



博淼生物
BIOMIAO BIOLOGICAL

Your own Laboratory
您的专属实验室

甲基化整体解决方案

全国统一服务电话：400-6506-908

网址：www.biomiao.com

邮箱：marketing@biomiao.com

地址：北京市西城区马连道六号鼎观大厦
706/707

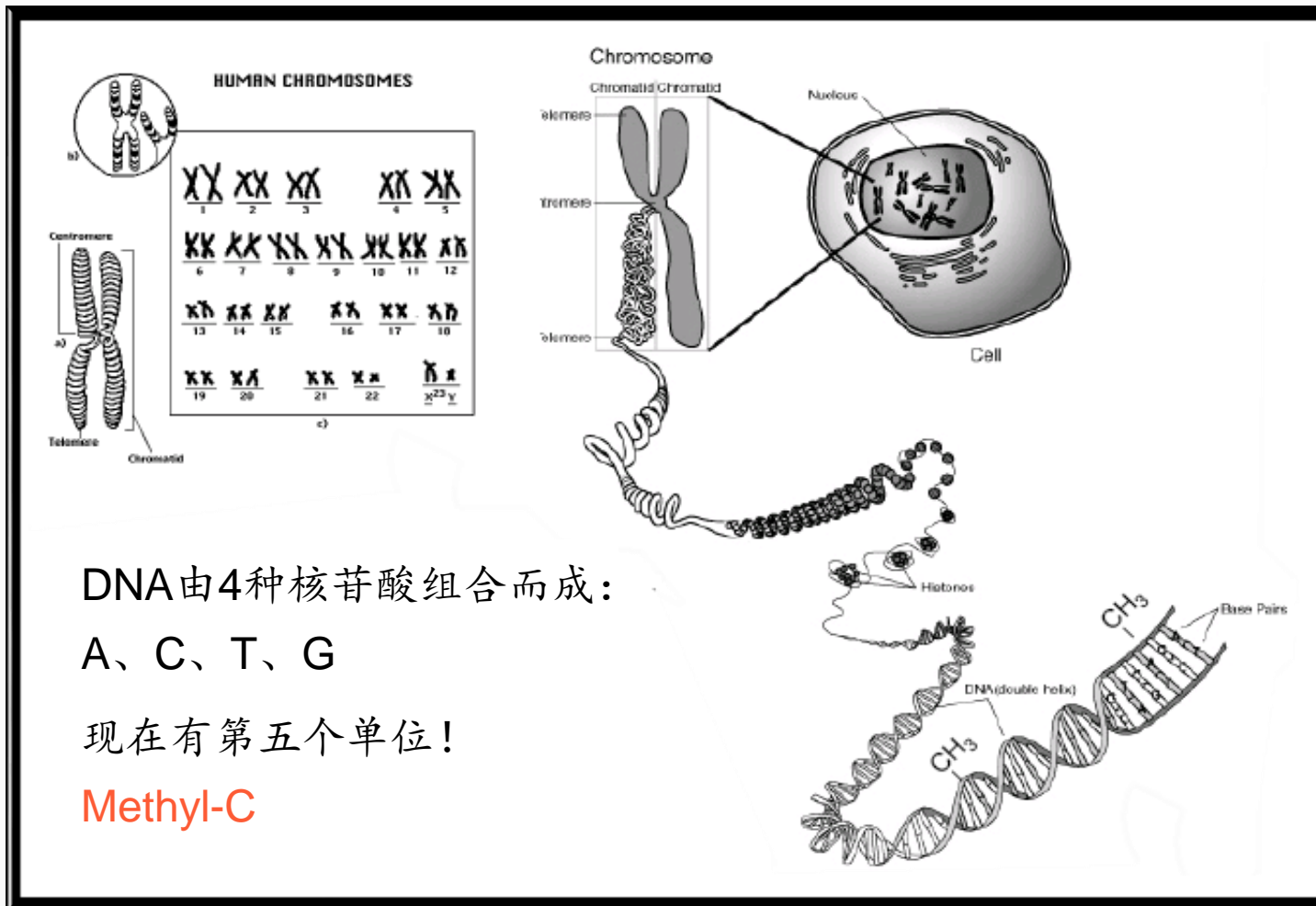
1 背景知识

2 科研路线

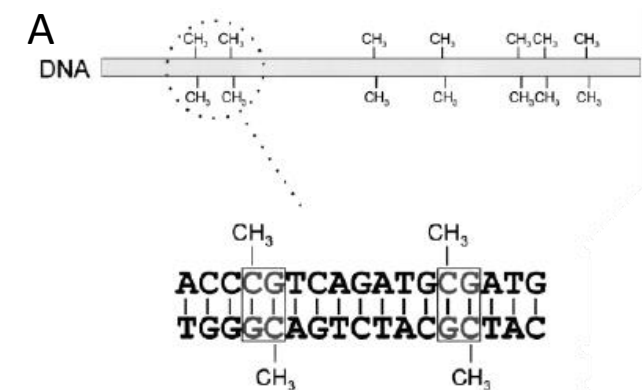
3 拓展整合研究

4 Massarray 技术原理

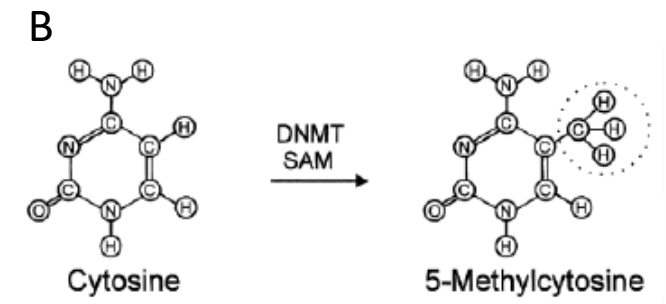
5 文献分享



A

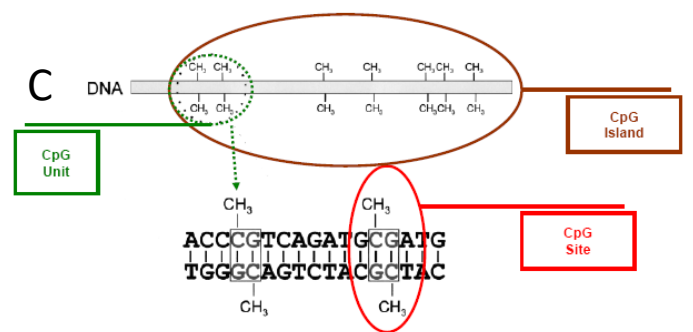


B



Cytosine → 5-Methylcytosine

