

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.2017.01.201609001

基于微量 DNA 样本的简化甲基化文库构建方法研究

魏冬凯^{1,2}, 南 蓬², 徐康萍¹, 裘 锋^{1,3*}

(1. 苏州贝斯派生物科技有限公司 江苏 苏州 215123;
2. 复旦大学生命科学学院 上海 200438;
3. 上海生物信息技术研究中心 上海 201203)

摘 要:RRBS(简化甲基化测序)是一种有效研究 DNA 甲基化状态的测序方案。文库构建是该方案中最关键的实验步骤之一,RRBS 文库构建往往因为酶切产物少,文库构建步骤繁多等因素,导致 DNA 起始量需要 1 ug 以上。然而很多来源于人的样本,如冰冻组织穿刺、石蜡切片、显微微切割等,都往往只能获得 100 ng 以下的 DNA,无法满足常规 RRBS 文库构建的起始 DNA 总量要求,从而大大限制 RRBS 技术的应用范围。本研究主要探讨并设计了基于微量 DNA 样本(<100 ng)的 RRBS 文库构建策略,主要通过优化 MspI 酶切条件、DNA 片段大小筛选、缩减反应步骤及减少 DNA 转移次数等技术手段,大大提高了 DNA 回收率,进而建立了 2 种有效使用微量 DNA 样品的 RRBS 文库构建方案(即 EA-Method 和 WB-Method 方案)。EA-Method 方案在处理 100 ng 左右的 DNA 时,有经济、快速、高效的特点,但文库质量略差于 WB-Method 方案;WB-Method 方案可将 DNA 起始量降低至 10 ng,并且文库质量高。为验证 WB-Method 方法的可靠性,研究人员选取了 3 种志愿者样本(全血和口拭子),采用 WB-Method 同时进行常量和微量 RRBS 文库构建,并进行 Illumina Hiseq 平台测序,数据通过生物信息分析得到微量 RRBS 检测的 CpG,CHG,CHH 中 C 碱基的甲基化比例与常量 RRBS 结果一致。同时,该方法可以大大降低 DNA 损耗及损伤,因而该方法可将 RRBS 技术应用到更广泛的样本类型中去,有效拓展 RRBS 的研究领域。

关键词:二代测序;RRBS;简化甲基化;EA-M;WB-M
中图分类号:Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2017)01-033-13

An μLtra-low-input RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) library preparation method

WEI Dongkai^{1,2}, NAN Peng², XU Kangping¹, QIU Feng^{1,3*}

(1. BasePair Bio-Technology Co.Ltd, JiangSu Suzhou 215123, China;
2. School of Life Sciences Fudan University, Shanghai 200438, China;
3. Shanghai center for Bioinformation technology, Shanghai 201203, China)

Abstract:RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) is an effective method for DNA methylation study. Library preparation is one of the most critical steps of RRBS experiments. In conventional RRBS library preparation, it usually needs 1 ug or more starting DNA because of less enzyme digested products and losses in various experiment steps. Meanwhile, many clinical samples from patients, such as frozen puncture tissue, FFPE, microdissection, etc., there is only a limited amount of extracted DNA less than 100 ng, and they don't fit the requirement of the conventional RRBS library preparation, which greatly limits the application field of RRBS technology. This research studies and designs RRBS library preparation using μLtra-low-input DNA samples (<100 ng), mainly by optimizing MspI digestion condition, DNA fragment size selection, reduction of reaction steps and DNA transfer steps in library preparation, which greatly improve the DNA recovery. We set up two effective μLtra-low-input RRBS library preparation methods (EA-Method and WB-Method). The EA-Method is more cost effective, fast, and efficient than WB-Method when DNA input amount around 100 ng, but the library quality is slightly lower

收稿日期:2016-09-03;修回日期:2016-09-20.
作者简介:魏冬凯,男,硕士研究生,研究方向:高通量测序技术及应用;E-mail:dkwei@basepair.cn.
* 通信作者:裘锋,男,研究员,研究方向:高通量测序及液态活检;E-mail:qiufeng@scbit.org.

than the WB-Method; The WB-Method has higher quality performance when using 10 ng DNA. In order to test the reliability, we construct 3 groups of RRBS libraries (1ug DNA input and 10ng DNA input) from three volunteer samples (whole blood and mouth swab) by WB-Method. The prepared libraries are sequenced on Illumina Hiseq platform. The compatible results are obtained comparing the ultra-low-input and conventional RRBS method by analysis of detected C bases in the CpG, CHG, CHH methylation rate. Nevertheless, the ultra-low-input RRBS method can greatly reduce DNA loss and damage during library preparation, and it will be a wider application of RRBS technology to different type samples and promote broader research field of RRBS technology effectively.

