

• 综 述 •

DNA 甲基化分析技术的研究进展*

罗 君 综述, 凌志强[△] 审校

(浙江省肿瘤医院/浙江省肿瘤研究所, 浙江杭州 310022)

关键词: DNA; 甲基化; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)06-0691-03

近年来,在肿瘤表观遗传学研究领域,DNA 甲基化受到越来越多的关注。原因可能是 DNA 的分子结构相对稳定,提取及保存更为容易,在不同的组织标本中均能被有效检出。然而,要将其真正应用于临床,还亟需发展一种兼具灵敏性、特异性及可操作性的检测手段。目前一般认为有两种甲基化检测思路^[1]:即甲基化分型和甲基化组学。前者通常是对单个基因或较少基因进行检测,后者则是对全基因组进行甲基化分析,又叫甲基化谱。本文围绕这两类检测技术及其在临床检验方面的应用价值进行综述。

1 甲基化分型

1.1 甲基化特异的聚合酶链反应(MSP) MSP 的原理是将重亚硫酸盐处理后的 DNA 作为模板,在基因启动子 5' 端富含胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)位点的甲基化多发区域设计两对引物,一对针对甲基化的模板,另一对针对未甲基化的模板,通过凝胶电泳法,判定哪一对引物能有效扩增出目标基因,以此作为甲基化与否的标准。此法简单且易于操作,是目前应用最为广泛的甲基化定性分析手段。Balaña 等^[2]用 MSP 法对恶性胶质瘤的石蜡包埋标本及血清标本中的 MGMT 基因进行甲基化分析,发现组织与血清中的甲基化状态基本一致(总符合率为 81.1%)。在组织中甲基化阴性的患者,用 MSP 法检测血液中的甲基化状态,其敏感性为 95.5%,特异性为 60%。该研究证明 MSP 在甲基化状态的检测中具有良好的灵敏性,在难以获取肿瘤组织的情况下,通过血清中肿瘤相关基因的 MSP 测定,同样可以获得满意的结果。

虽然 MSP 在甲基化研究中被广泛使用,但其亦有不足之处。同样用 MSP 法检测乳腺癌患者中 RASSF1A 基因启动子区域的甲基化率,Tan 等^[3]的实验结果(42.1%,8/19)与 Heller 等^[4]的检测数据(78.1%,75/96)存在较大不同。分析原因,标本差异固然是其中重要因素(Heller 选用石蜡包埋的组织标本,而 Tan 选用了血清标本),但不可否认,MSP 法在甲基化检测时除仅能定性分析外,还存在明显的缺陷。首先,MSP 需要两组已知的 CpG 位点设计上游、下游引物,并且这些位点必须完全甲基化或完全不甲基化,事实上完全满足上述条件的基因并不多,在扩增时常形成许多非特异性产物,影响对结果的判定。第二,在重亚硫酸盐预处理时可能因处理不完全导致最终结果出现假阳性。第三,在一些需要配对样本比较的研究中,癌组织和癌旁正常组织间必然存在 DNA 拷贝数的偏差,因此难以顾及甲基化的组织特异性和不均一性。因此,人们在传统 MSP 的基础上发展了一些新的检测手段,提高实验的准确性。

Suijkerbuijk 等^[5]采用传统 MSP,定量多重 MSP(QM-MSP)和甲基化特异性多连接依赖性探针扩增(MS-MLPA)这 3 种方法比较乳腺癌中 4 个基因的甲基化状态。结果发现:有 10% 用传统 MSP 判定为未甲基化的样本,使用 QM-MSP 分析

检测到超过 50% 的甲基化率。在灵敏度方面,QM-MSP 最少能在 1 ng 的 DNA 中检测到甲基化,是另两种方法的 10 倍。可见 QM-MSP 是传统 MSP 基础上更加优化的检测方法。Malpeli 等^[6]用 MSP 和焦磷酸测序法结合分析胰腺内分泌肿瘤及相应正常组织中 RASSF1 基因的甲基化状态。结果在 80% (16/20) 的肿瘤组织和 65% (13/20) 的正常胰腺组织中检测到 RASSF1 基因甲基化。研究者将两种检测手段结合,提高了实验的可信度。

1.2 甲基化敏感的高分辨率溶解分析(MS-HRM) MS-HRM 的设计原理是:样本 DNA 经重亚硫酸盐处理后,因胞嘧啶转化为尿嘧啶,而 5-甲基胞嘧啶则不发生转化,故原 DNA 中未被甲基化的 CG 碱基对(3 个氢键)均变为 AT 碱基对(2 个氢键),而甲基化的 CG 则不发生改变。CG 含量高的 DNA 解链温度(T_m)更高,因此通过对溶解曲线分析,就可知 T_m 值越高,基因甲基化程度就越深。借此便可区分完全甲基化、部分甲基化及未甲基化状态。