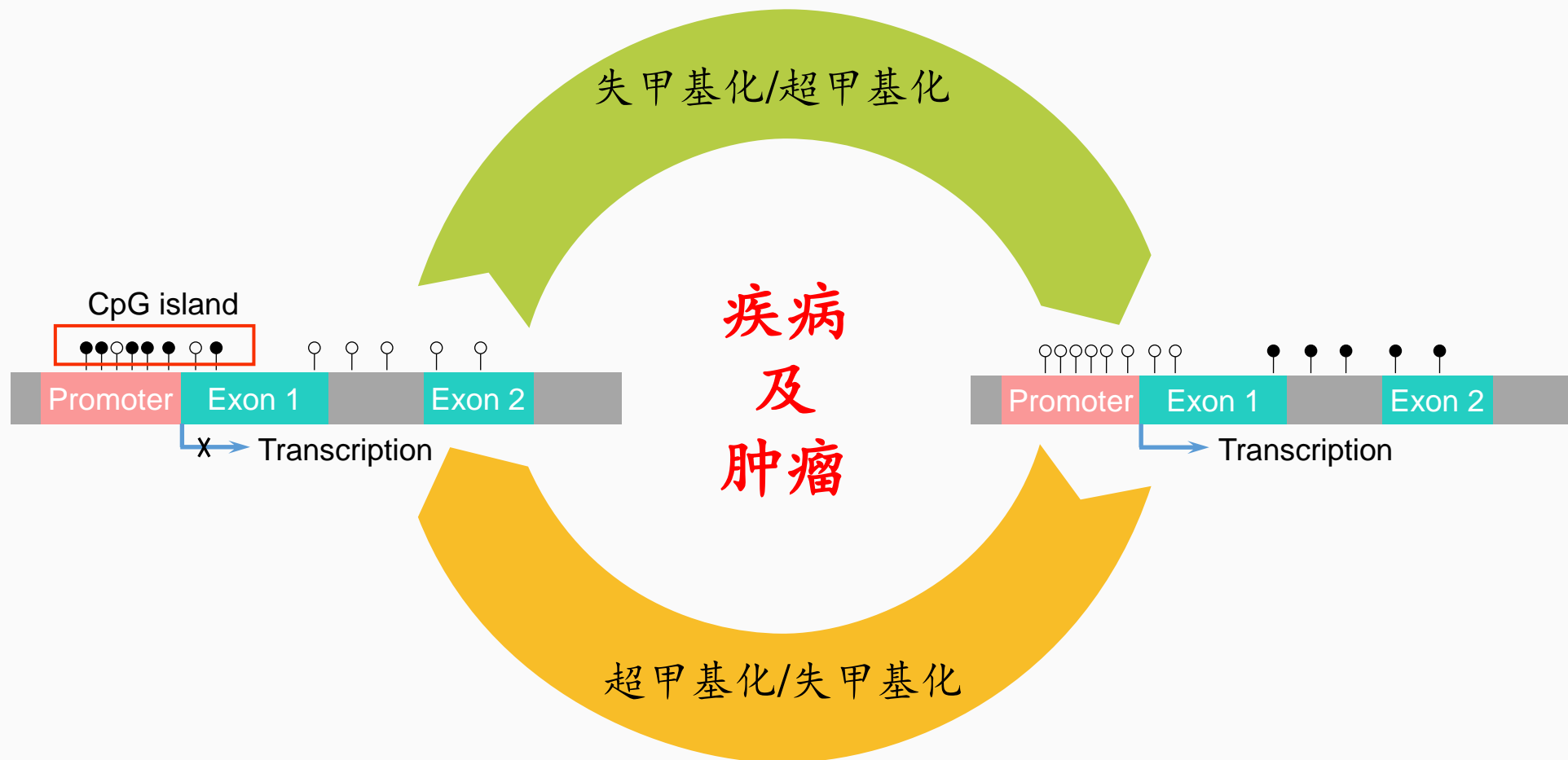
C



重要区域: **CpG island**、**island shores**、**island shelves**

- 甲基化通常发生于功能相关的二核苷酸CpG
- 通常集群分布在所谓的CpG岛内
- CpG岛通常位于启动子区域, 具有调控染色质结构及基因表达的功能





甲基化定性研究



特异甲基化区域及
CpG site定量研究

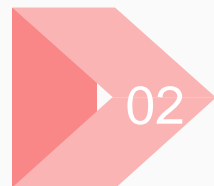
- 焦磷酸测序法
- Massarray质谱法

全基因组水平
CpG site定量研究

- 甲基化芯片——85万个CpG site
- 甲基化NGS测序——550万个CpG site



全基因组水平甲基化研究



特定区域甲基化研究

全基因组水平甲基化研究——EWAS



01

全基因组甲基化芯片
全基因组甲基化二代测序

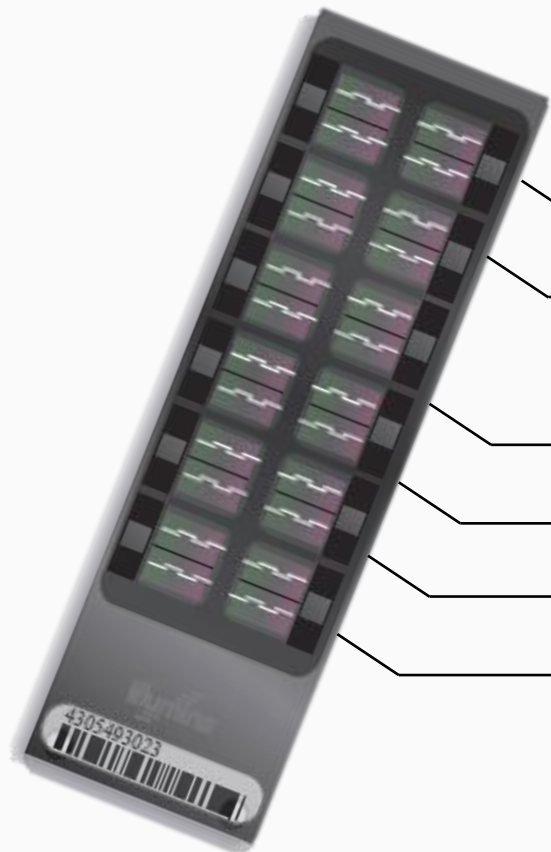
