

## 综 述

## DNA 甲基化微阵列\*

黄 庆 府伟灵\*\* 张 华 郭 颖

(第三军医大学西南医院检验科 重庆 400038)

**摘要** DNA 甲基化微阵列是近年发展起来的高通量分析基因组水平 DNA 甲基化状态和模式的新型技术,已成为肿瘤表观遗传学组研究的重要工具之一。利用 DNA 甲基化微阵列研究某种疾病状态下异常甲基化的基因有利于进一步明确该疾病的表观遗传学异常机制,发现与之相关的表观遗传学标志物。现有的 DNA 甲基化微阵列主要包括 CpG 岛微阵列和甲基化寡聚核苷探针微阵列,根据已有的文献资料,较为详细地阐述了上述技术的原理、特点和适用范围,对于研究者根据自己的研究目的选择适当的 DNA 甲基化微阵列技术具有一定的指导价值。

**关键词** DNA 甲基化 表观遗传学 DNA 微阵列 CpG 岛 基因组文库

DNA 甲基化是表观遗传学 (epigenetics) 研究的重要内容。DNA 高甲基化所致抑癌基因表观遗传学沉默 (epigenetic silencing) 直接参与了肿瘤的发生机制,是 Knudson“二次打击 (two-hits)”经典假说的重要补充内容<sup>[1,2]</sup>。DNA 甲基化分析技术是表观遗传学研究的技术平台,它经历了一个由简单到复杂、模糊到精确的演变过程<sup>[3,4]</sup>。DNA 甲基化微阵列的出现标志着 DNA 甲基化高通量分析时代的到来,它可精确分析和判断 DNA 甲基化状态和模式,筛选表观遗传学候选基因,提供表观遗传学生物标志物 (epigenetic biomarkers)。本文根据已有的文献报道,回顾和总结了 DNA 甲基化微阵列由发展之初到目前的研究动态及相关的技术环节内容。

## 1 CpG 岛 (CpG islands, CGIs) 微阵列

CGIs 微阵列是利用 CGIs 文库制备的 DNA 微阵列,它类似于基因组研究中的 cDNA 微阵列<sup>[5-7]</sup>。CGIs 文库应用优势体现在:CGIs 文库克隆测序并递交核酸数据库 (如 NCBI GenBank) 即可获得准确的 CGIs 来源基因;CGIs 主要位于基因的启动子区和第一个外显子

区,经比对核酸数据库后,可获得 cDNA 微阵列所不能检测到的低丰度的新基因;可筛选到高甲基化的新基因<sup>[6-8]</sup>。

### 1.1 CGIs 文库的制备

DNA 微阵列的制备和检测技术、分析方法等已十分成熟,因此,CGIs 文库的制备与筛选成为 CGIs 微阵列成功与否的核心与关键所在。CGIs 文库制备是利用大鼠的具有甲基化结合域 (methylation binding domain, MBD) 的重组蛋白制备 MBD 层析柱,通过控制缓冲液和洗脱液盐浓度,多次洗脱即可富集到 CGIs 序列<sup>[15]</sup>。由于人类基因组中的重复序列 (如 Alu) 也是 CpG 富含序列,因此,最初得到的 CGIs 文库还需要使用单纯的重复序列基因组 (如 Human Cot-1 DNA) 经消减杂交 (subtractive hybridization) 扣除重复序列才能筛选到真正的 CGIs 文库<sup>[5,6]</sup>。可见,CGIs 文库制备涉及步骤多,操作烦琐,不适合中小实验室自己构建特定细胞 (如某种肿瘤) CGIs 文库。目前,已有商品化的人类、小鼠和大鼠的 CGIs 文库。

### 1.2 基于差式甲基化杂交技术的 CGIs 微阵列

CGIs 微阵列的应用目的是分析基因组在某种疾病状态下异常高甲基化的已知或未知基因,从而发现和探寻与该疾病相关的表观遗传学机制,并找到可能的表观遗传学标志物 (epigenetic markers)。因此,与 CGIs 微阵列进行杂交的目的片段是一群特殊的基因群体,

收稿日期: 2005-01-11 修回日期: 2005-06-29

\* 国家自然科学基金资助项目 (30370398); 重庆市自然科学基金资助项目 (2004-27-22)