MS-HRM 技术的使用,使人们得以区分部分甲基化在标本中的存在,因此更具有临床应用价值。在关于皮肤癌的研究中,有人对 195 例病变组织中的 AKAP12 基因启动子区域进行 MS-HRM 分析,发现 AKAP12 的甲基化率明显高于正常组织,因此研究者认为 MS-HRM 法是一种快速及高通量的甲基化检测手段^[7]。Kristensen 等^[8]在 54 例非小细胞肺癌的石蜡标本中对 CDKN2A 基因和 RARB 基因进行甲基化分析,发现使用 MS-HRM 能对超过 30 年历史的石蜡标本进行准确测定,证明该方法具有相当的灵敏性和稳定性。在实践中人们还发现,不同检测方法的联合使用可使实验结果更为可靠。Candiloro 等^[9]在 10 例慢性淋巴细胞性白血病标本中对 DAPK1 基因的异构甲基化进行综合分析,他们首先使用 MS-HRM 对目标基因进行扩增和分析,去除掉非甲基化样品,再以焦磷酸测序法直接利用前一步中甲基化阳性的扩增产物,定量分析 DAPK1 中每一个 CpG 二核苷酸的甲基化信息。研究者认为,两种方法具有良好的互补性,即保证精确定量,又可减少不必要的浪费,非常适合联合应用。

与 MSP 相比,MS-HRM 仅需一对 PCR 引物,因此操作更为简单;不需要内参基因,因此结果误差更小;可对杂合基因进行检测,因此实验灵敏度更高。然而,MS-HRM 对实验条件和设备要求相对 MSP 而言较高,在精确检验方面又不如基因测序,还需要进一步改进及完善。

1.3 甲基荧光法 该法同样需要先用重亚硫酸盐处理待测 DNA 片段,再进行 PCR 扩增。不同之处在于其上下游引物及探针的设计。探针的 5' 端标记报告荧光,3' 端标记猝灭荧光。退火阶段,TaqDNA 聚合酶从 5' 端到 3' 端外切探针,导致报告荧光与淬灭荧光分离,从而产生与扩增产物的量呈正比的荧光

* 基金项目:浙江省科技计划项目(2009C33143)。作者简介:罗君,男,住院医师,主要从事肿瘤学基础医学研究。△ 通讯作者,E-mail: lingzq@hotmail.com。

信号,并由此分析 DNA 模板的甲基化状态^[10]。

甲基荧光法不仅将传统的 MSP 检测定量化,更能有效减少因预处理不完全导致的假阳性结果,是目前 DNA 甲基化相关的临床检验学研究中广泛采用的方法之一。在宫颈上皮不典型增生的诊断方面,过去仅靠镜下判断,这种方法很大程度上受病理科医师的主观因素影响。人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的测定可帮助判断病变的危险程度,但 HPV 感染与否并不能反映宫颈上皮细胞分子水平的改变。因此有人研究宫颈上皮不典型增生与基因甲基化的关系。他们发现从正常组织依次到低度鳞状上皮内病变、高度鳞状上皮内病变,再到鳞状上皮癌,待测基因的甲基化率逐渐升高,并发现 HS3ST2 基因是区别高度鳞状上皮内病变/鳞状上皮癌和正常组织/低度鳞状上皮内病变的最佳生物标记($P < 0.01$)^[11]。基荧光法在甲基化检验中的准确性和可靠性由此得到了很好的证明。

甲基荧光法不但可用于检测新鲜组织中的 DNA 甲基化水平,还可在石蜡包埋组织或外周血中进行定量甲基化测定^[12-13],而且通过对引物不同颜色的荧光标记组合,亦能检测多个位点的甲基化水平。He 等^[12]采用多重甲基荧光法分析结肠癌患者新鲜组织及外周血中 ALX4、SEPT9 与 TMEFF2 基因的甲基化状态,结果待测基因的甲基化率在组织中和外周血中的甲基化率基本相符,其敏感性分别为 84% 和 81%,特异性分别是 87% 和 90%,显示了令人满意的多位点甲基化测定优势。在临床和科研实践中,人们通过对引物长度和结合位点的设计,不断完善甲基荧光法的灵敏度和特异性。Zhou 等^[14]在口腔黏膜组织中检测 p16 基因的甲基化水平,通过将传统的 70 bp 扩增产物变为 115 bp 扩增产物,覆盖了更多的 MSP 扩增位点,从而将甲基化特异性从 84.5% 提高到 98.3%,很大程度上提高了实验精确度。