02

均一化及差异CpG筛选
层次聚类分析
转录因子预测分析
甲基化显著基因GO/Pathway分析

03

Massarray技术

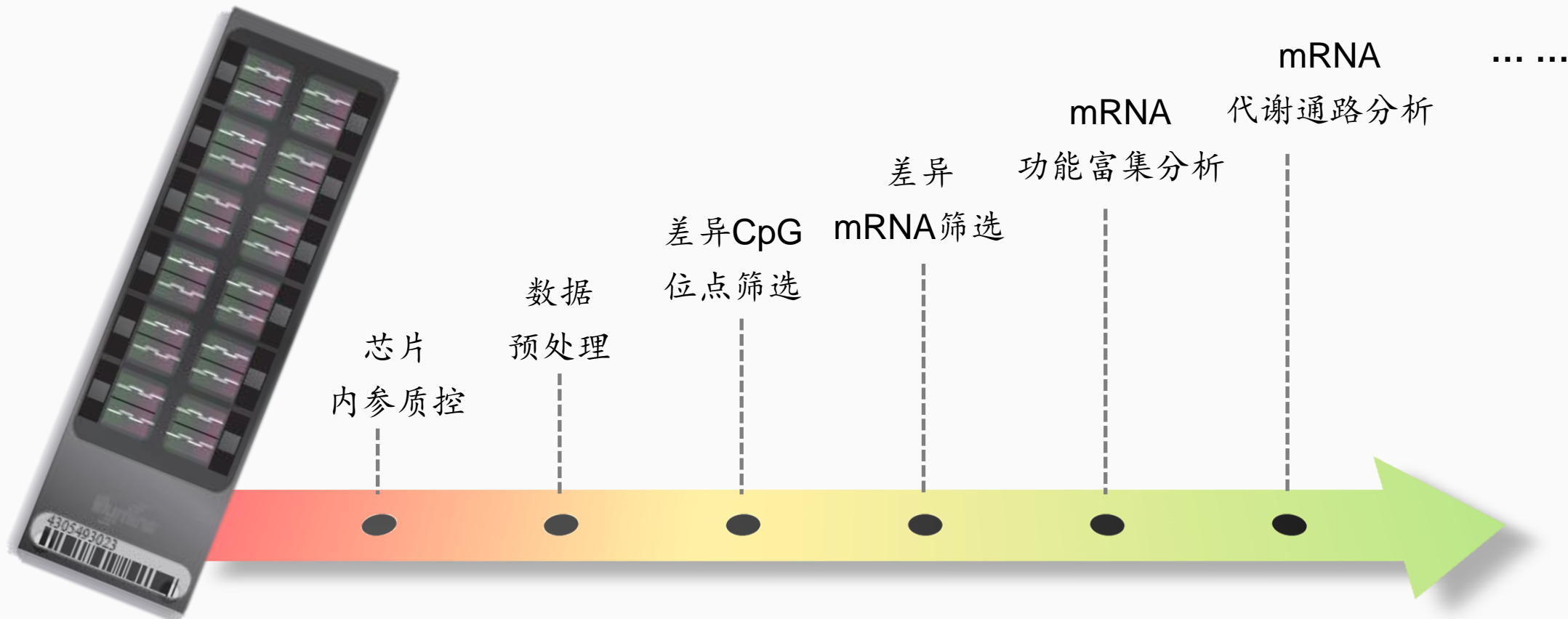
Infinium MethylationEPIC BeadChip

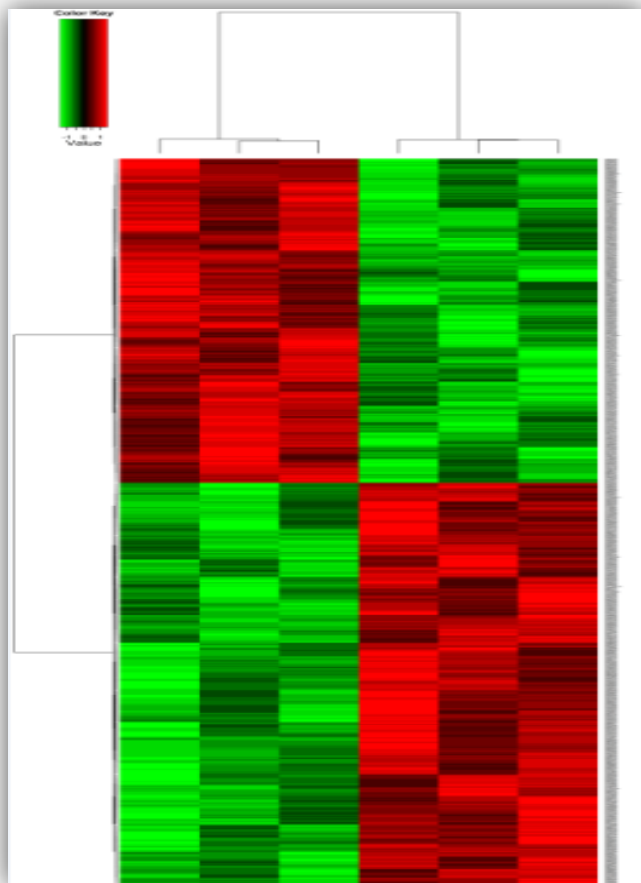


- Over 850,000 methylation sites
- Coverage gene promoter、5UTR、first exon、gene body、3UTR
- CpG island
- miRNA promoter regions
- DNase hypersensitivity sites
- Compatible with FFPE Sample

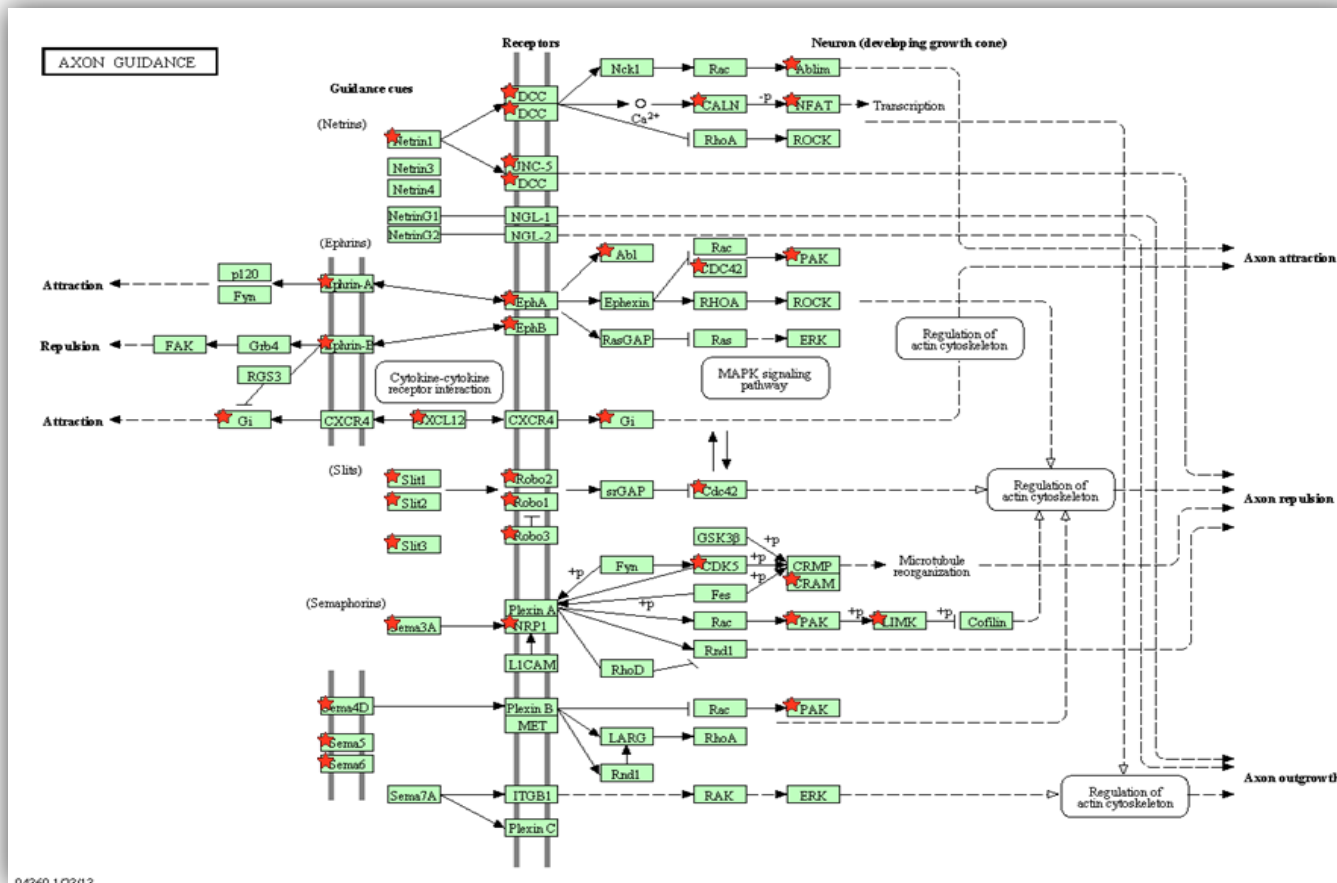
... ..