\*\* 通讯作者, 电子信箱: weilingfu@yahoo.com

即某种疾病状态下表现为异常高甲基化的基因,如高甲基化的抑癌基因 CGIs。可见,基因组序列并不能直接应用于 CGIs 微阵列杂交,而应当对基因组中高甲基化 CGIs 进行特异性的筛选和扩增后才能应用于 CGIs 微阵列,这也是 CGIs 微阵列应用于 DNA 甲基化分析的一个必要条件。在 DNA 甲基化微阵列应用中,如果采用类似于制备 CGIs 文库的方法来富集基因组高甲基化 CGIs 势必使其难于投入实际应用,因此,必须要找到一种简捷和快速富集基因组高甲基化 CGIs 的方法。基于甲基化酶敏感限制酶 (methylation-sensitive restriction enzymes MS-RE) 酶切和连接子 PCR (linker-PCR, L-PCR) 技术的差式甲基化杂交 (differential methylation hybridization, DMH) 正是符合此要求的新型技术<sup>[6]</sup>。DMH 可选择性扩增和双色荧光标记肿瘤细胞和正常细胞的甲基化 CGIs 根据其混合物与 CGIs 微阵列杂交荧光信号的变化而获得肿瘤细胞 CGIs 甲基化谱 (methylated CpG island profiles)。目前,该技术已成功地应用于 CGIs 微阵列,从基因组水平上研究了乳腺癌和卵巢癌等多种肿瘤的 DNA 甲基化状态和模式的改变。

### 1.3 基于表达 CGIs 序列标签的 CGIs 微阵列

DNA 甲基化之所以备受重视是因为 DNA 甲基化可导致相关基因的表现遗传学沉默。最近的研究结果表明, DNA 甲基化是否导致相关基因的沉默仅仅与该基因 CGIs 的特定区域或特定 CpG 位点是否高甲基化相关,因此,如果某个基因的 CGIs 存在高甲基化现象并不能说明或确保该甲基化一定能导致该基因的沉默,即 DNA 甲基化并不能总是导致相关基因的表现遗传学沉默<sup>[9,10]</sup>。基于此机制,在前面所提到的 CGIs 微阵列单纯地用于检测某种疾病状态下的 DNA 甲基化状态和模式就存在一定的局限性,即它所检测到的在该疾病状态下高甲基化的基因可能并不存在基因沉默现象。当然,也可将 CGIs 微阵列与 dDNA 微阵列联用,通过对比分析二者的结果即可了解某个基因的高甲基化是否会导致它的基因沉默<sup>[11]</sup>。但是,这种方法的不足之处在于,由于这两种微阵列文库来源不一致,一方面, CGIs 微阵列来源于基因组水平的 CGIs 文库,它所检测到的高甲基化基因可能是一种低丰度表达基因,另一方面, dDNA 微阵列则难于检测到上述低丰度表达基因,因此,这种矛盾势必可能导致 DNA 甲基化与基因沉默之间的错误相关性分析。可见,如果要采用微阵列技术分析 DNA 甲基化是否与基因表达或沉默相

关,二者文库来源一致的前提下才能使这种相关性分析更为严谨和科学。基于此理论,通过筛选已有的 CGIs 文库,研究者们筛选到一类位于基因外显子区 (主要是第一外显子) 的 CGIs 这些克隆序列被称之为表达 CGIs 序列标签 (expressed CpG island sequence tags ECISTs), 利用这些文库克隆制备的 CGIs 微阵列则被称之为 ECISTs 微阵列<sup>[12,13]</sup>。它是一类可平行分析 DNA 甲基化及相应基因表达水平的新型微阵列: ECISTs 来源于 CGIs 文库的特性使其可将 DMH 技术用于基因组高甲基化 CGIs 分析; ECISTs 位于基因外显子区的特性使其可将 RT-PCR 技术用于相关基因表达分析。这种平行分析大大提高了 DNA 甲基化状态和分布的实际应用价值,从而搭建了遗传学和表观遗传学关联分析的桥梁。除了对 DNA 甲基化和相关基因表达水平进行同时监测以外, ECISTs 微阵列还可用于 DNA 甲基化、基因表达水平和组蛋白乙酰化水平三联平行监测,即三联微阵列 (triple microarrays)<sup>[13]</sup>。