总体来说,甲基荧光法的优点是高灵敏度,高通量,重复性好,能快捷地检测样品中的相关生物学信息^[15]。即使在非甲基化等位基因超过 10 000 倍的情况下仍可定量检测到甲基化信息^[16]。缺点是费用高,测定每个位点都需两端标有荧光素的探针,并且对非均质的 DNA 甲基化检测结果不可靠。

1.4 焦磷酸测序法 该法被称为甲基化分析的金标准。其原理主要是:DNA 聚合酶在催化脱氧核苷酸按照互补配对原则连接成脱氧核苷酸链的过程中,释放出焦磷酸盐,后者在 ATP 硫酸化酶的催化下变成 ATP,又在荧光素酶催化作用下转化为光能。在此基础上,有人将四种不同的碱基逐步加入 DNA 延伸反应体系中,根据反应信号的有无来判断延伸上去的是哪种碱基,通过测序引物将待检测片断扩增出来之后,采用焦磷酸测序仪测序,杂合子样本在 CpG 位点会出现两种碱基序列,根据阳性样本与阴性样本含量的不同,峰值高低会有所不同,就以不同的信号峰作为定量分析的根据。

许多临床研究均采用了该技术进行甲基化分析。如 Shaw 等^[17]在 79 例口腔鳞癌组织中进行 5 个基因的甲基化位点检测,发现 P16 基因是口腔肿瘤高度特异性的甲基化模型,这在以往使用 MSP 法的口腔肿瘤研究中从未被报道。此足可证明该法是一种精确定量并多位点检测的先进检验手段。而 Brakensiek 等^[18]通过该法测定骨髓增生异常综合征(MDS)和急性髓细胞白血病(AML)患者骨髓中的 CDKN2B 基因启动子上 68 个 CG 位点的甲基化状态,发现 MDS 的 4 个分型之间以及 AML 与对照组间都具有各自不同的特异性甲基化模式,利用该技术能有效区分各个亚型和用于该疾病的辅助诊断。焦磷酸盐测序法的优点是引入内部对照,能检测并定量甲基化水平上的细微改变,既适用于甲基化程度不均一的样本检

测,又适用于测定单个位点甲基化的频率。不足是检测 CpG 位点的数量有限,只能针对已确定的目标区域进行甲基化定量分析。

2 甲基化谱

随着单基因的甲基化检测方法日益完善,人们更渴望实现全基因组水平的甲基化分析。在这一领域,先后曾涌现出第一代液相色谱法和第二代凝胶基础的甲基化图谱分析,但 20 世纪九十年代中期的基因芯片技术的产生成为了甲基化组学的革命性成果,从此人们在甲基化组学方面进行了大量研究,使得全基因组的甲基化分析逐渐走向现实。

基因芯片是将数以万计的 DNA 探针有序地固定于支持物表面,产生二维 DNA 探针阵列,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号来实现对待测 DNA 进行快速、高效的检测及诊断。Marsit 等^[19]通过对 112 例膀胱癌患者和 118 例健康人血液中的甲基化谱分析,发现甲基化水平最高的人群患膀胱癌的概率可上升 5.2 倍,证明了可通过基因芯片检测甲基化水平反映患膀胱癌的风险程度。这一结果对未来的临床肿瘤防治具有重要意义。基于基因芯片技术的 DNA 甲基化检测方法有很多。如全基因组的瓦片阵列,它常常和免疫共沉淀法(meDIP)联合应用,虽然当存在高密度的 CpG 位点时,免疫共沉淀结果可能产生偏移。但该方法理论上能检测全基因组的任何序列,仍不失为一种较可靠的检测手段。Hayashi 等^[20]用上述方法检测了三个结肠癌细胞株的编码区,可测定达 700 个候选位点的甲基化水平。此外,BAC 微阵列技术也同样适用于大规模、多位点的甲基化检测,Ching 等^[21]曾采用此法检测不同组织中基因组范围的 CpG 岛甲基化水平,而 Arai 等^[22-23]在肝癌和肾癌中利用 BAC 微阵列技术进行的大范围的甲基化分析,其结果准确可靠,具有较好的可重复性。但是该方法受到酶切位点限制,样品中关键碱基的突变可能造成结果的假阳性或假阴性。

以测序为基础的甲基化谱分析是一种重要的全基因甲基化检测手段。Eckhardt 等^[24]曾使用这一技术成功地对 12 种不同组织中的 3 条人类染色体进行了甲基化谱的分析。获取了约 190 万个 CpG 位点的甲基化信息,揭示了不同组织中表观遗传学的差异。高通量测序仪是近年来发展起来的对全基因组进行快速测序的一项高新技术,并且其成本较以往的检测方法更为低廉。目前已有四种高通量测序仪投放市场,分别是 454 测序仪、Solexa 测序仪、SoLiD 测序仪和单分子测序仪。新兴的大规模平行测序法又被称为“下一代”的测序方法,它使获取目标基因的大量信息变得更加容易。在未来,开发高通量、高精度和低成本的测序技术是应该是甲基化组学研究的发展方向。