芯片数据分析流程



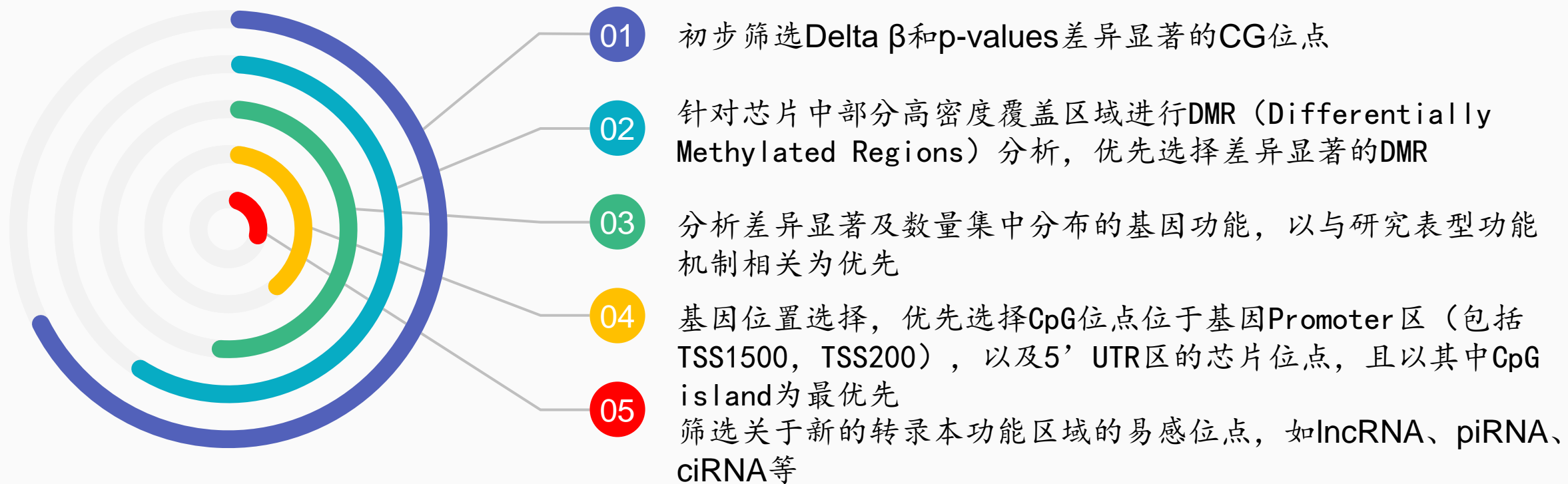


聚类分析



代谢通路分析

甲基化芯片易感位点筛选策略：



特定区域甲基化研究



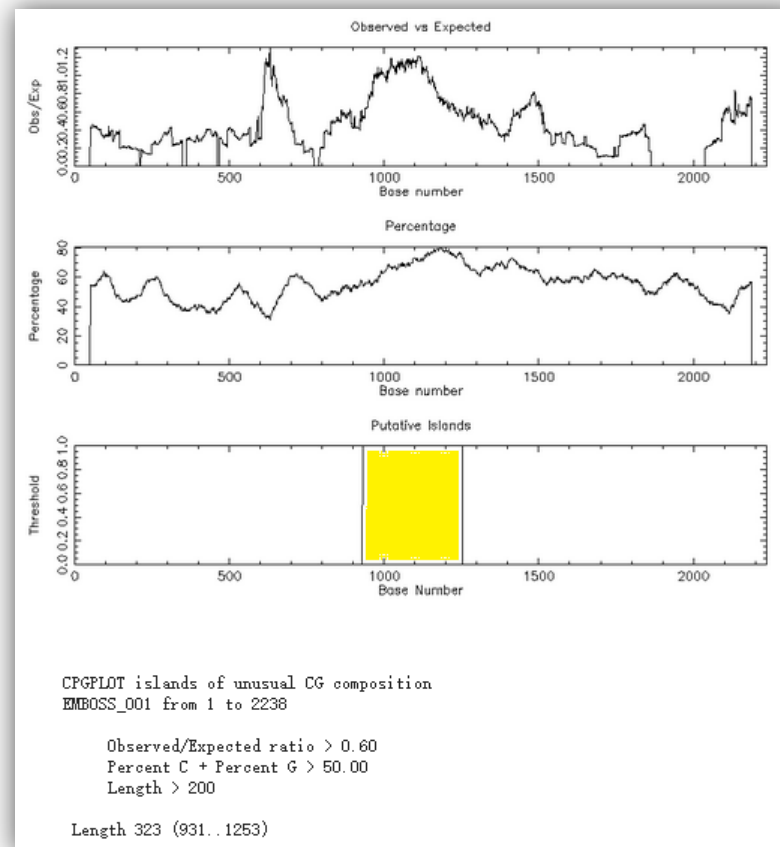
- 01 mRNA、miRNA、lncRNA、mtDNA等基因相关区域
预测CpG island
- 02 预测转录因子、SNP与CpG site关系
- 03 Massarray技术
- 04 聚类分析（疾病性状、mRNA表达等）

