



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108796039 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 08

(21) 申请号 201810697732.9

(22) 申请日 2018.06.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108796039 A

(43) 申请公布日 2018.11.13

(73) 专利权人 上海交通大学  
地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72) 发明人 康亚妮 赵小东 邵志峰 毛湛睿  
金戈旋

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

代理人 郑立

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6806 (2018.01)

(56) 对比文件

WO 2017190215 A1, 2017.11.09

CN 107858409 A, 2018.03.30

CN 107541791 A, 2018.01.05

CN 102533944 A, 2012.07.04

CN 108796057 A, 2018.11.13

CN 109415763 A, 2019.03.01

US 2019144848 A1, 2019.05.16

Liu Y等. Methylation-sensitive enrichment of minor DNA alleles using a double-strand DNA-specific nuclease. 《Nucleic Acids Res》. 2017, 第45卷(第6期),  
Taiwo O 等. Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. 《Nat Protoc》. 2012, 第7卷(第4期),

审查员 王小玉

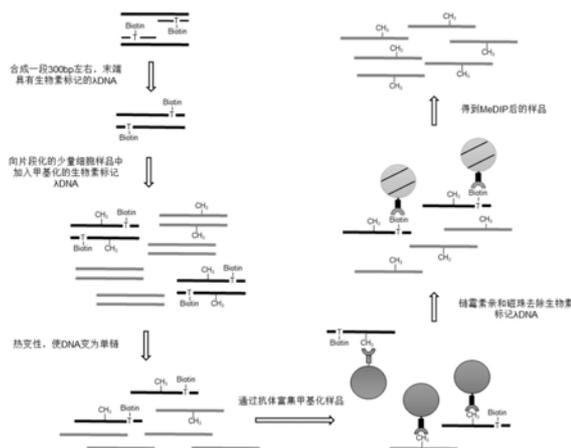
权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种用于DNA甲基化检测的试剂盒与方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于DNA甲基化检测的试剂盒,其至少包括生物素标记的甲基化的λ-DNA和链霉素包被的磁珠。还公开了该试剂盒在少量DNA样品甲基化检测中的应用,样品量可低至1ng。本发明还公开了一种DNA甲基化检测的方法及其应用。本发明提供的技术方案显著降低了DNA甲基化检测所需的最低起始样品量,且不需要特定的试剂盒和实验设备,节省成本,具有较高的普适性。在富集甲基化DNA的同时不引入外源DNA污染,若采取文库构建和高通量测序的检测方法时不会受到外源DNA信息的影响,有利于进一步降低测序成本,提高数据质量。



1. 一种DNA甲基化检测的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:  
步骤1、制备生物素标记的 $\lambda$ -DNA;  
步骤2、将部分步骤1中制备得到的所述生物素标记的 $\lambda$ -DNA进行甲基化处理;  
步骤3、将生物素标记的未甲基化的 $\lambda$ -DNA和生物素标记的甲基化的 $\lambda$ -DNA按比例加入到片段化的DNA样品中,进行甲基化DNA的富集处理;  
步骤4、用链霉素包被的磁珠除去生物素标记的 $\lambda$ -DNA,纯化得到甲基化的DNA样品;  
步骤5、对所述甲基化的DNA样品进行甲基化水平检测。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤1中,通过PCR扩增制备生物素标记的 $\lambda$ -DNA,上游引物为:ACAACCGAAGAATGCGACAC,下游引物为:TCCTGAGACAATACAGCAGAC,扩增得到的片段长度为300bp。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤3中,所述生物素标记的未甲基化的 $\lambda$ -DNA和所述生物素标记的甲基化的 $\lambda$ -DNA的质量比为2:1。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤3中,所述甲基化DNA的富集处理采用甲基化免疫共沉淀、甲基化DNA亲和捕获或甲基化DNA结合域方法进行。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤3中,所述甲基化DNA的富集处理采用甲基化免疫共沉淀方法进行。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤5中,所述甲基化水平检测采用PCR、qPCR或高通量测序方法进行。
7. 根据权利要求1-6中任何一项所述的方法在少量DNA样品甲基化检测中的应用,其特征在于,所述少量DNA样品的样品量低至1ng。

