

甲基化入门知识手册（一）

一、甲基化的功能

DNA 甲基化能关闭某些基因的活性，去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达。DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变，从而控制基因表达。

二、甲基化与疾病

甲基化状态的改变是引起肿瘤的一个重要因素,这种变化包括基因组整体甲基化水平降低和 CpG 岛局部甲基化水平的异常升高,从而导致基因组的不稳定(如染色体的不稳定、可移动遗传因子的激活、原癌基因的表达)和抑癌基因的不表达。如果抑癌基因中有活性的等位基因失活,则发生癌症的机率提高,例如:胰岛素样生长因子-2 (IGF-2) 基因印记丢失导致多种肿瘤。

目前肿瘤甲基化的研究主要集中在抑癌基因。这是因为人们发现肿瘤的发生可能与抑癌基因启动子区的 CpG 岛甲基化造成抑癌基因关闭有关。由于 CpG 岛的局部高度甲基化早于细胞的恶性增生,因此甲基化的诊断可以用于肿瘤发生的早期预测,而且全基因组的低甲基化也随着肿瘤发生而出现,并且其随着肿瘤恶性度的增加而显著,因此甲基化的检测可用于肿瘤的分级。

三、甲基化的发生机制

DNA 甲基化主要是通过 DNA 甲基转移酶家族来催化完成的。研究人员在真核生物中发现了 3 类 DNA 甲基转移酶(Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3a、Dnmt3b)。Dnmt1 一种是维持性甲基化酶;Dnmt2 可与 DNA 上特异位点结合,但具体作用尚不清楚;Dnmt3a 和 Dnmt3b 是重新甲基化酶,它们使去甲基化的 CpG 位点重新甲基化,即参与 DNA 的从头甲基化。在哺乳动物的生殖细胞发育时期和植入前胚胎期,其基因组范围内的甲基化模式通过大规模的去甲基化和接下来的再甲基化过程发生重编程,从而产生具有发育潜能的细胞;在细胞分化的过程中,基因的甲基化状态将遗传给后代细胞。

四、甲基化抑制基因转录的机制

①直接抑制

CPG 岛甲基化直接干扰 tf 与调控区 DNA 的结合。例如 camp 反应元件结合蛋白(creb), ap-2, e2f, nfkb 等 tf 不能与相应的 DNA 位点相结合。但有些 tf 如 sp1, ctf 与甲基化和非甲基化位点都能结合,这表明甲基化单独不足以阻止体内 tf 与 DNA 相结合。

②间接机制

近年来发现一些甲基化 DNA 结合蛋白如 mdbp1, mdb2 以及甲基化 CPG 结合蛋白如 mecp1, mecp2 与甲基化 DNA 特异结合,抑制基因转录。其介导转录抑制的程度取决于甲基化密度和启动子的强度。如低密度甲基化可完全抑制一些弱的启动子,但对强的启动子则收效甚微。

③影响染色体结构

DNA 甲基化还可通过影响染色体结构来抑制转录。不仅甲基化启动子区形成的核小体抑制体外起始转录,而且 mecp1 与甲基化启动子 CPG 位点结合后,可引起染色质聚缩成非活性高级结构,以至于转录因子不能与其相结合,从而抑制转录。DNA 甲基化状态并非固定不变。在许多哺乳动物组织内,基因组甲基脱氧胞嘧啶水平随老化而下降,在鲑鱼、小鼠、大鼠、牛与人类的脑、肝脏、大肠粘膜、心脏和脾脏内发现 DNA 脱甲基化作用。相反,大鼠肺则不发生脱甲基化,大鼠肾内甲基脱氧胞苷总含量增加。这说明甲基化状态随老化而变化,

即发生甲基化和脱甲基化，但总的说来，最常见的变化似乎是进行性的脱甲基化。这些变化均可导致随老化而发生的基因表达变化。

五、DNA 甲基化测序方法

1、甲基化特异性的 PCR（Methylation-specificPCR，MSP）

用亚硫酸氢盐处理基因组 DNA，所有未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变；随后设计针对甲基化和非甲基化序列的引物进行 PCR。通过电泳检测 MSP 扩增产物，如果用针对处理后甲基化 DNA 链的引物能得到扩增片段，则说明该位点存在甲基化；反之，说明被检测的位点不存在甲基化。

2、亚硫酸氢盐测序法（Bisulfite sequencingPCR，BSP）

用亚硫酸氢盐处理基因组 DNA，则未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。随后设计 BSP 引物进行 PCR，在扩增过程中尿嘧啶全部转化为胸腺嘧啶，最后对 PCR 产物进行测序就可以判断 CpG 位点是否发生甲基化称为 BSP-直接测序方法。将 PCR 产物克隆至载体后进行测序，可以提高测序成功率，这种方法称为 BSP-克隆测序法。

3、高分辨率熔解曲线法（HighResolutionMelting，HRM）

在非 CpG 岛位置设计一对针对亚硫酸氢盐修饰后的 DNA 双链的引物，这对引物中间的片段包含感兴趣的 CpG 岛。若这些 CpG 岛发生了甲基化，用亚硫酸氢盐处理后，未甲基化的胞嘧啶经 PCR 扩增后转变成胸腺嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变，样品中的 GC 含量发生改变，从而导致熔解温度的变化。

来源：通达生信