寻找CpG island

通过http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/

寻找符合特定参数要求的CpG island基因序列区域

WINDOW SIZE	MINIMUM LENGTH	MINIMUM OBSERVED	MINIMUM PERCENTAGE
100	200	0.6	50



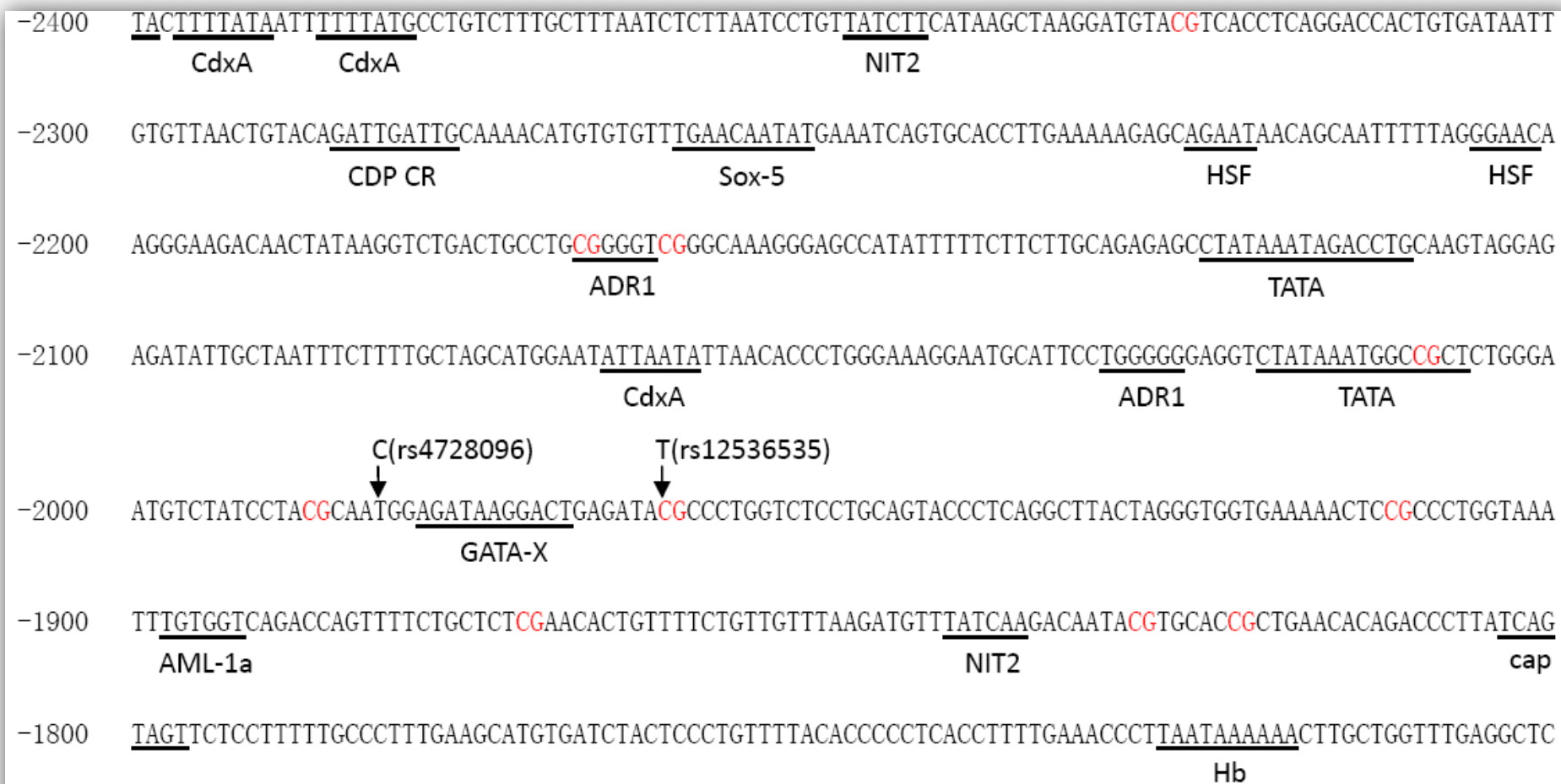
预测潜在的转录因子结合位点

通过<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>，在启动子区域寻找潜在的转录因子结合位点（特别是包含CpG的结合位点）

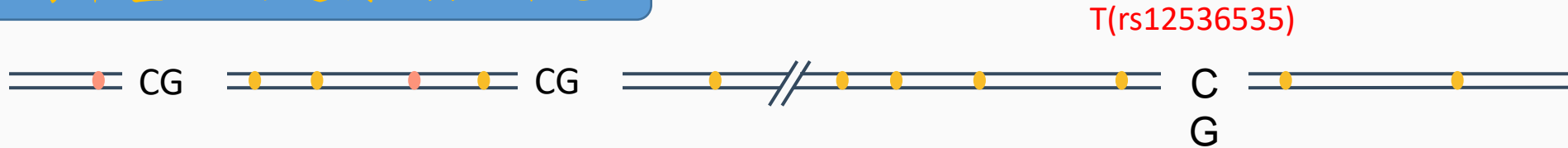
entry	score
M00048 ADR1	95.4
M00175 AP-4	93.8
M00176 AP-4	91.9
M00175 AP-4	91.7
M00032 c-Ets-	90.2
M00176 AP-4	89.2
M00263 StuAp	87.7
M00253 cap	86.7

1 TTTGCCA**ACG** TTAAGGA**CGC** GCAGCTGTGA CACAGCCCCA GGAAGTCCAG

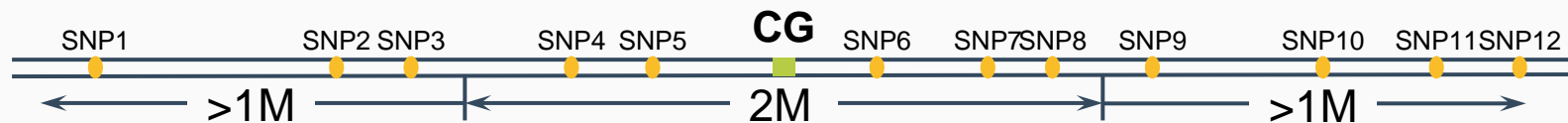
Promoter Region 中 CpG site、TFBS、SNP



SNP与甲基化的遗传调控研究



Allele-specific methylation (ASM) { associated with methylation of a nearby CpG site
SNP itself destroyed a CpG site by changing the C to T



cis-Regulation: cis-acting regulation by DNA elements in or adjacent to each CpG site

trans-Regulation: trans-acting regulation by factors from the genomic regions distant from the CpG sites, including from different chromosomes.