## 一种用于DNA甲基化检测的试剂盒与方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体涉及DNA甲基化检测领域,更具体地,涉及一种用于DNA甲基化检测的试剂盒与方法及应用。

### 背景技术

[0002] DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰,主要发生在DNA的CpG岛,参与基因表达调控、基因印记、转座子沉默、X染色体失活以及癌症发生等重要生物学过程。对DNA甲基化的检测广泛应用于干细胞研究、疾病诊断治疗等多个领域。DNA甲基化检测方法按原理主要可分为三类:重亚硫酸盐转化、甲基化敏感的限制性酶切法、抗体富集甲基化位点法。传统的DNA甲基化检测方法需要微克级别的起始样品量,但是随着稀有细胞群体(如胚胎细胞)、液体活检(包括循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA)、细胞间异质性等逐渐成为研究的热点,开发并完善对少量样品进行DNA甲基化检测的技术变得尤为重要。目前现有的研究少量样品甲基化的方法主要有以下几种。

[0003] 一种方法是少量样品的全基因组重亚硫酸氢盐测序法(WGBS)(Wang et al., Nat Protoc, 2013),利用带有单个甲基化接头的Tn5转座子将DNA片段化,之后通过退火添加第二个甲基化的接头,同时修复缺口,使链的5'和3'端都有接头。之后通过重亚硫酸氢盐处理,将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶,PCR扩增后转变为胸腺嘧啶,测序后与未经处理的序列比较,判断CpG位点是否发生甲基化。该方法将样品DNA需求量降低至20ng。缺点是对整个基因组进行检测,测序成本高昂,只适合对少量样品进行分析。

[0004] 另一种方法使用对甲基化敏感的限制性内切酶对样品进行处理后再进行重亚硫酸盐转化的方法进行少量样品DNA甲基化研究(Gu et al., Nat. Methods, 2010),即简并代表重亚硫酸盐测序法(RRBS)。使用甲基化敏感限制酶MspI消化掉未甲基化的DNA片段,再补加50ng片段化的去磷酸化大肠杆菌K12基因组DNA补足重亚硫酸盐转化反应体系,能够对30ng的起始DNA样品进行DNA甲基化图谱分析。这种方法相比于WGBS方法降低了成本,但不足之处在于只能对甲基化敏感限制酶识别位点进行检测,而限制酶识别位点是有限的,因此不能用于进行全基因组水平的甲基化研究,且补加外源DNA易对测序结果产生影响。

[0005] 还有一种方法,是利用甲基化DNA免疫共沉淀技术(MeDIP)对少量样品进行DNA甲基化检测(Taiwo O et al., Nat Protoc, 2012),通过补加 $\lambda$ DNA后利用Diagenode Auto-MeDIP试剂盒以及SX-8G IP-Star全自动样品处理系统对50ng的DNA样品进行了MeDIP甲基化分析。这种方法可以对少量样品全基因组的甲基化水平进行检测,但需要利用试剂盒和全自动样品处理系统进行MeDIP实验,成本依然较高,不具有普遍适用性。不除去补加的外源DNA可能对测序结果产生影响。

[0006] 现有三种技术的缺点分别是:1、测序成本高昂,只适合对少量样品进行分析。2、虽然降低了成本,但不能用于进行全基因组水平的甲基化研究,体系中的外源DNA可能对测序结果产生影响。3、能对全基因组的甲基化水平进行检测,但需要利用试剂盒和全自动样品处理系统进行实验,不具有普遍适用性。补加外源DNA易对测序结果产生影响。