Keywords: NGS; RRBS; Reduced Representation Bisulfite Sequencing; EA-M; WB-M

表观遗传学是指在不改变 DNA 序列的条件下所发生的可遗传基因表达的变化^[1].表观遗传学主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质结构.脊椎动物中,DNA 甲基化表现为在 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)作用下,甲基基团合成到 5'-CpG-3'中胞嘧啶的第五位碳原子上^[2].正常情况下,人类基因组“垃圾”序列的 CpG 二核苷酸相对稀少,并且总是处于甲基化状态.非甲基化的 CpG 不是均匀分布,而是呈现局部聚集倾向,形成一些 GC 含量较高、CpG 双核苷酸相对聚集的区域,即 CpG 岛^[3].与之相反,人类基因组中大小为 100~1000 bp 左右且富含 CpG 二核苷酸的 CpG 岛则总是处于未甲基化状态,并且与 56%的人类基因组编码基因相关^[4].在正常人的基因组 DNA 中,约有 3%~6%的胞嘧啶是甲基化的^[5].根据 Gardiner-Garden 等^[6]的定义,CpG 岛是一段长度不小于 200 bp、GC 含量不小于 50%、CpG 含量与期望含量之比不小于 0.6 的区域.由于该定义将一些重复片段也包含其中,Takai 和 Jones^[7]将 CpG 岛重新定义为长度不小于 500 bp、GC 含量不小于 55%、CpG 含量与期望含量之比不小于 0.65 的区域.据统计,多于 50%的基因的启动子区含有 CpG 岛^[8-9].在早期的认识中,CpG 岛都是非甲基化的,但是随着研究的不断深入,人们发现在印记基因、失活的 X 染色体^[10]甚至是正常的体细胞中都存在甲基化的 CpG 岛^[11].部分 CpG 岛的异常甲基化常常伴随着癌症等疾病的发生^[12].高通量测序技术堪称测序技术发展历程的一个里程碑,该技术可以对数百万个 DNA 分子同时进行测序.这使得对一个物种的转录组和基因组进行全景式分析成为可能,因此也称其为深度测序(Deep sequencing)^[13]或下一代测序技术(Next generation sequencing,NGS)^[14].新一代高通量测序技术使得基因组整体水平高精度的甲基化检测成为现实.目前,高通量测序技术已经广泛应用于拟南芥、人、水稻和家蚕等生物 DNA 甲基化的研究,并取得了广泛的研究成果^[15-18].

研究 DNA 甲基化的高通量测序技术方法主要

包括:全基因组重亚硫酸盐测序(Bisulfite sequencing,Bi-seq)和简化表达重亚硫酸盐测序(Reduced Representation Bisulfite Sequencing,RRBS)、甲基化 DNA 免疫共沉淀测序(Methylated DNA immuno precipitation sequencing, MeDIP-seq)、甲基化 DNA 富集结合高通量测序(Methylated DNA binding domain sequencing, MBD-Seq)等.目前,重亚硫酸盐修饰被公认为 DNA 甲基化检测的“金标准”.Bi-seq 和 RRBS 技术均是基于上述修饰.全基因组 Bisulfite 测序技术可以得到单碱基分辨率的全基因组甲基化图谱.这一技术最初被 Cokus 等^[15]应用在植物拟南芥的全基因甲基化图谱分析上(借助了 Solexa 测序技术).2009 年 Lister 等^[19]利用全基因组 Bisulfite 测序发表了第一篇人类的全基因组甲基化图谱(利用了 Solexa 测序),随后该技术开始在人类疾病,如肥胖症的研究中得以应用^[20].基于对黄种人的外周血单核细胞 DNA 样品进行 Bisulfite 处理后,结合 Solexa 测序技术进行深度测序,2010 年 Li 等^[21]成功绘制出了“炎黄一号”高精度度的全基因组甲基化图谱.然而,重亚硫酸盐转化全基因组法高昂的测序成本,在一定程度上限制了该技术的广泛应用.