甲基化与代谢组的遗传调控研究

01

全基因组甲基化分析

01

全基因组甲基化定量检测

02

代谢组/物分析

02

非靶向代谢组筛选或靶向代谢组定量

03

甲基化和代谢物的相关性

03

相关性分析, 线性回归等

04

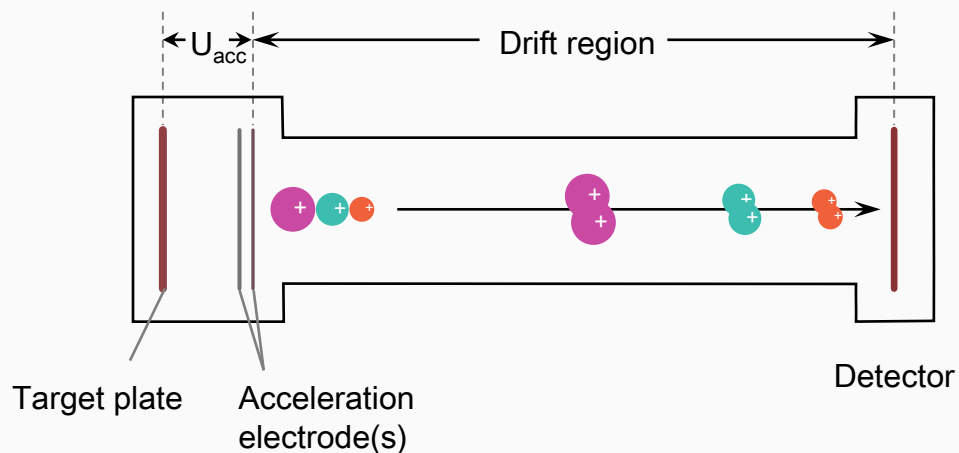
生物信息学分析

04

代谢途径富集和代谢通路分析

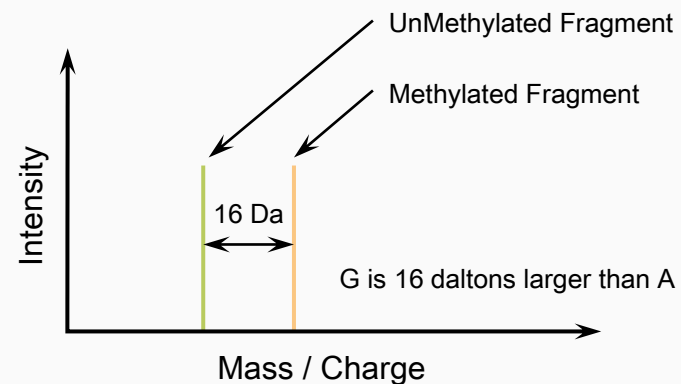
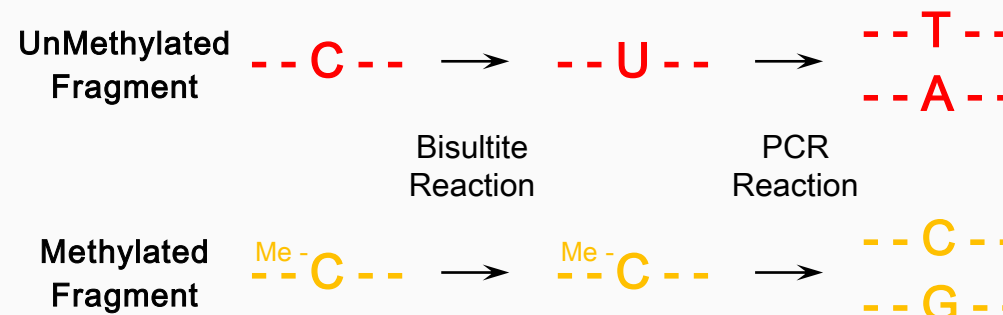
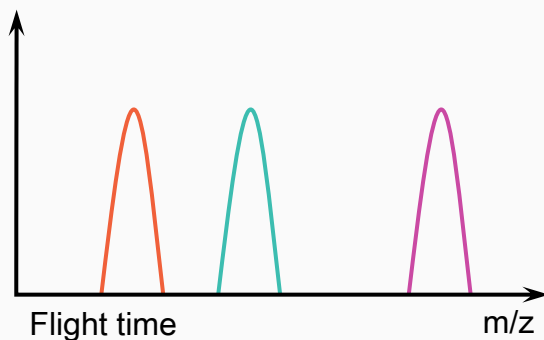
MassArray 甲基化检测原理

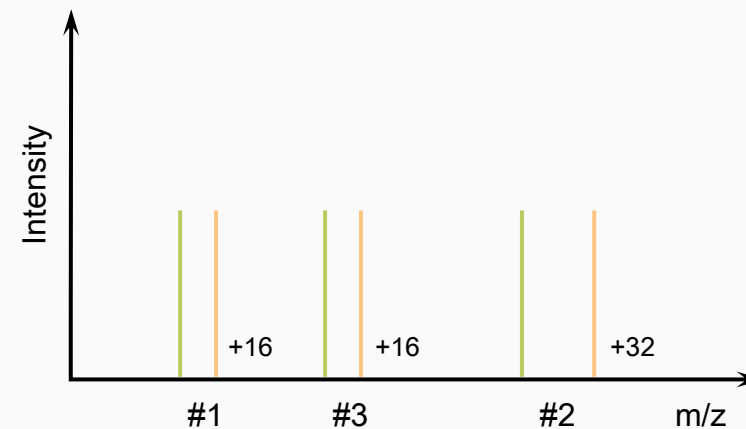
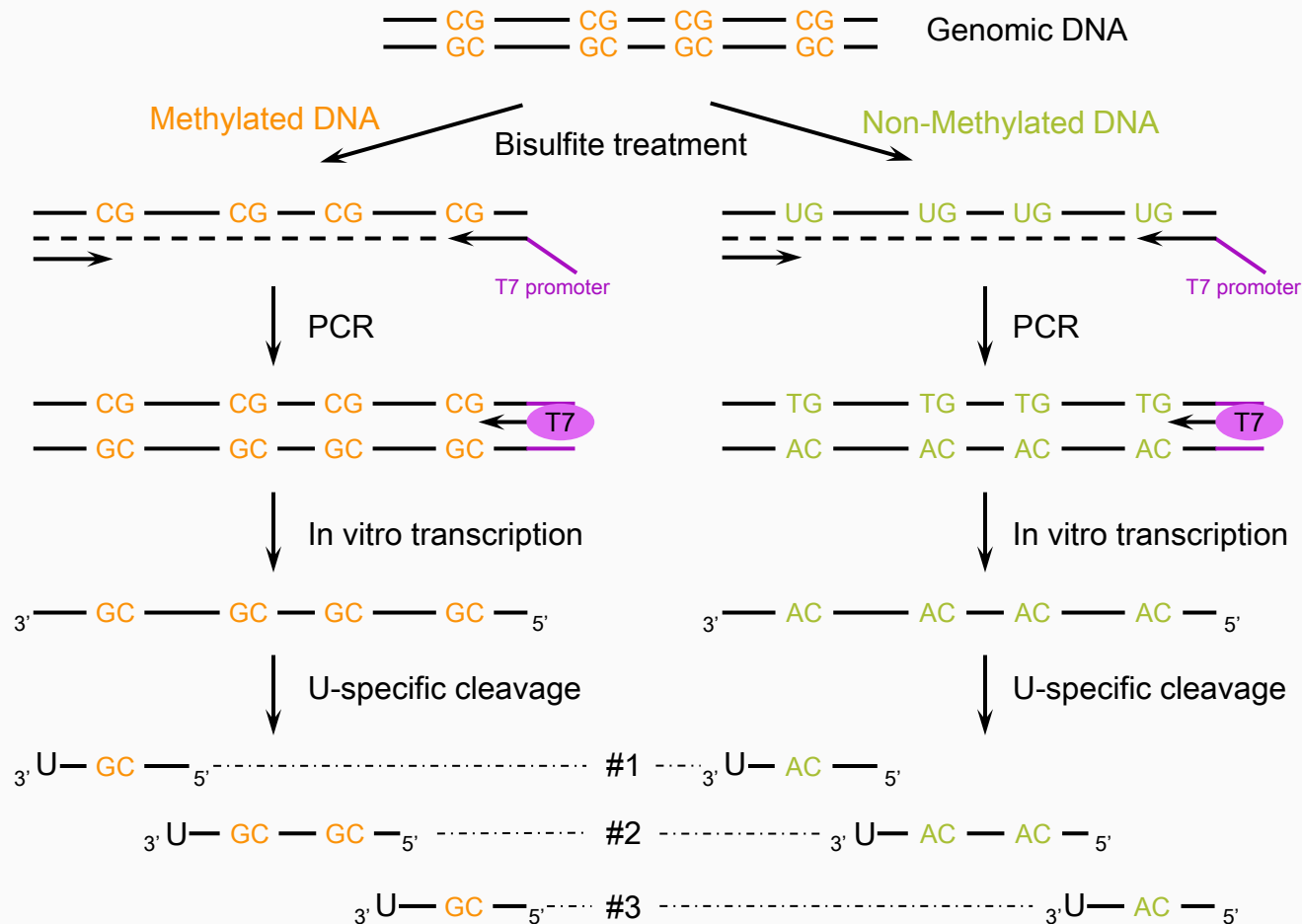


