

DNA 甲基化检测

Detection of DNA Methylation by Bisulfite-sequencing, Restriction Enzyme Digestion-PCR and Restriction Enzyme Digestion-Southern

陈香嵩, 程赛凤, 周超, 刘潜, 赵毓*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: zhaoyu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 陈香嵩, 程赛凤, 周超, 刘潜, 赵毓. (2018). DNA 甲基化检测检测. *Bio-101* e1010110. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010110.

How to cite: Chen, X. S., Cheng, S. F., Zhou, C., Liu, Q. and Zhao, Y. (2018). Detection of DNA methylation by bisulfite-sequencing, restriction enzyme digestion-PCR and restriction enzyme digestion-Southern. *Bio-101* e1010110. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010110. (in Chinese)

方法一: 重亚硫酸盐测序 (Bisulfite-sequencing)

实验原理: 以重亚硫酸盐处理基因组 DNA, 发生甲基化的胞嘧啶不变, 而未甲基化的胞嘧啶会变成尿嘧啶, 经过 PCR 扩增, 原本的 C/G 就变成 T/A, 可以通过测序区分。

该方法检测精确, 分辨率最高, 但耗时耗力, 通量有限。

实验目的: 一般以下情况可以用此方法: 精细定量检测目标区段的 DNA 甲基化情况; 结合高通量测序检测全基因组 DNA 甲基化情况。

关键词: DNA 甲基化, 高通量测序, 重亚硫酸盐

材料与试剂

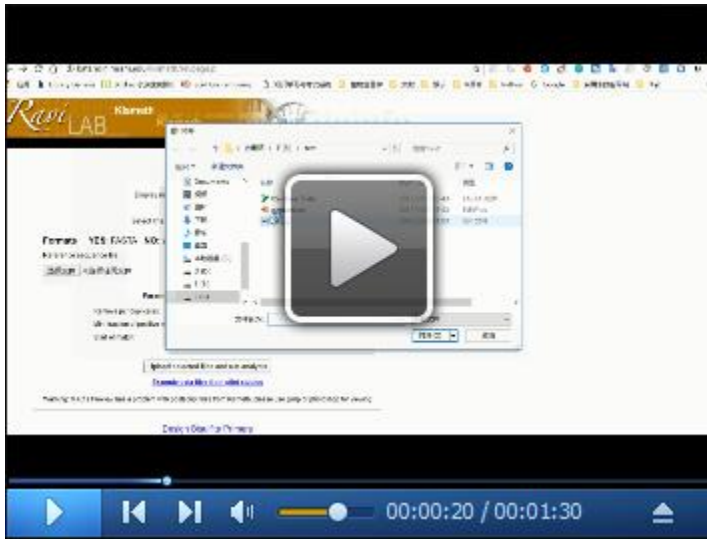
1. PCR 管
2. 各种型号枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
3. 高质量基因组抽提试剂盒, 常用的如 DNeasy plant mini kit
4. 重亚硫酸盐处理试剂盒, 常用的如 EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, catalog number: 59104)

仪器设备

1. PCR 仪
2. 移液器
3. 离心机
4. 水浴锅

实验步骤

1. 高质量 DNA 样品抽提：目前基本都是使用商业化的试剂盒，常用的如 DNeasy plant mini kit，处理方法参照试剂盒说明书。
2. DNA 样品处理：目前基本都是使用商业化的试剂盒，常用的如 EpiTect Bisulfite Kit，处理方法参照试剂盒说明书。
3. 引物设计：针对检测的目标区域设计 PCR 引物，一般有专门的软件可供使用，如 [MethPrimer](#) 等，可参考文献 Li and Dahiya (2002), Tusnady 等(2005)。
4. PCR 扩增和产物克隆：以重亚硫酸盐处理后的 DNA 为模板扩增，回收 PCR 产物后克隆的 T 载体上，挑取 30 个以上的阳性克隆进行测序，保证至少 30 个有效克隆 (即重亚硫酸盐成功转化的 DNA 片段连进载体得到的克隆)。
5. 结果分析：结果分析网站 <http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>，分别建立两个文本文档，一个为目标区段的基因组序列，一个为测序的结果，将序列以 FASTA 格式保存，如图 1 为目标区段的参考序列形式，图 2 为测得的序列形式 (测序结果直接复制到该文件中，不需要任何处理，分析软件会自动去掉不匹配的序列)，分别将这两个文档上载到“Reference sequence file”和“Comparison sequences file”选项中；结果运行完成后，根据需要选择不同的表现形式(视频 1)。



