

利用分子量阵列平台进行特定序列甲基化分析的方法探讨 *

王 理 上官少方 马晓红 张 霆[△]

(首都儿科研究所 北京 100020)

摘要 目的:探讨利用分子量阵列平台进行特定序列甲基化分析的方法。**方法:**通过对不同扩增条件和扩增效率及不同条件处理的质谱分析比较了 MassArray 平台进行甲基化分析的特点。**结果:**本研究通过与重亚硫酸盐测序结果比较证实,MassArray 分子量阵列技术平台能够反映甲基化修饰的真实水平;通过不同条件下 PCR 扩增效率与甲基化分析的结果,发现扩增效率是制约 MassArray 分子量阵列技术平台甲基化分析的关键因素,而产物的放置时间和不同的处理没有明显影响甲基化分析。**结论:**MassArray 甲基化分析平台是高效快速检测甲基化修饰的平台,在使用过程中应该根据实际的实验条件,进行合理的质控。

关键词:MassArray 分子量阵列技术平台;甲基化;重亚硫酸盐测序;扩增效率

中图分类号:Q75,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-618-06

Application of MassArray Platform in Analyzing of Specific Methylation Modification*

WANG Li, SHANGGUAN Shao-fang, MA Xiao-hong, ZHANG Ting

(Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the methods of specific methylation modification by massarray platform. **Methods:** Characters of MassArray platform were analyzed by comparing the test efficiency under different amplify and treatment conditions. **Results:** MassArray platform could detect a real methylation modification of gene by comparing with bisulfite sequencing. By comparing different amplifications, PCR efficiency was a key point for methylation analysis on this platform, while no significant difference was established on standing time and treatments after PCR. **Conclusions:** MassArray platform is a powerful tool for methylation analysis, quality control according to characters of fragment is needed for this platform. Our research provided fundamentals for further methylation studies using MassArray platform.

Key words: MassArray platform; Methylation; Bisulfite sequencing; PCR efficiency

Chinese Library Classification(CLC): R737.9, R445.1, R77 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-618-06

前言

近代生物学的迅猛发展及人类基因组计划(HGP)的初步完成,很多物种的基因组序列得以测定,现代生命科学研究进入后基因组时代,研究者关心的焦点由结构基因组学转向功能基因组学,表观遗传学的概念应运而生^[1,2]。表观遗传修饰是遗传基因和环境表型间的联系桥梁,它扩展了经典遗传密码中所隐藏的信息^[2,3]。

表观遗传修饰随时间和环境的变化而动态变化,由于这种修饰具有可逆性,目前大量复杂疾病的治疗和病因学研究领域都开始了相关的表观修饰变化的探索^[4-9]。DNA 甲基化(DNA methylation)是最早发现的表观遗传学现象,它是指在 DNA 甲基转移酶的作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将

甲基转移到 DNA 分子中的碱基上。常见的 DNA 甲基化发生在 DNA 链胞嘧啶第 5 位碳原子上,生成 5-甲基胞嘧啶(5mC)。在哺乳动物和其它脊椎动物中,甲基化主要存在于对称的二核苷酸 CpG^[10]。DNA 甲基化对于哺乳动物正常的胚胎发育是必需的,在基因表达的调节、X 染色体的失活、基因印记、染色质的修饰等方面发挥着重要的作用^[11]。

DNA 甲基化研究主要分为基因组整体甲基化研究和功能序列甲基化修饰研究。美国西格诺公司(Sequenom Inc)开发的 MassArray 分子量阵列技术平台是近年来使用较多的全新的研究特定基因功能序列甲基化程度的工具^[12]。其基本原理为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术,采用精确的质谱检测技术测定样品分子量:经过重亚硫酸盐处理,DNA 中未甲基化胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U),而甲基化修饰的

* 基金项目:科技部 973 项目(2007CB511901),国家自然科学基金(81000249/H0417),

北京市卫生局青年科学研究资助项目基金(2010-2012)