## 2 寡聚核苷探针微阵列

用于 DNA 甲基化分析的寡聚核苷探针微阵列是将基因组重亚硫酸盐处理技术和传统的寡聚核苷探针微阵列结合在一起的新型技术 (图 1)。寡聚核苷探针微阵列的探针序列有两种 (图 1): 一种是单纯的 CpG 二核苷酸 (CpG dinucleotides, 基因序列中 5'→3' 方向紧随相连的 CG 碱基,即 5'-CG-3') 富含序列,它用于检测甲基化 DNA; 另一种则是 CpG 位点由 TpG 或 CpA 所替代,其余碱基均与前者相同,它用于检测非甲基化 DNA<sup>[14~16]</sup>。目前,根据 DNA 甲基化寡聚核苷探针微阵列的应用对象可将其分为两类,第一类是分析特定基因指定区域 CpG 二核苷酸位点的甲基化状态,第二类则是针对基因组水平多个基因 CpG 二核苷酸位点的甲基化水平。

### 2.1 靶向特定基因指定区域的微阵列

此类微阵列又被称之为甲基化特异性寡聚核苷 (methylation-specific oligonucleotide, MSO) 微阵列<sup>[14]</sup>。它是根据某个基因 CGIs 序列特征设计可覆盖各个 CpG 位点的多条寡聚核苷探针片段,即 MSO 而制备成微阵列。MSO 的设计是其成败的关键,大小一般为 19~23 nt 应至少覆盖 2 个或多个 CpG 位点。基因组经重亚硫酸盐修饰、链特异性引物扩增和荧光标记扩增产物后与 MSO 微阵列杂交,即可获得某个 CpG 位点的甲基化状态和分布<sup>[14,15]</sup>。

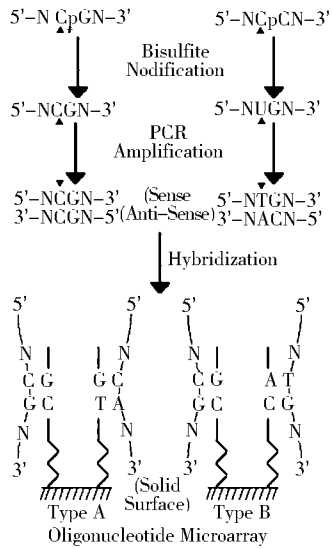


图 1 寡聚核苷探针微阵列的 DNA 甲基化分析原理示意图

Fig 1 Schematic illustration of oligonucleotide microarrays specific for DNA methylation analysis

重亚硫酸盐修饰过程中, CpG 位点的甲基化胞嘧啶 (5-methyl cytosine, <sup>5m</sup>C) 在修饰前后保持不变, 而未甲基化胞嘧啶在修饰后则转变为尿嘧啶, 后者在 PCR 扩增过程中又被转变为胸腺嘧啶。将此 PCR 扩增产物与 A 型或 B 型寡聚核苷探针微阵列杂交, 可检测基因组 CpG 位点的胞嘧啶是否为甲基化胞嘧啶: A 型微阵列寡核苷探针的 CpG 和 TpG 序列分别用于检测基因组 CpG 位点中的甲基化和非甲基化胞嘧啶, 探针的互补链为 PCR 扩增产物的反义链 (anti sense strands); B 型微阵列则分别为 CpG 和 CpA 序列, 其探针互补链为 PCR 扩增产物的正链 (sense strands)。<sup>5m</sup>C: 甲基化胞嘧啶; N: A、T、C 或 G 碱基

2.2 靶向基因组水平的微阵列

MSO 设计只是针对某个特定基因, 因此, 在实际应用上有一定的局限性。Adorjan 等<sup>[16]</sup>通过优化寡聚核苷探针的序列组成, 研制出可同时检测多个基因 CpG 位点甲基化状态的新型微阵列。该微阵列采用的寡聚核苷探针序列组成为 N<sub>2-16</sub>CGN<sub>2-16</sub> 和 N<sub>2-16</sub>TGN<sub>2-16</sub> (N 代表 A、T、C 或 G 碱基), 其中, 前者用于检测甲基化 DNA, 后者则用于检测非甲基化 DNA。该技术的整个过程类似于 MSO 微阵列, 但其优势在于可用于多种基因的批量检测, 并有利于发现与某种疾病表观遗传学异常机制相关的新基因。

3 甲基化靶向阵列

甲基化靶向阵列 (methylation target array, MTA) 是

一类将限制酶酶切技术与组织微阵列 (tissue microarrays) 相结合, 用于批量检测多种或多个组织样品中某个特定基因甲基化状态与分布的 DNA 甲基化微阵列技术<sup>[17]</sup>。MTA 的应用原理是联用 MS-RE 和 L-PCR 特异性扩增多个样品的高甲基化 CGIs 并将此扩增产物制备成 MTA, 它与特定基因 CGIs 之 PCR 扩增产物的阳性杂交点即说明此基因 CGIs 在它所对应的样品中存在高甲基化现象。