视频 1. 结果输出操作示例

1) 准备工作：核酸比对工具(这里示意为 Bioedit)、所测 DNA 片段的基因组序列 (不包括引物序列)、BS-clone 后 sanger 测序得到的序列。

a. 将基因组序列和 BS-clone 后测序所得到的序列导入到 Bioedit 中(图 1)。

```
O5WAK14F3R3  GGTGATAAACCACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAGATGAAATGAGGCTGTGTTAGATCCAAAGTTTGGATCCAAACTTCAGTCAATTTCCATCACAACAACCTTTCAGT
WH1709200140  AGGGGACTCGCATGCTCCGGGCGCCATGGGCGCGGGGAATTGATTTGGTGGATTTGTGGAGTGAAGATATGTATGTAGAAATTAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAGATG
WH1709200140  AGGCGGATCTGGCTTCGCTCCGGGCGCCATGGGCGCGGGGAATTGATTTGGTGGATTTGTGGAGTGAAGATATGTATGTAGAAATTAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAG
WH1709200140  GGGTACGCGAAATCCATGCTCCGGGCGCCATGGGCGCGGGGAATTGATTTGGTGGATTTGTGGAGTGAAGATATGTATGTAGAAATTAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAG
WH1709200140  GGGTTGGCGGGTGCATGCTCCGGGCGCCATGGGCGCGGGGAATTGATTTGGTGGATTTGTGGAGTGAAGATATGTATGTAGAAATTAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAG
WH1709200140  AAATGAGCGCTCCATGCTCCGGGCGCCATGGGCGCGGGGAATTGATTTGGTGGATTTGTGGAGTGAAGATATGTATGTAGAAATTAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAG
```

图 1. Bioedit 显示参考基因组序列以及测序序列

b. 通过将 BS-clone 得到的序列与基因组序列进行比对(图 2)，然后将我们所需要的目标区域的 BS-clone 得到的序列复制出来粘贴到另一个新建的文本文件中(图 3)。

```
O5WAK14F3R3  ---GGTGATAAACCACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAGATGAAATGAGGCTGTGTTAGATCCAAAGTTTGGATCCAAA
WH1709200140  AAAGGTGATAATTAACAGATGGAAGAAAATATATATGTGGTTGAGAGATGAAATGAGGCTGTGTTAGATCCAAAGTTTGGATTTAAA
```

图 2. 参考基因组序列以及测序序列对比

2) 在线计算 DNA 胞嘧啶甲基化水平

a. 输入文件与方法一不同的地方使我们需要将基因组序列和 BS-clone 得到的

序列分为两个文件，且此方法不需要预先处理序列，直接拿测回得到的序列进行分析即可。

- b. 打开网站 kismeth <http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>，然后按照如下图(图 3)步骤进行。