[0007] 此外,以上三种DNA甲基化检测技术所需的最低样品起始量为20-50ng DNA,仍不适用于少量来源样品的甲基化分析。

### 发明内容

[0008] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明要解决的技术问题是:1、降低起始样品量,以对更少量来源的样品进行DNA甲基化分析;2、在进行全基因组水平DNA甲基化检测的基础上,不依靠特定的商业化试剂盒和大型实验设备,减少测序规模和降低实验成本。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 本发明在第一方面提供了一种用于DNA甲基化检测的试剂盒,该试剂盒至少包括生物素标记的甲基化的 $\lambda$ -DNA和链霉素包被的磁珠。

[0011] 在一个较优实施例中,上述试剂盒还包括生物素标记的未甲基化的 $\lambda$ -DNA。

[0012] 本发明在第二方面提供了上述试剂盒在少量DNA样品甲基化检测中的应用,少量DNA样品的样品量可低至1ng。

[0013] 本发明在第三方面提供了一种DNA甲基化检测的方法,包括以下步骤:

[0014] 步骤1、制备生物素标记的 $\lambda$ -DNA;

[0015] 步骤2、将部分步骤1中制备得到的生物素标记的 $\lambda$ -DNA进行甲基化处理;

[0016] 步骤3、将生物素标记的未甲基化的 $\lambda$ -DNA和生物素标记的甲基化的 $\lambda$ -DNA按比例加入到片段化的DNA样品中,进行甲基化DNA的富集处理;

[0017] 步骤4、用链霉素包被的磁珠除去生物素标记的 $\lambda$ -DNA,纯化得到甲基化的DNA样品;

[0018] 步骤5、对所述甲基化的DNA样品进行甲基化水平检测。

[0019] 优选地,上述步骤1中,通过PCR扩增制备生物素标记的 $\lambda$ -DNA,上游引物为:

[0020] ACAACCGAAGAATGCGACAC (SEQ No.1),

[0021] 下游引物为:

[0022] TCCTGAGACAATACAGCACGAC (SEQ No.2),

[0023] 扩增得到的片段长度约为300bp。

[0024] 优选地,上述步骤3中,生物素标记的未甲基化的 $\lambda$ -DNA和生物素标记的甲基化的 $\lambda$ -DNA的质量比为2:1。

[0025] 优选地,上述步骤3中,甲基化DNA的富集处理采用甲基化免疫共沉淀、甲基化DNA亲和捕获或甲基化DNA结合域方法进行。

[0026] 更优选地,上述步骤3中,甲基化DNA的富集处理采用甲基化免疫共沉淀方法进行。

[0027] 优选地,上述步骤5中,甲基化水平检测采用PCR、qPCR或高通量测序方法进行。

[0028] 本发明在第四方面提供了上述方法在少量DNA样品甲基化检测中的应用,少量DNA样品的样品量可低至1ng。

[0029] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案在MeDIP技术的基础上,设计并采用了生物素标记的片段,提高了抗原抗体的结合效率并减少了操作中样品的损耗,实现了对少量甲基化DNA的富集和检测,其具有以下显著优点:

[0030] 1、与少量样品WGBS的DNA甲基化检测方法相比,本发明建立在MeDIP技术上,即利用抗原抗体亲和富集甲基化DNA片段后再进行甲基化检测,方法的优点在于只将甲基化的

DNA区域进行富集并检测,测序规模小成本低,精度和性价比高,更加适合大量临床样本之间的比较研究,而且所需的起始样品量降低为1ng DNA,更加适用于少量来源样品的甲基化分析。

[0031] 2、与使用RRBS方法进行少量样品的DNA甲基化检测技术相比,本发明的技术在同样低成本的基础上可以实现对全基因组DNA甲基化的水平进行精确检测。

[0032] 3、与现有使用MeDIP进行少量样品DNA甲基化检测的方法相比,本发明的技术所需最低起始样品量更低,且不需要特定的试剂盒和实验设备,节省成本,具有较高的普适性。富集甲基化DNA的同时不引入外源DNA污染,如果采取文库构建和高通量测序的检测方法时不会受到外源DNA信息的影响,有利于进一步降低测序成本,提高数据质量。

