因的表达或者沉默起重要作用。DNA 甲基化的选择性调节在临床上可以用来预防和治疗癌症。要制定安全有效的针对改变 DNA 甲基化的治疗策略,必须彻底搞清楚对甲基化和去甲基化过程起特异性调节作用的因素。同样,搞清楚参与 DNA 甲基化诱导基因沉默的因素可以使试图选择性调节基因表达的努力变得更为容易。最近的研究已经将 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化作用两种整体机制联系起来,但仍须对 DNA 甲基转移酶、去甲基酶、甲基胞嘧啶结合蛋白、组蛋白去乙酰化作用以及基因转录静止之间的复杂联系作进一步研究。随着甲基化研究的不断深入,甲基化分析技术将逐步完善。完善的研究技术将提供强有力的技术支持,必将探寻到更多的新甲基化位点,从而为表观遗传、胚胎发育、基因印迹及肿瘤研究提供一些新的思路,也为动植物育种提供新一代的分子标记奠定基础。

参考文献:

[1] Wu C T, Morris J R. Genes genetics and epigenetics; a correspondence[J]. Science, 2001, 293: 1103—1105.
[2] 黄庆, 郭颖, 府伟灵. 人类表观基因组计划[J]. 生命的化学, 2004 24(2): 101—102.
[3] Xiong L Z, Liu K D, Dai X K, *et al.* Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of

rice using an F2 population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 243—251.
[4] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 猪个体 DNA 甲基化百分差异与胴体性状的关系[J]. 农业生物技术学报, 2005 13(2): 179—185.
[5] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. DNA 甲基化差异对猪生长性状的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2005 36(2): 105—110.
[6] 白桦, 邓大君. CpG 岛过甲基化检测技术比较[J]. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25(2): 121—125.
[7] Herman J G, Graff J R, Myohanen S *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821—9826.
[8] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1827—1831.
[9] 沈佳尧, 侯鹏, 祭美菊, 等. DNA 甲基化方法研究现状[J]. 生命的化学, 2003, 23(2): 149—151.
[10] Murphy S K, Wylie A A, Jirtle R L. Imprinting of PEG3, the human homologue of a mouse gene involved in nurturing behavior[J]. Genomics, 2001, 71: 110—117.
[11] Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates A J, *et al.* Methyl-CpG binding domain column chromatography as a tool for the analysis of genomic DNA methylation[J]. Ana Biochem, 2004 329(1): 1—10.
[12] Yegnasubramanian S, Lin X, Haffner M C, *et al.* Combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes (COMPARE-MS) for the rapid, sensitive and quantitative detection of DNA methylation[J]. Nucleic Acids Res 2006 34(3): e19.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准,本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位,为便于读者阅读,现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里,千米 m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km= 1 000m, 1 m= 100cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1 000 kg, kg= 公斤,千克 g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000kg, 1 kg= 1 000 g, 1 g= 1 000mg, 500g= 1 市斤, 50g= 1 两
- 3 面积单位: m²= 平方米, hm²= 公顷, cm²= 平方厘米; 换算: 1 hm²= 10 000 m²= 15 亩, 1 亩= 667 m²
- 4 浓度单位: 1mg/ kg, mg/ L 或 mg · kg⁻¹, mg · L⁻¹, μl · L⁻¹= 1× 10⁻⁶= 1 ppm, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1× 10⁻⁶表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d, h, min, s”表示

(本刊编辑部)