作者简介:王理,女,助理研究员,理学博士,研究方向:表观遗传学,电话:01085868400, E-mail:lily_wang@yeah.net

共同第一作者:上官少方

[△]通讯作者:张霆,男,研究员,医学硕士,研究方向:营养与发育,

电话:01085868400, E-mail: zhangtingcv@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-12-02 接受日期:2010-12-23)

胞嘧啶不受影响,从而导入甲基化特异的序列变化,经 T7 DNA 聚合酶的体外转录,再经过碱基特异性酶切处理,得到 RNA 小片段,通过飞行质谱检测每个片段的分子量,由 EpiTYPER 程序完成数据的自动化处理并报告每个检测片段的甲基化程度。

MassArray 分子量阵列技术平台是基于重亚硫酸盐处理后 PCR 扩增的分析方法,经过亚硫酸盐修饰后的 DNA 序列呈单链状态,具有脆性高、模板数低、错配严重等这些基本特点,扩增的稳定性和保真性是在进行甲基化分析时需要考虑的因素。本文利用 MassArray 平台,通过对不同扩增条件和扩增效率及不同条件处理的质谱分析比较了此平台进行甲基化分析的特点,为更好地利用 MassArray 平台进行甲基化研究提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 研究对象均来自本院,在严格无菌操作情况下,抽取空腹静脉血 8ml,EDTA 抗凝,4 小时内分离血浆及外周血单个核细胞(PBMC),-80℃冰箱保存备用。

1.1.2 主要试剂 Tris- 饱和酚(北京鼎国生物技术有限公司);琼脂糖(Promega 公司);蛋白酶 K(Amresco 公司);RNA 酶 A(Sigma 公司);淋巴细胞分离液(北京欣惠泽澳生物技术有限公司);EZ-96 DNA MethylationTM Kit(D5003),EpiTYPER T Reagent Set(11377)。

1.1.3 主要仪器 MassArray Platform(SEQUENOM),冷冻离心机(BECKMAN),PCR 仪(BioRad),多用凝胶图像成像分析系统(BioRad)、DYCZ-22B 型电泳槽及 DYY-6C 型电泳仪电源(北京六一仪器厂),Nanodrop 1000 分光光度计(Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 将 PBMC 转入 2mlEP 管内,加入 1mL 细胞核裂解液,吹打混匀;加入蛋白酶 K(30 mg/ml)30uL,混匀,37℃水浴过夜;每管加入 RNA 酶 A(10 mg/ml)15uL,混匀,37℃水浴孵育 1 小时;加入等体积 Tris- 饱和酚抽提 1 次,酚/氯仿抽提 2 次,氯仿/异戊醇抽提 1 次取上清,加入 2-2.5 倍体积冰冷的无水乙醇沉淀 DNA,70%冰冷乙醇洗涤 2 次,超净台

风干,用适量 TE 溶解;琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量;分光光度计测定 DNA 浓度,OD260/280=1.8~1.9。

1.2.2 重亚硫酸盐处理 按照试剂盒说明进行,稀释好的 DNA 样品(300-500ng)重亚硫酸钠处理后,去盐,90%酒精洗涤,洗脱,约 300ng 基因组 DNA 最后加 40uL 水溶解,置于 -20℃保存。

1.2.3 引物设计合成 利用在线设计软件 <http://epidesigner.com/> 分别针对 TPD52L3(BC017589)和 LINE-1(X58075)启动子区设计引物,由上海生工合成。引物序列分别为:TPD52L3-405:5'-aggaagagagGTTGGTGTGGTGGAAAATAGTTGTT-3' 和 5'-cagtaat acgactcactataggagaagg ctAAATCTAAACCTACAACTC-A AACTCTT-3',包含 5 个 CpG 单元;TPD52L3-329:5'-agg-a agagagGGTTTAGATTTTTGGTAGGTGGAGT-3' 和 5'-cagta-atagcactcactataggagaaggctCATATCAAAAAAATTCCTCTCTTT-3',包含 4 个 CpG 单元;LINE-1:5'-aggaagagagGTGTGAG-GTGTTAGTGTGTTTTGTT-3' 和 5'-cagtaatagcactcactataggga-gaaggctATATCCCACACCTAACTCAAAAAAT-3'。