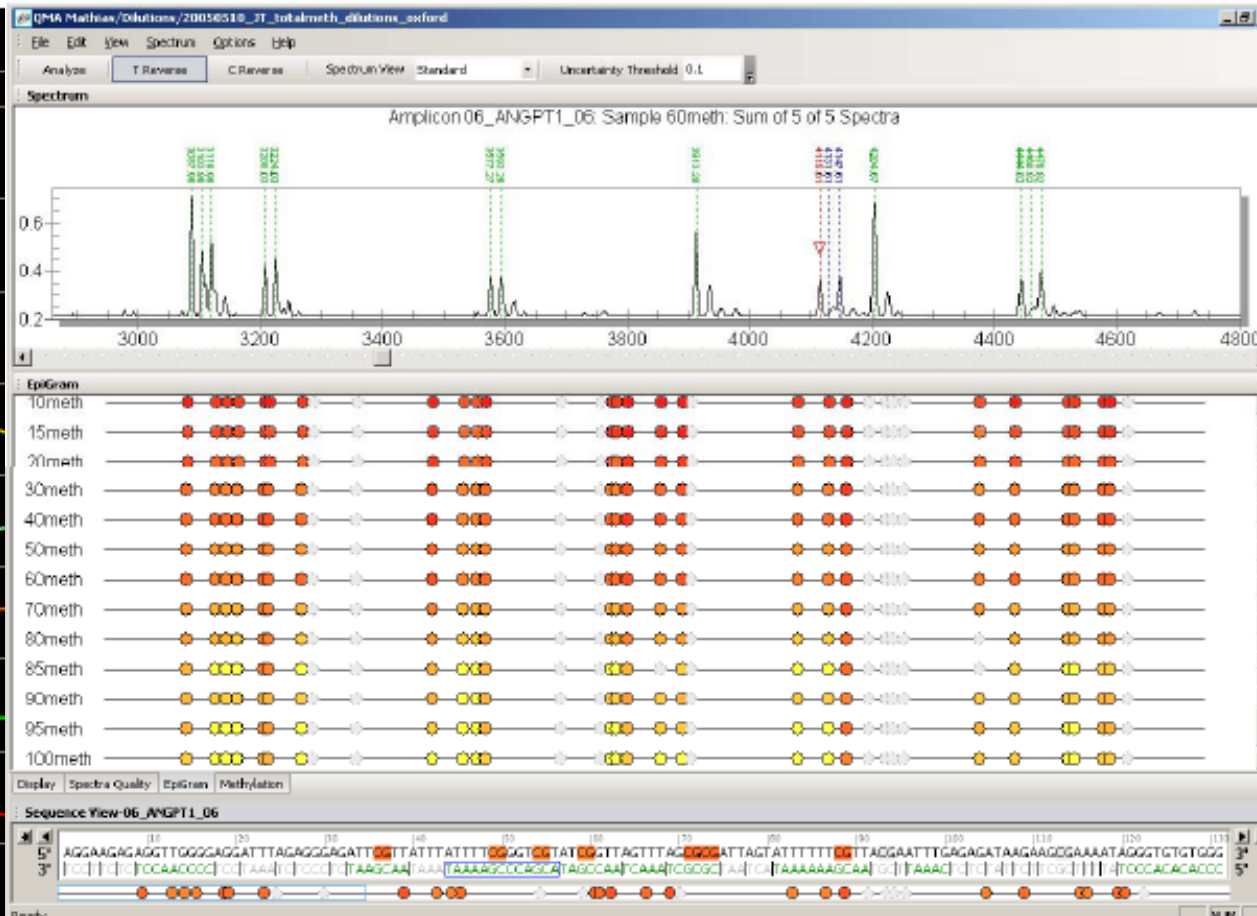
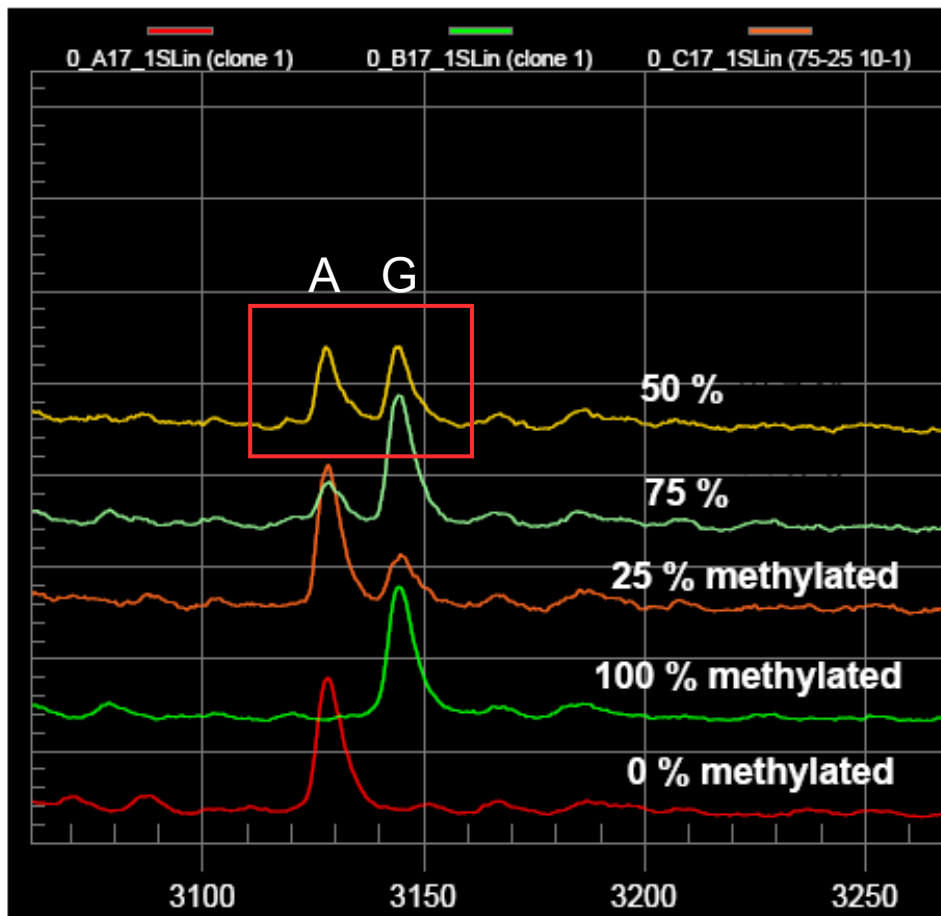