[0033] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。所以凡是不脱离本发明所公开的原理下完成的等效或修改,都落入本发明保护的范围。

[0034] 以下将结合附图对本发明作进一步说明,以充分说明本发明的目的、技术特征和技术效果。

#### 附图说明

[0035] 图1示出了本发明较优实施例的实验流程图;

[0036] 图2示出了本发明较优实施例中基于末端具有生物素修饰的引物PCR扩增得到的300bp Bio- $\lambda$ -DNA的琼脂糖凝胶电泳图;

[0037] 图3示出了本发明较优实施例中生物素标记的 $\lambda$ -DNA的甲基化处理,其中第一泳道是利用甲基化酶进行甲基化处理后的Bio- $\lambda$ -DNA (Me-Biotin- $\lambda$ -DNA),第三泳道是片段化的人慢性髓系白血病细胞K562的基因组DNA样品;

[0038] 图4示出了本发明较优实施例中利用甲基化的biotin- $\lambda$ -DNA进行少量K562基因组DNA样品的MeDIP-qPCR实验后得到的富集倍数图(起始量1ng)。

#### 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0040] 制备生物素标记的 $\lambda$ -DNA

[0041] 1、通过PCR扩增制备生物素修饰、片段长度约为300bp的 $\lambda$ -DNA (Bio- $\lambda$ -DNA),PCR反应体系如下:

|        |                           |             |
|--------|---------------------------|-------------|
| [0042] | $\lambda$ -DNA            | 60ng        |
|        | Taq PCR预混液 (BBI, B639295) | 25 $\mu$ l  |
|        | 上游引物 (SEQ No. 1)          | 0.4 $\mu$ M |
|        | 下游引物 (SEQ No. 2)          | 0.4 $\mu$ M |
|        | 双蒸水                       | 至50 $\mu$ l |

[0043] PCR反应条件:

|        |      |        |         |
|--------|------|--------|---------|
| [0044] | 94°C | 4 min  | 循环数: 1  |
|        | 94°C | 30 s   | 循环数: 33 |
|        | 55°C | 30 s   |         |
|        | 72°C | 20 s   |         |
|        | 72°C | 10 min | 循环数: 1  |
|        | 4°C  | 保持     |         |

[0045] 2、用AxyPrep™ PCR纯化试剂盒 (Axygen, AP-PCR-250G) 对PCR产物进行纯化并用NanoDrop紫外-可见光分光光度计定量。琼脂糖凝胶电泳结果见附图2。

[0046] 3、取500ng PCR产物,用CpG甲基转移酶 (M. SssI, Thermo) 进行体外甲基化处理,反应体系如下:

|        |               |       |
|--------|---------------|-------|
| [0047] | 10×M. SssI缓冲液 | 2ul   |
|        | 50×SAM        | 0.4ul |
|        | Bio-λ-DNA     | 500ng |
|        | M. SssI       | 1ul   |
|        | 双蒸水           | 至20ul |

[0048] 4、混匀后,37°C孵育15min,65°C孵育20min以终止反应。

[0049] 5、用AxyPrep™ PCR纯化试剂盒对PCR产物进行纯化并用NanoDrop定量。琼脂糖凝胶电泳结果见附图3。

[0050] 少量DNA样品的甲基化免疫共沉淀 (MeDIP)

[0051] 这部分操作也可以用甲基化DNA亲和捕获方法 (MethylCap试剂盒, Diagenode) 或甲基化DNA结合域方法 (MBD, Lan X et al., PLoS One, 2011) 替代,以下为MeDIP方法的操作过程:

[0052] 1、取少量片段化的DNA样品,补加50ng甲基化的Bio-λ-DNA和100ng未甲基化的Bio-λ-DNA,在95°C条件下共同孵育10min,之后将样品立即放冰上10min。