1.2.4 PCR 扩增及处理 按照试剂盒说明进行扩增:5uL 体系包含 0.5uL 缓冲液,0.04uLPCR 扩增酶,200 μ M dNTP,200 nM 引物和 1uL 模板;扩增程序为:94℃2min,94℃30s,Tm℃30s,72℃60s,共 45 个循环,最后于 72℃延伸 5min。取 1uL 进行电泳鉴定。之后按照说明书要求进行 SAP 处理和转录及酶切反应。芯片点样及质谱分析分别在 RS1000 和 MAIDI-TOF 上进行。

1.2.5 数据分析 利用 SPSS10.1 进行成对 t 检验,显著性水平定为 0.05。

2 结果

2.1 扩增效率与甲基化分析

本实验针对目的片段分别设计了 405bp 和 329bp 左右长度的序列的引物,发现片段长度小于 350bp 的片段对于单拷贝基因的扩增效率较高,扩增效果相对稳定。如图 1 所示,在进行大批量扩增时,样本质量对于扩增效果影响较大,大于 400bp 的片段扩增的均一性不能保证。一般 300bp 及以下长度的片段,扩增时对样本的依赖性较小,重亚硫酸盐扩增效果稳定,重复性好(图 1 下)。

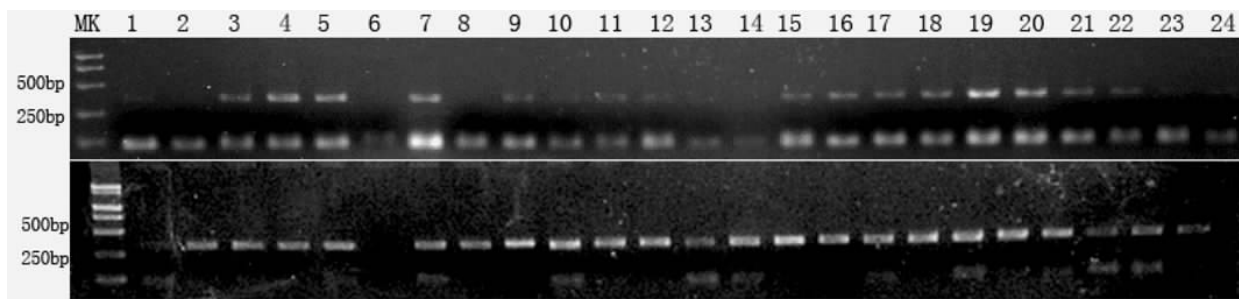


图 1 同一样本同一基因不同长度片段的扩增效果:上图扩增片段为 409bp,下图扩增片段为 329bp
FIG 1 Amplicons with different lengths from same region in gene of one sample:upper: 409bp, lower:329bp

退火温度也是影响扩增效率的因素,而扩增效率的高低可能影响重亚硫酸盐的选择性扩增。我们选择 53℃和 56℃作为退火温度,比较了 5 个样本在不同扩增条件下产物的甲基化程

度。如表 1 所示,除没有检测到全部甲基化位点的样本,不同退火温度其扩增产物的甲基化水平差异不大,成对 t 检验分析没有观察到显著差异($p>0.05$)。

表 1 不同退火温度扩增后甲基化水平分析
Table 1 analysis methylation levels with different anneal temperature