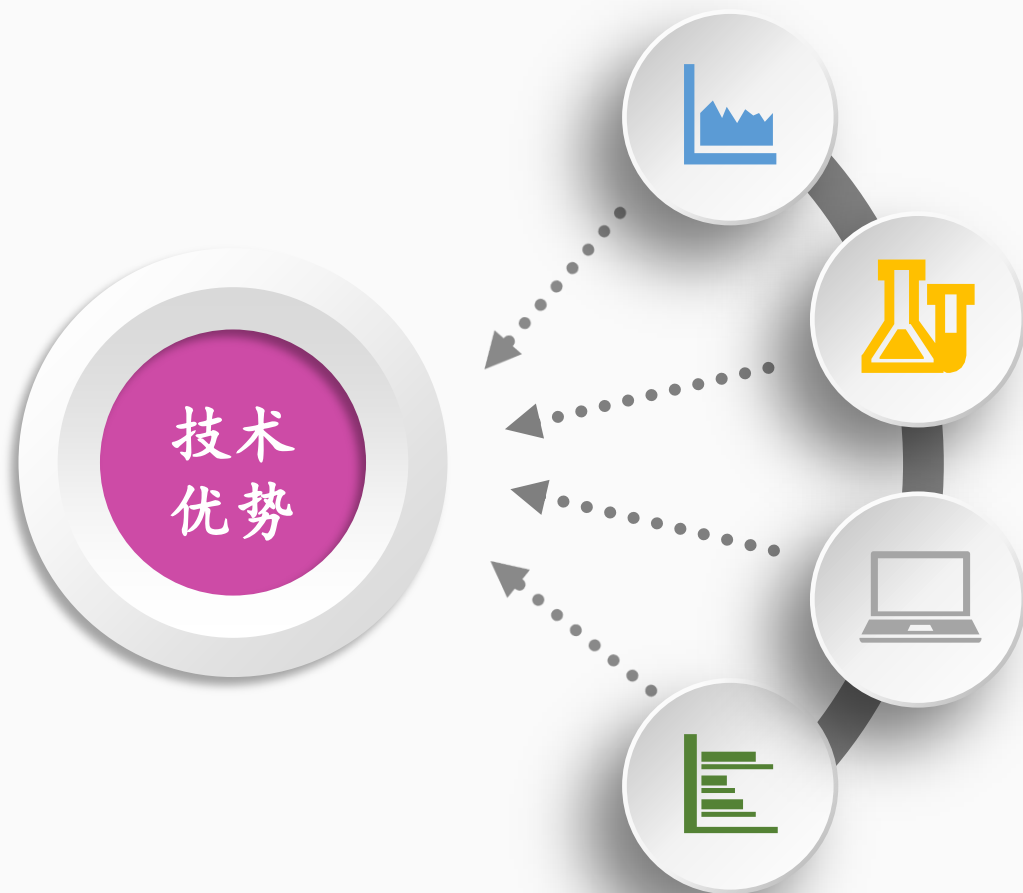
$$E = \frac{1}{2}mv^2$$

- dAMP = 313.2Da
- dGMP = 329.2Da
- dCMP = 289.2Da
- dTMP = 304.2Da









定量定性分析一步到位

可对400-600bp的靶区域的相对甲基化程度进行检测

对每个扩增子内多个CpG位点进行准确定量

可视化数据产出

文献一 ——mRNA甲基化研究

Cytosine Methylation Profiles as a Molecular Marker in Non-Small Cell Lung Cancer *Cancer Research*

样本选择: 96 lung cancer patients——癌组织及对应的癌旁组织

候选基因的选择: 47个基因, 与cell adhesion and interaction, 及已知在肿瘤发生过程中表达发生变化的基因。

位点确定: 候选基因启动子区包括1426个CpG position, 由757CpG units组成。

方案设计: A. Training set: 88 tissue samples from 44 lung cancer patients; Test set: 79 tissue samples from 40 lung

cancer patients

B. 进行聚类分析, 定量甲基化可以作为肺癌诊断的molecular markers.

C. 对甲基化程度明显差异的基因进行表达定量研究, 探讨甲基化对靶基因的表达影响。

结果讨论: A. 确定30个CpG units在肿瘤组织和正常组织间甲基化程度大于10%。

B. 聚类分析如图所示。

C. 对于19个甲基化差异明显CpG units所分布的六个基因MGP、SerpineB5、GAGED2、TNA、RASSF1、SDK2, 通过RT-qPCR进行表达量的验证, 数据显示基因启动子区超甲基化影响



文献二——miRNA 甲基化研究

Genome-wide miRNA methylation analyses in non-small cell lung cancer patients
Research

Cancer

样本选择: 50例NSCLC的肿瘤组织及癌旁组织, 108例NSCLC的肿瘤组织及癌旁组织进行二期验证

方案设计: A. MeDIP-chip进行全基因组甲基化分析, 筛选差异甲基化区域?
B. 二期样本验证甲基化区域的差异性?
C. 差异化基因功能机制?

结果讨论: 1、针对50例NSCLC的肿瘤组织及癌旁组织通过MeDIP-chip进行全基因组甲基化分析。
2、通过数据分析, 发现有39个与肿瘤调控相关的miRNA基因存在显著甲基化水平差异。
3、其中将六个miRNA基因, miR-10b、miR-1179、miR-137、miR-572、miR3150b和miR-129-2作为靶向区域, 采用108例NSCLC的肿瘤组织及癌旁组织进行二期验证。
4、通过miRNAWalk2.0进行miRNA调控靶基因预测, 筛选与肿瘤发病有关的基因。经过来源于Cancer Genome Atlas数据库中超1000例NSCLC样本的RNA-seq分析, 发现上述较多miRNA调控的靶基因在肿瘤组织中表达上调。
5、基于上述数据, 在体外进行了miRNA-1179与靶向基因CCNE1的调控机制研究, 证明前者抑制后者的表达。

文献三——LncRNA甲基化研究

Epigenetic silencing of tumor suppressor long non-coding RNA BM742401 in chronic lymphocytic leukemia *Cancer Research*

样本选择：3个正常骨髓，3个正常外周血白膜，3个正常CD19分选外周B细胞，7个CLL细胞系，98个CLL骨髓

候选基因的选择：long non-coding RNA BM742401，为胃癌抑制基因。

区域确定：Promoter of BM742401

结果讨论：A. Promoter of BM742401在正常样本中非甲基化，而在CLL细胞系中甲基化；
B. BM742401的启动子区域甲基化抑制该lncRNA的表达；
C. BM742401的过表达研究证明抑制了细胞的繁殖，增强了细胞凋亡，说明外CLL的抑制基因。

文献四——候选基因甲基化与SNP的研究

A genetic association study of DNA methylation levels in the DRD4 gene region finds associations with nearby SNPs *Behavioral and Brain Functions*

样本选择：来自30个家系的89个个体相关淋巴母细胞系；18个脑组织

候选基因的选择：DRD4，精神疾病易感基因

区域确定：+/-10kb of the promoter region内的5个SNP位点，及相关CpG sites

结果讨论：A. 有4个SNP位点与该区域甲基化水平关联；
B. 有2个位点在脑组织中也存在与该区域甲基化水平关联；
C. DRD4目标区域甲基化在淋巴母细胞系与脑组织中相似；
D. 特定区域中的SNP通过调控甲基化来发挥其功能机制。

文献五——GWAS、EWAS、RNA expression整合性研究

Genetic Control of Individual Differences in Gene-Specific Methylation in Human Brain



实验材料

153个人源小脑组织

实验方法

EWAS array methylation
Expression Data
GWAS array Genotyping

结果分析

Expression and Methylation Data Preprocessing
QTL Analysis(eQTL、mQTL)
mSNPs on Gene Expression
cis- and trans-Regulation of Methylation

文献六——甲基化与代谢组的研究

Metabolomic analysis revealed the role of DNA methylation in the balance of arachidonic acid metabolism and endothelial activation

Biochimica et Biophysica Acta

甲基化候选基因：PGD2合酶 TBXAS1合酶

代谢物检测：花生四烯酸代谢轮廓分析

实验处理：甲基化抑制剂（5-AZA）处理

结果讨论： A DNA的去甲基化引起PGD2合酶 TBXAS1合酶表达变化上调

B 去甲基化与花生四烯酸代谢物含量增加相关

结论：DNA去甲基化通过改变相应酶的表达来增加花生四烯酸的含量

我们提供的不仅仅是检测……



Your own Laboratory

——您的专属实验室

更多技术服务：基因组学、蛋白质组学、代谢组学等请访问公司网站www.biomiao.com或与本公司区域销售索要相关资料