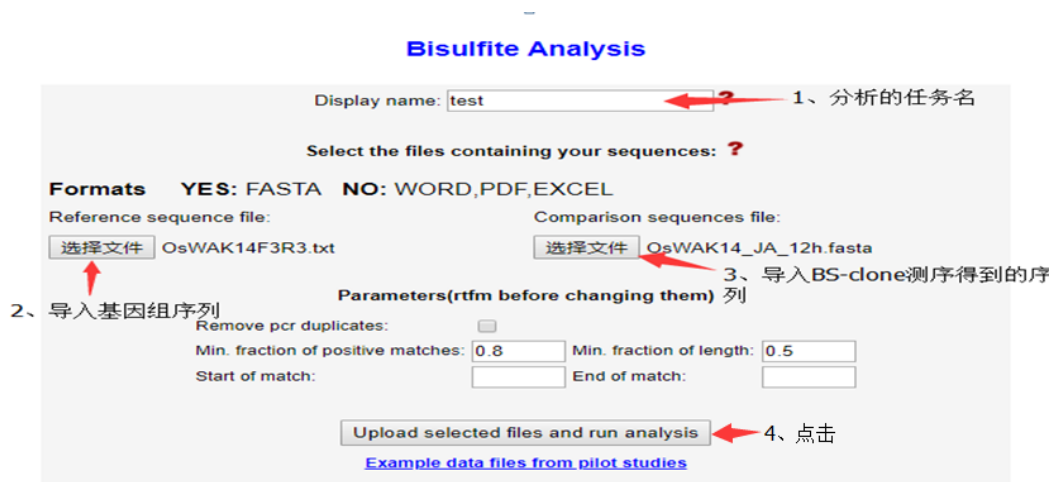


图 3. 导入参考基因组序列以及测序序列

- c. 显示页面就包含了 CG、CHG、CHH 甲基化比例的具体信息(图 4)，以及每个位点的甲基化比例的柱状图(图 5)，让人看起来一目了然。当然也包括像方法一展示的那样的 dotplot 图(图 6)。可以看出方法二比方法一是要简便很多，但是如果追求 dotplot 图的美观，选方法一更优。

Overall Statistics		
CG	total methylated=66.66%	total unmethylated=33.33%
CHG	total methylated=77.03%	total unmethylated=22.96%
CHH	total methylated=57.51%	total unmethylated=42.48%
All	total methylated=61.212%	total unmethylated=38.787%
		total=90
		total=270
		total=1290
		total=1650

图 4. CG、CHG 和 CHH 序列整体甲基化比例

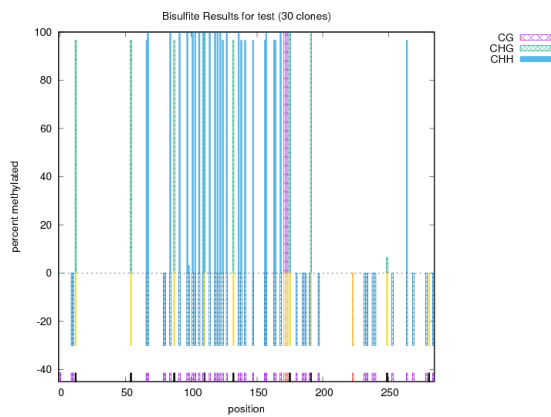


图 5. 每个位点的甲基化比例(柱状图)

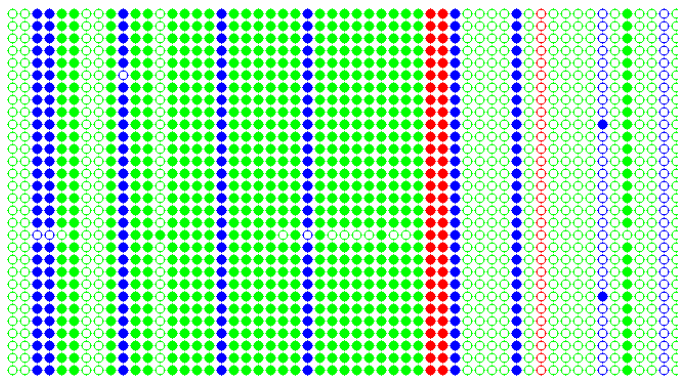


图 6. 每个位点的甲基化比例(斑点图)

注意事项

1. DNA 样品处理要完全，否则未处理完全的胞嘧啶会被错当作甲基化的，可以通过检测一些已知是否发生 DNA 甲基化的序列来判定是否处理完全，可参考文献 Wang 等(2011). 但是处理的太过会造成 DNA 的过度断裂，影响 PCR 扩增。
2. 处理会造成的序列的改变和 DNA 的断裂，设计引物时无法知晓匹配的位置是 C 还是 U，因此可以在有胞嘧啶的位置以简并引物代替；若软件无法得到合适的引物，可参考文献 Henderson 等(2010)手动设计。
3. 若 PCR 扩增遇到困难，可采用 Touch-down、Nested-PCR 等方法，根据个人经验效果比较好的是 Nested-PCR，即在目标区域外围设计一对引物，降低退火温度，牺牲特异性以换取扩增产物，再用目标引物进行正常扩增。如果利用 Nested-PCR，在用外围引物进行扩增时，可能得到弥散的 DNA 带，这个属于正常现象；将此步的 PCR 产物，作为下一步 PCR 的模板进行扩增。注明在第一轮 PCR 的时候，尽