[0053] 2、同时,取25ul蛋白A/G磁珠 (Millipore, 16-663),使用IP缓冲液洗两次,再用500ul IP缓冲液重悬。取100ul重悬后的磁珠加入管1并加入变性好的样品,补IP缓冲液至400ul。剩下的400ul (管2) 磁珠加入1.5ug 5mC抗体 (Epigentek, A-1014-010),补IP缓冲液至500ul。4°C, 40rpm,孵育不少于2h。

[0054] IP缓冲液配方如下表所示:

|        |                    |       |        |
|--------|--------------------|-------|--------|
| [0055] | 0.1M磷酸钠缓冲液         | 10mM  | 10mL   |
|        | 2M NaCl溶液          | 140mM | 7mL    |
|        | 10% Triton X-100溶液 | 0.05% | 500uL  |
|        | 双蒸水                |       | 至100mL |

[0056] 3、管2用1ml IP缓冲液洗磁珠两次。管1于磁力架上静置,取10%体积 (40ul) 的上清作为Input,剩余部分转入管2,补IP缓冲液至500ul。4°C, 40rpm,孵育过夜。

[0057] 4、用磁架富集磁珠,弃上清,分别用1ml IP缓冲液洗磁珠6次;加400ul TE缓冲液 (含0.25% SDS) 和5ul蛋白酶K (20mg/ml) 重悬磁珠,55°C, 800rpm,孵育3h。

[0058] 5、用磁架富集磁珠，将上清液转移到新的离心管中，混入未甲基化的Bio- $\lambda$ -DNA 100ng，用酚氯仿进行抽提纯化后，乙醇沉淀DNA，最终溶于10 $\mu$ l 10mM Tris (pH 8.0) 中。

[0059] 除去Bio- $\lambda$ -DNA、纯化体系

[0060] 1、取10 $\mu$ l M-280 Dynabeads™ M-280链霉亲和素 (invitrogen, 11205D) 至PCR管中；加入1mL 1x BW缓冲液 (Binding and Washing Buffer)，涡旋震荡重悬5s；磁架富集磁珠，加入10 $\mu$ l 1x BW缓冲液重悬。

[0061] BW缓冲液 (2x) 配方如下表所示：

|        |                            |      |             |
|--------|----------------------------|------|-------------|
|        | 1M Tris-HCl 溶液<br>(pH 7.5) | 10mM | 150 $\mu$ L |
| [0062] | 0.5M EDTA 溶液               | 1mM  | 30 $\mu$ L  |
|        | 5M NaCl 溶液                 | 2M   | 6mL         |
|        | 双蒸水                        |      | 至 15mL      |

[0063] 2、将MeDIP和Input样品分别加入预洗好的磁珠中，30rpm，室温孵育2h。

[0064] 3、磁架富集磁珠，收集上清，用酚氯仿进行抽提纯化后，乙醇沉淀DNA，最终溶于20 $\mu$ l 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中。

[0065] 甲基化水平检测

[0066] 这部分操作也可以利用先建库后进行二代测序的方法进行，以下为利用qPCR方法对靶位点的甲基化进行分析的操作过程。

[0067] 通过qPCR验证甲基化DNA的富集效率，qPCR反应体系如下：(解链温度95 $^{\circ}$ C，退火延伸温度60 $^{\circ}$ C，反应40个循环)

|        |   |            |
|--------|---|------------|
| [0068] | DNA (Input和MeDIP-DNA各稀释50倍)                     | 8 $\mu$ l  |
|        | 引物 (10 $\mu$ M)                                 | 2 $\mu$ l  |
|        | KAPA SYBR Fast qPCR预混液 (KAPA Biosystem, KK4601) | 10 $\mu$ l |
|        | 总体积   | 20 $\mu$ l |