Sample No.(n)	Methylation level					p-value
	Unit1	Unit2	Unit3	Unit4	aver	
1	0.51	0.71	0.61	0.76	0.65	0.071
1'	0.45	0.7	0.47	0.67	0.57	
2	0.46	0.64	0.61	0.74	0.61	0.638
2'	0.45	0.65	0.61	0.73	0.61	
3	NA	NA	0.24	0.46	0.35	0.083
3'	0.5	0.66	0.67	0.79	0.73	
4	NA	NA	0.17	0.46	0.32	0.080
4'	0.48	0.72	0.57	0.77	0.67	
5	0.42	0.63	0.61	0.72	0.60	0.423
5'	0.43	0.66	0.63	0.7	0.61	

n:Tm=56℃, n':Tm=53℃ NA: no data

根据文献报道,较高的退火温度有利于保持真实的甲基化水平,我们选用 56 度为退火温度对多个样本进行了扩增分析^[13]。由于样本质量的差异,扩增条带亮度不均一(图 2)。选择不同扩增条带处理后进行甲基化分析。结果显示,不同扩增效率的产物对甲基化水平影响较大,扩增效率越低,所分析得到的甲基化水平越低,2 号和 3 号产物亮度最高,相应的甲基化水平

也较高(表 2)。这之前研究报道的结果一致,重亚硫酸盐处理后,非甲基化片断的扩增效率高于相同 DNA 序列的甲基化的片断^[13]。而这种扩增效率引起的甲基化差异并不是对所有的位点都有影响,如表 2 所示,位点 4 和 5 的甲基化水平在样本间差异很小,而前 3 个位点的甲基化程度变化较大。扩增过程的引物二聚体的非特异条带也影响甲基化分析结果。

图 2 不同样本同一条件扩增结果(扩增片段长度为 409bp)
Fig.2 amplicons from samples in same conditions(length of product:409bp)

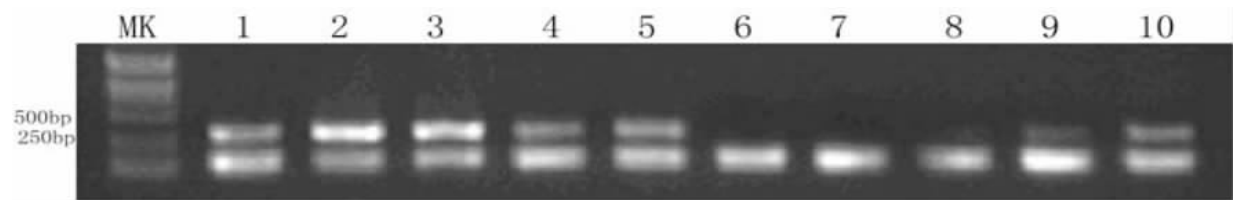


表 2 不同扩增效率的产物甲基化比较
Table 2 Methylation level comparison with PCR efficiency

Sample	Methylation Level					Aver
	Unit1	Unit2	Unit3	Unit4	Unit	
1	0.41	0.5	0.41	0.92	0.96	0.64
2	0.62	0.8	0.62	0.93	0.95	0.784
3	0.56	0.68	0.56	0.94	0.95	0.738
4	0.39	0.5	0.39	0.9	NA	0.545
5	0.47	0.51	0.47	0.92	0.96	0.666
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	0.44	0.59	0.4	0.89	0.93	0.658

2.2 质谱分值与甲基化程度

MassArray 平台的甲基化分析是通过 EpiTYPER 软件实现的。对不同样本的甲基化结果分析发现,不同分值一定程度上反映了扩增效率对甲基化数据的影响。选择 6 个样本,分别挑选不同扩增效果的产物,进行甲基化分析。如表 3 所示,score≥ 4.5,所有预测可得的位点都得到了相应的甲基化数值,所得到的甲基化程度各样本间比较均一。而当 score≤ 3.0 时,就会有

一些位点的甲基化数值缺失。分析可能与这些片断的丰度相关,丰度较高的片断对扩增效率的要求相对较低,而丰度较低的片断则需要较高的扩增效率以获得较高的浓度。而且,score≥ 4.0 的样本所测得的甲基化程度比较高,分值低甲基化程度相应较低,再次验证未甲基化的片段更容易扩增。质谱得分是扩增产物质量的一个体现。