简化表达亚硫酸盐测序(RRBS),又称基于酶切消化的重亚硫酸盐测序,是一种简便、高效、经济的 DNA 甲基化研究方法,通过酶切富集启动子及 CpG 岛区域,并进行 Bisulfite 测序,同时实现 DNA 甲基化状态检测的高分辨率和测序数据的高利用率.2005 年 Meissner 等^[22]最初结合 Sanger 测序发明了该项技术,并将其成功应用于鼠胚胎干细胞去甲基转移酶前后的甲基化谱的检测.接着 Meissner 领导的研究小组通过改用 MspI 酶切来富集小鼠全基因组近 90%的 CpG 岛片段,结合 Illumina 公司的高通量测序技术,建立并完善了适用于哺乳动物全基因组甲基化测序分析的方法^[23].2010 年该课题组又发表了一篇关于 RRBS 的文章,在其先前的工作基础上进一步优化 RRBS 技术并挖掘其在临床应用上的潜力^[24].2012 年华大基因研究院与深圳大

学、中山大学及华南科技大学合作发表了 RRBS 与 Bisulfite 测序的比较方法学文章^[25]。Wang 等^[26]发现双酶切(MspI, ApeKI) 可以提高 RRBS 建库成功率,并且提高覆盖率。

目前 RRBS 构建测序文库时所需 DNA 出发量一般大于 100 ng^[27],某些样本甚至需要到达1 μg 以上^[28-29]。然而很多情况下实验样本很珍贵,如 FFPE 样本或者单细胞样本,这样对 RRBS 建库的要求和难度都大幅度提高,目前对于少于 100 ng 的样本进行 RRBS 建库缺乏有效的技术方法,本实验对从微量 DNA 样品出发构建 RRBS 文库进行了较为细致的研究,并试图找出并建立一种更简便高效的方法。这对于拓宽简化甲基化测序的应用领域有着重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所使用的 gDNA 来源为实验室自传代人类红白血病细胞系 K562 细胞,细胞采用悬浮培养至密度 80%(K562 细胞作为一种常见的研究用细胞系,具有一定代表性,并为保证细胞状态最佳,所以将细胞培养至密度 80% 左右。),培养皿大小 100 mm,培养基选用 DMEM+10%FBS(胎牛血清),为保证 gDNA 来源保持一致,本实验所用 DNA 采用一次性提取 3 个培养皿的混合 K562 细胞所得。

本实验中,用于验证 WB-Method 可靠性的人源样本来源于 3 位志愿者,常量样本采用静脉血 200 μL,微量样本采用少量口腔上皮细胞(为验证 WB-M 方案应用至真实人源样本的可靠性,所以验证实验采用志愿者自采集样本。)

1.2 gDNA 提取

gDNA 提取方法采用蛋白酶 K 消化法,将细胞收集至 15 mL 离心管中,加入 3 mL PBS 缓冲液重悬细胞后,依次加入 500 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL)、7 mL 裂解液(SDS、EDTA、Tris-HCl),放置 56 ℃ 孵育 4 h 后,1 : 1(V/V)加入酚氯仿异戊醇(25 : 24 : 1)溶液,充分混匀后离心取上清,再按 1 : 1 加入氯仿异戊醇(24 : 1)溶液,充分混匀后离心取上清,加入 0.8 倍体积异丙醇(-20 ℃ 预冷)充分混匀后,可见白色团状沉淀,使用枪头将沉淀捞出,并使用 70%乙醇漂洗沉淀 2 次,干燥挥发乙醇3 min后,使用 Qiagen EB Buffer 溶解沉淀。提取的 DNA 采用 Qubit, NanoDrop 和电泳进行质检。

静脉血 gDNA 提取方法使用 QiaAmp Blood Mini Kit,按照操作手册进行 DNA 提取,大致方法如下:

将200 μL 静脉血置于冰水混合物中融化后加入 20 μL蛋白酶 K 和600 μL AL缓冲液,混匀后置于 56 ℃ 水浴 15~30 min,裂解产物加入 1 倍体积乙醇充分混匀后过离心柱,所有产物过离心柱后依次加入 AW1、AW2 缓冲液洗涤离心柱 2 次,空气干燥 2~3 min,加入 AE 缓冲液洗脱 DNA,提取的 DNA 采用 Qubit, NanoDrop 和电泳进行质检。

1.3 MspI 酶切条件优化

本实验使用 MspI 限制性内切酶(NEB, 20 U/μL)对 gDNA 进行酶切处理(因 MspI 酶切位点 CCGG 与人类 CpG Island 序列相似,并且该酶对甲基化区域不敏感,可以最大限度的富集 CpG Island 区域。),得到有效的简化末端。因 MspI 酶对温度不敏感,所以工作中只对 MspI 酶的用量和酶切时间进行条件优化实验。优化实验材料使用 8 μg gDNA 均分为 7 份,保证每份 gDNA > 1 μg,分别对每份 gDNA,在 37 ℃ 下采用不同时间和不同酶用量进行酶切,酶切体积 50 μL,酶切完成后,65 ℃ 变性 20 min,取 25 μL 酶切产物加入 6X Loading Dye 5 μL,点 2% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 2 h 检测酶切效率并回收相应片段。