可能选择较低的退火温度；在第二轮 PCR 扩增的时候，如果有条件可以，可以梯度设置 PCR 仪器的退火温度，寻找目标带清晰，且杂带较少的 PCR 扩增条件。

4. 一般地，如果所研究的物种有参考基因组以及 DNA 胞嘧啶甲基化图谱，可以下载图谱的可视化文件，在 IGV 等软件中搜寻目标区域，查看其 DNA 甲基化水平，并结合该区域附近的转座子以及 sRNA 富集情况综合考虑引物设计位置。

方法二：酶切-PCR

实验原理：不同的限制性内切酶对其识别序列中 C 的甲基化的敏感程度不同，如以对甲基化敏感的限制性内切酶消化基因组 DNA，若其识别序列发生了 DNA 甲基化则无法完成切割，再以此 DNA 为模板进行 PCR 扩增就可以得到目标条带，反之则无法扩增，从而判断该区段的相对 DNA 甲基化情况。相比较重硫酸盐测序，该方法操作简单，但分辨率不够。

实验目的：一般以下情况使用该方法：定性检测目标区段的 DNA 甲基化。

关键词：DNA 甲基化，内切酶消化，PCR

材料与试剂

1. PCR 管
2. 各种型号枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
3. 限制性内切酶，常用的如：HaeIII (NEB, R0108)、HpaII (NEB, R0171)、MspI (NEB, R0106)、McrBC (NEB, M0272)等
4. 琼脂糖
5. PCR 引物

仪器设备

1. 移液器
2. PCR 仪
3. 电泳装置

实验步骤

1. 高质量基因组 DNA 抽提。
2. 取 500 ng DNA，加入 20 U 的 McrBC 完全酶切。
注：酶的具体用量和酶切时间请参考特定的内切酶的说明书，但是要保证完全酶切。
3. 以特异的引物进行 PCR 扩增。
4. 琼脂糖凝胶电泳。OsDRM2 是一类负责维持 CHH 序列甲基化的 DNA 甲基转移酶，*osdrm2* 的缺失导致水稻全基因组 CHH 序列的大量丢失；如图 7 所示，利用野生型(WT)和 *osdrm2* 突变体材料，利用 HaeIII 消化酶切，选取某个位点设计引物进行 PCR 扩增。由于 control 中并没有加入 HaeIII，所以 WT 和 *osdrm2* 突变体的 PCR 产物亮度一致，也说明酶切体系中 DNA 的量一致。在 HaeIII 加入的体系中，*osdrm2* 突变体亮度消失。由于 HaeIII 是一种 DNA 甲基化敏感酶类，无法消化高甲基化区域，但是可以消化 GGCC 序列，因此在 *osdrm2* 突变体中该区域相比于野生型 CHH 甲基化修饰，从而可以被 HaeIII 消化。

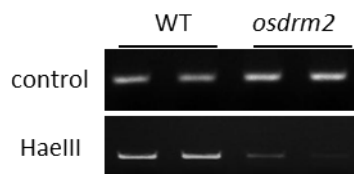


图 7. 水稻野生型及突变体 HaeIII 及 McrBC 酶切 PCR 示意图(来自 Tan 等, 2016 [Plant Physiology, 171:2041-2054])。OsDRM2 是一种负责维持 CHH 序列甲基化的 DNA 甲基化转移酶，*osdrm2* 是其功能缺失型突变体，WT 为其野生型；control 为不加 HaeIII 的反应体系。