表 3 相同样本不同分值的甲基化水平比较(每个样本重复 3 次)
Table 3 Methylation comparison in same sample with different scores (Triple for one sample)

Sample	methylation level						score
	Unit1	Unit 2	Unit 3	Unit 4	Unit 5	Aver.	
1-1	0.41	0.5	0.41	0.92	0.96	0.64	4.6
1-2	0.48	0.67	0.48	0.94	0.97	0.71	4.3
1-3	0.08	0.54	0.08	0.71	NA	0.35	1.5
2-1	0.71	0.80	0.71	0.94	0.94	0.82	4.6
2-2	0.62	0.80	0.62	0.93	0.95	0.78	3.8
2-3	0.10	0.44	0.10	0.70	1.00	0.47	2.4
3-1	0.56	0.68	0.56	0.94	0.95	0.74	4.5
3-2	0.30	0.31	0.30	0.86	0.98	0.55	3.6
3-3	0.24	0.41	0.24	0.90	0.98	0.55	3.4
4-1	0.64	0.74	0.64	0.94	0.95	0.78	4.8
4-2	0.10	0.32	0.10	1.00	NA	0.38	1.6
5-1	0.59	0.74	0.59	0.95	0.96	0.77	4.7
5-2	0.39	0.39	0.39	0.89	0.99	0.61	4.4
5-3	0.39	0.50	0.39	0.90	NA	0.55	2.9
6-1	0.40	0.50	0.40	0.90	0.98	0.64	4.8
6-2	0.47	0.51	0.47	0.92	0.96	0.67	4.4
6-3	0.11	0.40	0.11	0.73	1.00	0.47	1.8

NA: no data

2.3 不同处理时间对甲基化分析的影响

为了分析比较酶切处理后放置时间对特定基因甲基化程度的影响,我们对不同放置时间后样本的甲基化水平进行了分析。SAP 处理之后,样本一部分直接酶切进行质谱分析,剩余的样本 -20℃保存 1 个月后再次进行酶切处理和质谱分析。结果

显示,放置时间没有明显影响片断的甲基化程度(表 4),同一样本放置之后重新酶切检测,各样本甲基化水平平均无显著性差异(p≥ 0.1)。在 -20℃保存条件下,转录酶切后的产物可稳定保存 1 个月时间。

表 4 不同处理批次对甲基化分析的影响
Table 4 Effects on methylationlevel by treatments

Sample	Methylation level						p-value
	Unit 1	Unit 2	Unit 3	Unit 4	Unit 5	Aver.	
1	0.47	0.66	0.47	0.94	0.96	0.70	0.295422
1'	0.52	0.63	0.52	0.95	0.97	0.72	
2	0.49	0.59	0.49	0.91	0.95	0.69	0.353057
2'	0.48	0.67	0.48	0.94	0.95	0.70	

3	0.6	0.78	0.6	0.93	0.96	0.77	0.771715
3'	0.62	0.73	0.62	0.93	0.95	0.77	
4	0.44	0.53	0.44	0.92	0.98	0.66	0.185622
4'	0.46	0.61	0.46	0.93	0.97	0.69	
5	0.4	0.53	0.4	0.92	0.96	0.64	0.454294
5'	0.45	0.49	0.45	0.92	0.97	0.65	
6	0.14	0.31	0.14	0.72	1	0.46	0.380939
6'	0.15	0.29	0.15	0.87	1	0.49	
7	0.22	0.51	0.22	0.78	1	0.55	0.441348
7'	0.23	0.4	0.23	0.81	0.95	0.52	
8	0.65	0.73	0.65	0.95	0.98	0.79	0.141927
8'	0.64	0.7	0.64	0.95	0.98	0.78	
9	0.56	0.62	0.56	0.92	0.99	0.73	0.54147
9'	0.57	0.64	0.57	0.91	0.98	0.73	
10	0.63	0.72	0.63	0.93	0.97	0.78	0.59132
10'	0.62	0.76	0.62	0.95	0.96	0.78	