[0069] 附图4示出了使用本方法对少量K562基因组DNA样品进行MeDIP-qPCR实验后得到的富集倍数图。检测的靶基因出现了5~75倍不等的富集。

[0070] 实施例中用到的qPCR引物序列：

|        |              |                                |
|--------|--------------|--------------------------------|
| [0071] | hg19-上游引物    | SEQ No.3:GCCGTGATCATCTCTGACAA  |
|        | hg19-下游引物    | SEQ No.4:CTCGGCTGAGAAGAAAGAGG  |
|        | WT1-上游引物     | SEQ No.5:AGTCTCCGTACGACCCCAAC  |
|        | WT1-下游引物     | SEQ No.6:AGAGGACAGAGAGGCATGGA  |
|        | BCL2-上游引物    | SEQ No.7:CGGGAAGCAACAACCTCTGAT |
|        | BCL2-下游引物    | SEQ No.8:TGATGTGAGTCTGGGCTGAG  |
|        | MeDIP对照-上游引物 | SEQ No.9:CCTCATCTGGGATGCTGAAT  |
|        | MeDIP对照-下游引物 | SEQ No.10:GGGGAAGCTATGCCATGATA |

[0072] 本申请公开的技术方案除了可以应用于少量样品的DNA甲基化分析，还可以应用于少量样品的ChIP (Chromatin immunoprecipitation) 分析，即将抗原类似物加入到少量

样品的ChIP-DNA中,从而提高ChIP-DNA免疫共沉淀过程的反应效率,具有广泛的应用前景。

[0073] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海交通大学
- [0003] <120> 一种用于DNA甲基化检测的试剂盒与方法及应用
- [0004] <130> 2018
- [0005] <160> 10
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] acaaccgaag aatgcgacac 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 22
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] tcctgagaca atacagcacg ac 22
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] gccgtgatca tctctgacaa 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] ctcggctgag aagaaagagg 20
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 20
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] agtctccgta cgacccaac 20
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 20

- [0039] <212> DNA  
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0041] <400> 6  
[0042] agaggacaga gaggcatgga 20  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 20  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0047] <400> 7  
[0048] cgggaagcaa caactctgat 20  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 20  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0053] <400> 8  
[0054] tgatgtgagt ctgggctgag 20  
[0055] <210> 9  
[0056] <211> 20  
[0057] <212> DNA  
[0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0059] <400> 9  
[0060] cctcatctgg gatgctgaat 20  
[0061] <210> 10  
[0062] <211> 20  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0065] <400> 10  
[0066] ggggaagcta tgccatgata 20