3 展望

综上所述,DNA 甲基化水平的测定是相关研究的基础,可靠的甲基化信息可能对发病风险评估、早期诊断、疗效评价及预测复发等具有重要意义。目前常用的甲基化检测方法中,并没有一种能同时满足高灵敏度及高特异性的要求。为了获取更为精确的甲基化数据,也许不同分析方法的联合使用及互相验证是其解决之道,而在技术细节方面的微调有时亦能起到积极作用,如付文荣和程正江^[25]通过对分析顺序的调整便有效提高了 PCR 结果的准确性。当然,找到一种理想的新检测方法对于 DNA 甲基化的研究更是具有重要的意义,需要更多的研究和关注。

参考文献

[1] Heller G, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Lung cancer: from

- single-gene methylation to methylome profiling[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 95-107.
- [2] Balaña C, Carrato C, Ramirez JL, et al. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients[J]. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13(9): 677-685.
- [3] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3[J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(5): 1225-1230.
- [4] Heller G, Ziegler B, Brandstetter A, et al. CDK10 is not a target for aberrant DNA methylation in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(10): 3939-3944.
- [5] Suijkerbuijk KP, Pan X, van der Wall E, et al. Comparison of different promoter methylation assays in breast cancer[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2010, 33(3): 133-141.
- [6] Malpeli G, Amato E, Dandrea M, et al. Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1): 351.
- [7] Wu W, Zhang J, Yang H, et al. Examination of AKAP12 promoter methylation in skin Cancer using methylation-sensitive high-resolution melting analysis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2011, 36(4): 381-385.
- [8] Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, et al. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM[J]. *2009*, 9(1): 453.
- [9] Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(4): 500-507.
- [10] Dahl C, Guldborg P. DNA methylation analysis techniques[J]. *Biogerontology*, 2003, 4(4): 233-250.
- [11] Lim EH, Ng SL, Li JL, et al. Cervical dysplasia: assessing methylation status (Methy Light) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFPI2 to improve diagnostic accuracy[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(2): 225-231.
- [12] He Q, Chen HY, Bai EQ, et al. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202(1): 1-10.
- [13] Dallol A, Al-Ali W, Al-Shaibani A, et al. Analysis of DNA methylation in FFPE tissues using the MethyLight technology [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 724(1): 191-204.
- [14] Zhou J, Cao J, Lu Z, et al. A 115-bp MethyLight assay for detection of p16(CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues [J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12(1): 67.
- [15] Brena RM, Huang TH, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings[J]. *J Mol Med*, 2006, 84(5): 365-377.
- [16] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(8): E32.
- [17] Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral Cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(4): 561-568.
- [18] Brakensiek K, Wingen LU, Länger F, et al. Quantitative high-resolution CpG island mapping with Pyrosequencing reveals disease-specific methylation patterns of the CDKN2B gene in myelodysplastic syndrome and myeloid leukemia [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(1): 17-23.
- [19] Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, et al. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(9): 1133-1139.
- [20] Hayashi H, Nagae G, Tsutsumi S, et al. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array[J]. *Hum Genet*, 2007, 120(5): 701-711.
- [21] Ching TT, Maunakea AK, Jun P, et al. Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3 [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(6): 645-651.
- [22] Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues [J]. *Pathobiology*, 2011, 78(1): 1-9.
- [23] Arai E, Ushijima S, Gotoh M, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(12): 2854-2862.
- [24] Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22 [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1378-1385.
- [25] 付文荣, 程正江. SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测 survivin 甲基化状态 [J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(11): 992-994, 997.

(收稿日期: 2012-10-09)

• 综 述 •

适体在均相检测中的应用

马洪玉 综述, 兰小鹏 审校

(南京军区福州总医院检验科, 福建福州 350025)

关键词: 适体; 均相检测; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)06-0693-05

核酸适体是通过指数式富集法配体进化 (SELEX) 技术从人工合成的 DNA 或 RNA 随机库中筛选出来的, 能够与目标分子进行高亲和性和高特异性结合的寡核苷酸序列^[1-2]。适

体, 经常被称作“合成抗体”, 可以在疾病的诊断和治疗方面与抗体相媲美: 适体与靶物质结合具有很高的亲和力, 解离常数可达 nmol, 甚至 pmol 水平, 有时甚至优于抗体; 适体的靶分子