n: first results;n':second results

2.4 与重亚硫酸盐测序比较

为了确认 MASSARRAY 甲基化分析平台对甲基化分析的真实性。我们进行了重亚硫酸盐测序分析比较。考虑到扩增效率对甲基化水平可能的影响,我们选择了重亚硫酸盐扩增效率

较高的重复序列 LINE-1 作为分析片断,分析比较了 10 个样本中测序方法和 MassArray 分析结果的一致性。如表 5 示,保证扩增效率的情况下,甲基化分析结果两种方法一致性较高,没有显著性差异(P=0.875)。

表 5 MassArray 分析与重亚硫酸盐测序结果比较
Table 5 Methylation level comparation using MassArray with bisulfite sequencing

	Methylation level of LINE-1(%)									
	N1	N 2	N 3	N4	N 5	N 6	N 7	N 8	N9	N10
Mass-array	60.50	59.25	59.00	57.63	50.38	57.75	46.13	58.50	47.14	58.38
Sequencing	57.29	59.06	63.10	55.00	43.75	53.57	46.67	63.19	55.56	54.69
P-value(95%CI)	0.857(-3.11-3.66)									

3 讨论

DNA 甲基化修饰的异常会引起基因表达异常,染色体结构变化和基因组不稳定性增加等许多改变,最终引起疾病表型。针对不同疾病的特点进行相应的 DNA 甲基化的研究对于了解疾病的病因和发病机制,从而有效预防和干预疾病具有重要意义。目前常见的 DNA 甲基化的分析方法包括:甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术;高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC);甲基化特异性 PCR(MSP);变性高效液相层析(dedenaturing HPLC, DHPLC);联合亚硫酸氢钠限制性内切酶分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA);甲基化敏感的单核苷酸引物延伸法(Ms-SNuPE);甲基化敏感的限制性内切酶 PCR(MSRE-PCR);将 M B D 柱层析法与甲基化敏感的限制性内切酶法(MS-RE)联用的 COMPARE-MS;甲基化特异性多重连接酶依赖性探针扩增法(MS-MLPA);以分子杂交为基

础的微阵列技术以及 MassArray 分析平台等^[12,14-19]。这种分析甲基化的方法各有特点,适用于不同的甲基化研究目的中。MassArray 平台是近 3 年国内外应用最为广泛的特定位点甲基化修饰分析的方法,具有高性能(能够分析覆盖长达 600bp 的多个 CpG 位点),高灵敏度(可发现低至 5%甲基化修饰,样本起始量低至 10 ng)和重复性好(CV≤ 5%)的特点,是目前国内外研究特定基因甲基化修饰的常用方法^[12]。由于这一平台是近年新开发的方法,尤其是在甲基化研究方面,相关方法的分析还不多见。本实验利用 MassArray 平台,针对这种甲基化分析方法进行了验证和比较。针对重亚硫酸盐处理后,单拷贝基因丰度降低,PCR 扩增效率降低的特点,本研究比较了不同扩增效率和扩增条件对甲基化分析结果的影响。通过对不同扩增条件和甲基化水平分析发现,PCR 扩增的效率与甲基化分析的精确度直接相关。高效、特异的 PCR 产物是得到真实甲基化水平的必要条件,特异的扩增条带是进行甲基化分析的前提。重亚硫酸盐处理会引起 DNA 的降解,处理之