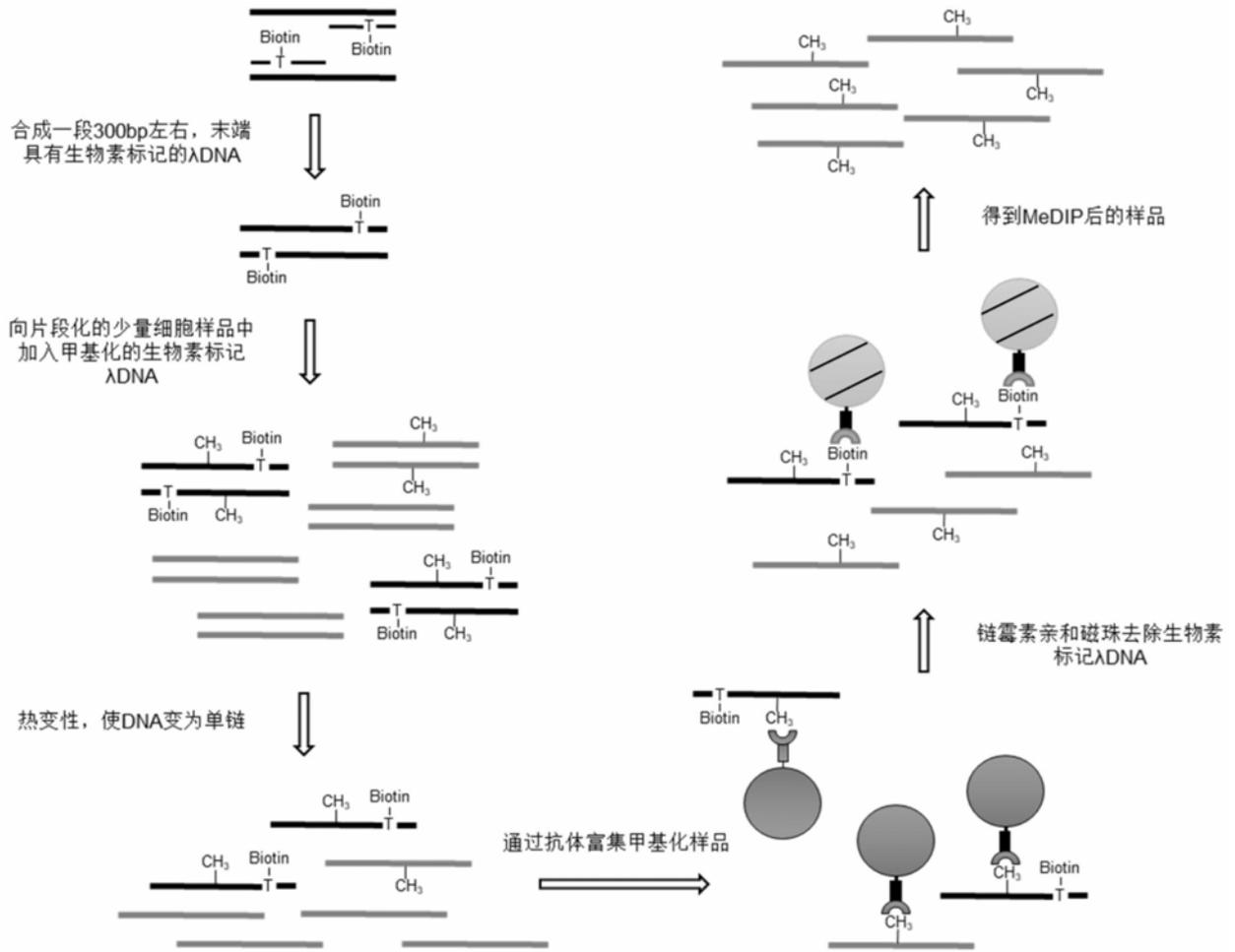


图1

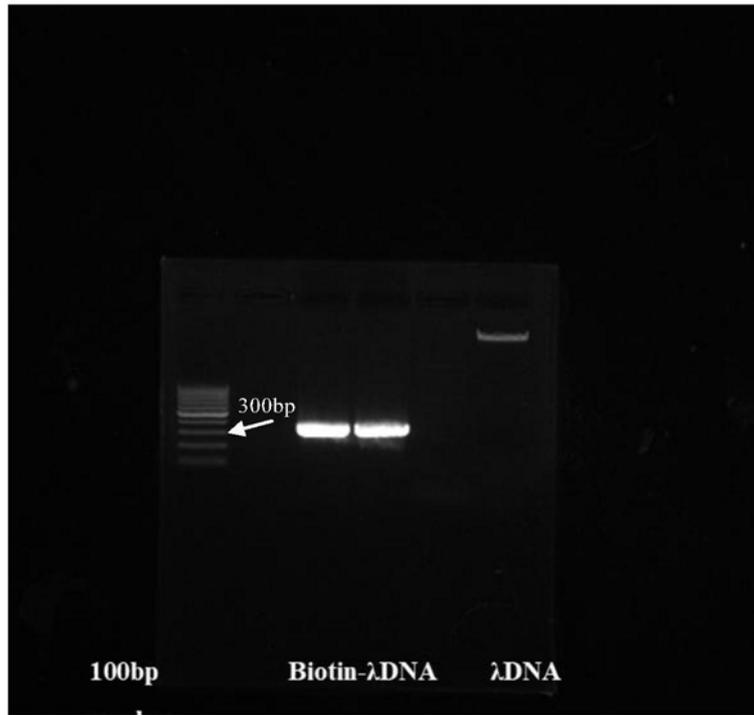


图2