4 展望

人类表观基因组计划 (Human Epigenetic Project HEP) 已于 2003 年启动<sup>[12, 18]</sup>。以 DNA 甲基化为代表的肿瘤表观遗传学也愈来愈受到生命科学工作者的重视。我国以陆祖宏教授为代表的研究团体已经开始了 DNA 甲基化微阵列的研制、开发和应用研究<sup>[16]</sup>。DNA 甲基化微阵列作为表观遗传学高通量分析手段具有广阔的发展和应用前景。它为疾病 (如肿瘤) 的表观遗传学异常机制及表观遗传学标志物的探寻和发现提供了高效的技术平台, 势必成为现代生物芯片研究和市场领域不可分割的一部分。

参考文献

[1] Jones P A, Laird P W. Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet. 1999, 21(2): 163~167

[2] 黄庆, 郭颖, 府伟灵. 人类表观基因组计划. 生命的化学, 2004, 24(2): 101~103

Huang Q, Guo Y, Fu W L. Chemistry of Life, 2004, 24(2): 101~103

[3] Fraga M F, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. Biotechniques. 2002, 33(3): 632~634, 636, 649

[4] Geisler J P, Manahan K J, Geisler H E. Evaluation of DNA methylation in the human genome: why examine it and what method to use. Eur J Gynaecol Oncol. 2004, 25(1): 19~24

[5] Cross S H, Charlton J A, Nan X, et al. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. Nat Genet. 1994, 6(3): 236~244

[6] Yan P S, Wei S H, Huang T H. Differential methylation hybridization using CpG island arrays. Methods Mol Biol. 2002, 200: 87~100

[7] Huang T H, Perry M R, Laux D E. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. Hum Mol Genet. 1999, 8(3): 459~470

[8] Yan P S, Perry M R, Laux D E, et al. CpG island arrays: an

- application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6(4): 1432~1438
- [9] Deng G, Chen A, Hong J, et al. Methylation of CpG in a small region of the hMHL1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999, 59(9): 2029~2033
- [10] Chen C, Yang M C, Yang T P. Evidence that silencing of the HPTT promoter by DNA methylation is mediated by critical CpG sites. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 320~328
- [11] Pompei C, Hodge D R, Plass C, et al. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2004, 64(10): 3465~3473
- [12] Shi H, Yan P S, Chen C M, et al. Expressed CpG island sequence tag microarray for dual screening of DNA hypomethylation and gene silencing in cancer cells. *Cancer Res* 2002, 62(11): 3214~3220
- [13] Shi H, Wei S H, Leu Y W, et al. Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation. *Cancer Res* 2003, 63(9): 2164~2171
- [14] Ghan R S, Shi H, Chen C M, et al. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 2002, 12(1): 158~164
- [15] Hou P, Ji M, Liu Z, et al. A microarray to analyze methylation patterns of p16 (Ink4a) gene 5'-CpG islands. *Clin Biochem*, 2003, 36(3): 197~202
- [16] Adorjan P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(5): e21
- [17] Chen C M, Chen H L, Hsiao T H, et al. Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes. *Am J Pathol* 2003, 163(1): 37~45
- [18] Bradbury J. Human epigenome project up and running. *PLoS Biol* 2003, 1(3): e82

## DNA Methylation Microarrays

HUANG Qing FU Weiling ZHANG Hua GUO Ying

(Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

**Abstract** DNA methylation microarrays are high-throughput techniques, which could be used to analyze global genomic methylation status and patterns. It has become one of the most critical methodologies for tumor epigenomics. DNA methylation microarrays are powerful to explore and realize the epigenetic mechanisms hidden behind diseases, especially for tumorigenesis, and then helpful to find out invaluable epigenetic biomarkers. So far, DNA methylation microarrays could be grouped into CpG island microarrays and methylation oligonucleotide microarrays. An outline of the mechanisms, characterizations and applications of above DNA methylation microarrays were given, which should be useful and valuable for epigenetic researchers to choose one kind of above DNA methylation microarrays to perform their DNA methylation analysis.

**Key words** DNA methylation Epigenetics DNA microarrays CpG islands Genomic libraries