后的 DNA 以单链形式存在, 未甲基化的 C 转变为 T, PCR 的扩增效率与处理前相比大大降低, 甲基化的序列和未甲基化的序列的扩增效率也有差异, 因此, PCR 扩增的效率可能会制约不同甲基化程度的片断的扩增几率。为了保证所得到的 PCR 产物是甲基化程度的真实反映, 选择高效的扩增条件成为制约甲基化分析精确程度的影响因素。我们的分析发现, 较短的扩增片段可以增加扩增效率, 进一步保证甲基化分析的精准程度。利用 MassArray 平台进行甲基化分析时, 最好通过电泳鉴定来保证 PCR 扩增的效率。同时, 质谱分析的分值也是 PCR 效率的反映, 较高的分值得到的甲基化程度的重复性较好。高质量的 PCR 产物即使处理后放置一定时间也不会影响甲基化检测的准确性。

之前有研究发现不同退火温度对甲基化分析影响较大^[5], 但本研究并没有发现甲基化水平受到退火温度的影响, 只要 PCR 产物质量较高, 不同退火温度没有明显影响甲基化程度。可能是因为我们所选择的退火温度都能够扩增得到特异的 PCR 产物, 能够保证甲基化片断和非甲基化片断都得到有效扩增, 所以不存在对甲基化片断和非甲基化片断的选择性扩增的差异。

通过与重亚硫酸盐测序的比较, 证实了利用 MassArray 分析平台所检测的甲基化修饰能够反映真实的甲基化状态。利用 MassArray 平台分析甲基化程度的关键是保证 PCR 扩增的高效率, 而扩增效率可以通过电泳检测或质谱分值体现。

MassArray 甲基化分析平台是高效快速检测甲基化修饰的平台, 为研究环境与遗传的交互作用提供了良好的技术手段, 在使用过程中我们也应该根据实际的实验条件, 进行合理的质控, 从而保证实验结果的真实性。

参考文献(References)

[1] 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
Huang qing, Guo ying, Fu wei-ling. Human Epigenome Project, HEP [J]. Chemistry of life, 2004,24(2): 101-102

[2] DONG Yu-wei, HOU Jin-hui, ZHU Bi-cai, et al. Concepts related to epigenetics and their advances[J].Journal of biology,2005,22(1): 1-3

[3] Wu CT, Morris JR. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence [J]. Science, 2001,293: 1103-1105

[4] Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis[J]. Dev Cell,2010,19(5):675-86

[5] Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry[J]. Dev Cell, 2010, 19(5):698-711

[6] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development[J]. Science, 2001, 293:1089-1093

[7] Costello JF, Fruhwald MC. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns[J]. Nat Genet, 2000,24(2): 132-138

[8] Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of Tumors in mice by genomic hypomethylation[J]. Science, 2003, 300:489-492

[9] Wang L, Wang F, Guan J, et al. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects [J]. Am J Clin Nutr, 2010,91:1359 1367

[10] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics[J]. Science, 2001,293: 1068-1070

[11] Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification [J]. Curr Opin Genet Dev, 1999,9(2):158-163

[12] Mathias E, Devan C, Dirk van den B. Introduction to EpiTYPER for Quantitative DNA Methylation Analysis Using the MassARRAY System[J]. Product Preview Note, Sequenom, 2006,13: 1-8

[13] Shen LL, Yi Guo, Xinli Chen, et al. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis [J]. BioTechniques, 2007,42(1): 48-58

[14] Xiong LZ, Xu CG, Saghai MA, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. Mol Gen Genet, 1999, 261: 439-446

[15] Simonetta F, Choi SW, Gregory GD, et al. A Method to Assess Genomic DNA Methylation Using High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. Anal. Chem, 2002,74 (17): 4526 4531

[16] Cindy AE, Peter W. Laird Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) Methods in Molecular [J]. Biology, 2002,200: 71-86

[17] Herman JG, Graff JR, My?h?nen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. PNAS, 1996,93 (18):9821-9826

[18] Anders OHN, Ameziane N, Helena MBD, et al. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(14): e128

[19] Srinivasan Y, Lin XH, Michael CH, 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 Research, 2006,34(3):19-25