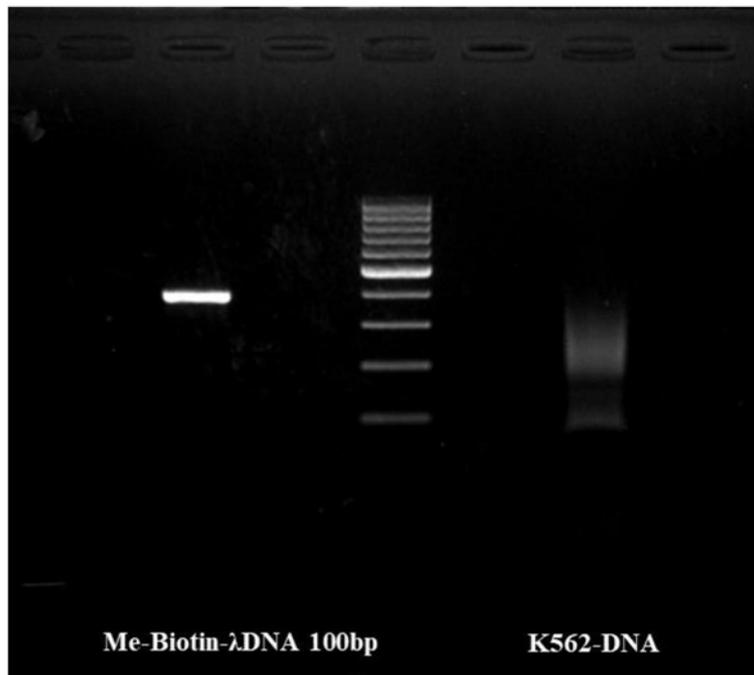


图3

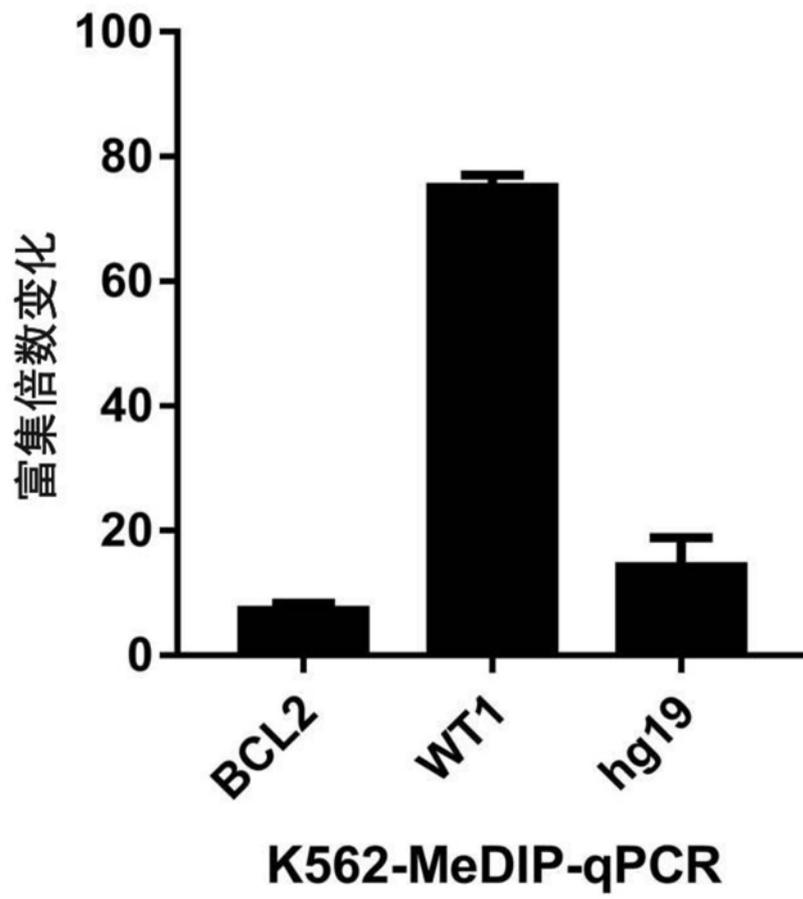


图4