注意事项

1. 结果分析时，不同的酶性质不一样，如 McrBC 特异切割甲基化的识别序列，而 HpaII 则对甲基化敏感。
2. 植物中的 DNA 甲基化分为 CG、CHG 和 CHH (H=A, T, C)，一般分别用 HpaII、MspI 和 HaeIII 加以区分。

方法三：酶切-Southern blot

实验原理：与酶切-PCR 类似，将内切酶消化后的基因组 DNA 进行 Southern blot 分析，检测 DNA 甲基化情况。

实验目的：一般以下情况使用该方法：定性检测目标序列的 DNA 甲基化；为了研究目的基因是否影响 DNA 甲基化，可以此方法检测 5S rDNA、着丝粒等具代表性的 DNA 序列的甲基化。

关键词：DNA 甲基化，内切酶消化，Southern blot，5S rDNA，着丝粒

材料与试剂

1. 各种型号枪头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
2. 限制性内切酶，常用的如：HaeIII (NEB, R0108)、HpaII (NEB, R0171)、MspI (NEB, R0106)、McrBC (NEB, M0272) 等

仪器设备

1. 移液器
2. PCR 仪
3. 电泳装置

实验步骤

1. 取 5-10 μ g 基因组 DNA，分别加入 10 U 的 HpaII、MspI 和 HaeIII，37 度酶切 3 小时左右，反应进行到 2 小时即可取样进行琼脂糖凝胶电泳，检测 DNA 的消化情况，酶切判断标准同一般的 Southern blot。
2. 后续步骤同 Southern blot (见实验方案 Southern Blot [吴昊等, 2018])。
3. 结果分析：以 5S rDNA 为例，见图 8，HpaII 和 MspI 识别同样的序列 CCGG，HpaII 对 2 号位 C 的甲基化敏感而 MspI 对 2 号位的不敏感，对 1 号位的 C 敏感，因此分别用于识别 CG 和 CHG 甲基化。由图 8 可知，HpaII 没有消化 DNA 而 MspI 消化了，说明 CG 甲基化程度高而 CHG 甲基化程度相对较低；再比较 MspI 处理的三个材料，从左至右 DNA 被消化的程度越来越高，说明 CHG 甲基化程度逐次降

低。



图 8. 野生型以及 *kyp*、*cmt* 突变体酶切 southern-blot 示意图(来自 Jackson 等, 2002 [Nature, 416:556-560])

参考文献

1. 吴昊等. (2018). Southern Blot. *Bio-101* e1010104. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010104. (in press)
2. Chen, X., Liu, X., Zhao, Y. and Zhou, D. X. (2015). [Histone H3K4me3 and H3K27me3 regulatory genes control stable transmission of an epimutation in rice.](#) *Sci Rep* 5: 13251.
3. Henderson, I. R., Chan, S. R., Cao, X., Johnson, L. and Jacobsen, S. E. (2010). [Accurate sodium bisulfite sequencing in plants.](#) *Epigenetics* 5(1): 47-49.
4. Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X. and Jacobsen, S. E. (2002). [Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase.](#) *Nature* 416(6880): 556-560.
5. Li, L. C. and Dahiya, R. (2002). [MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.](#) *Bioinformatics* 18(11): 1427-1431.
6. Southern, E. M. (1975). [Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.](#) *J Mol Biol* 98(3): 503-517.
7. Tan, F., Zhou, C., Zhou, Q., Zhou, S., Yang, W., Zhao, Y., Li, G. and Zhou, D. X. (2018). [Genome-wide identification and characterization of CpNpG DNA methylation in rice.](#) *Plant Cell Physiol* 59(12): 2303-2315.

- (2016). [Analysis of Chromatin Regulators Reveals Specific Features of Rice DNA Methylation Pathways](#). *Plant Physiol* 171(3): 2041-2054.
8. Tusnady, G. E., Simon, I., Varadi, A. and Aranyi, T. (2005). [BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes](#). *Nucleic Acids Res* 33(1): e9.
9. Wang, J., Wang, C., Long, Y., Hopkins, C., Kurup, S., Liu, K., King, G. J. and Meng, J. (2011). [Universal endogenous gene controls for bisulphite conversion in analysis of plant DNA methylation](#). *Plant Methods* 7: 39.