1.4 片段大小筛选方法优化

片段大小筛选采用 2 种方法进行,分别是琼脂糖凝胶电泳(加入 Carrier DNA)(本实验中所用的 Carrier DNA 为完全未甲基化的大肠杆菌 DNA, unmethylation DNA, Promega)和磁珠两步法筛选。

琼脂糖凝胶电泳(加入 Carrier DNA)方案,采用 1 μg gDNA MspI 酶切后并进行补平和连接测序接头所得的连接产物为材料, Carrier DNA 采用 unmethylation DNA (Promega) covaris 打断至 150~300 bp,在连接产物中加入 200 ng,不加入 Carrier DNA 的做为对照,进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 2h检测加入 CarrierDNA 的效果。

磁珠两步法筛选大小方案,方案原理基于 AMPureXP Beads 对 PEG(MW 6 000)的终浓度敏感,从而影响结合 DNA 片段大小。本实验采用 1 μg gDNA covaris 打断至 100~700 bp 作为材料,不同 PEG 浓度进行片段大小筛选,并采用 2% 琼脂糖凝胶电泳和 BioAnalyzer 2100(毛细管电泳)进行片段大小检测。

1.5 常规 RRBS 建库方法

常规 RRBS 建库方法 (Conventional Method, CO-M)(见图 1(a)),采用 1 μg, 100 ng, 50 ng, 10 ng gDNA,加 1 μL (20 U/μL) MspI(以下所有使用酶试剂及酶反应 buffer,均使用 NEB 来源,除特殊标注外)酶切 37 ℃ 0.5 h,加入末端修复反应试剂(10×

Ligase Buffer 10 μL , 10 nM dNTPs 4 μL , 10 mM ATP 2.5 μL , T4 DNA Polymerase (3 U/ μL) 5 μL , T4 PNK (10 U/ μL) 5 μL , Klenow Large Fragment (5 U/ μL) 1 μL ,并补水至 100 μL ,20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,产物用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化并洗脱至 30 μL ,加入末端加 A 反应试剂 (10mmol/L dATP 5 μL , Klenow Buffer 5 μL , 5 U/ μL Klenow *exo*-3 μL), 补水至 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,产物用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化并洗脱至 30 μL ,加入测序接头连接反应试剂 (甲基化处理的测序接头 (Illumina) 1 μL , T4 ligase (10 U/ μL) 3 μL , 10 $\times$ T4 ligase buffer 5 μL), 加水补充至 50 μL , 22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,连接产物使用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化并洗脱至 75 μL ,重亚硫酸盐 CT 转化采用 Zymo Gold Methylation Kit (Zymo Research),操作根据试剂盒说明书并将产物纯化至 20 μL ,加入 6 $\times$ loading dye (Life Technologies) 4 μL , 2% 琼脂糖凝胶电泳回收 150~350 bp 片段,胶回收采用 QiaAmp MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen),回收至 20 μL 。加入文库扩增试剂 (Illumina Primer Mix 5 μL , 2 $\times$ KAPA uracil+ PCR Ready Mix (KAPA Biosystem) 20 μL ,反应程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) (1 μg DNA 起始采用 10 个循环, 100 ng DNA 及以下采用 15 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min), 得到的 PCR 产物采用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化至 20 μL , Qubit 测定文库浓度, BioAnalyzer 2100 (Agilent) 检测文库片段分布。

1.6 EA 一步 RRBS 建库方法

EA 一步建库方法 (EA Method, EA-M) (见图 1(b)), 采用 100 ng, 50 ng, 10 ng gDNA, 加 MspI (以下所有使用酶试剂及酶反应 buffer, 均使用 NEB 来源, 除特殊标注外) 1 μL 酶切 37 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 h, 加入末端修复反应试剂 (10 $\times$ Ligase Buffer 2.5 μL , 10 nmol/L dNTPs 1 μL , 10 mmol/L ATP 2.5 μL , T4 DNA Polymerase (3 U/ μL) 2.5 μL , T4 PNK (10 U/ μL) 2.5 μL , Taq Polymerase (10 U/ μL) 1 μL), 补水至 25 μL , 12 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 产物不纯化, 直接加入测序接头连接反应试剂 (甲基化处理后的测序接头 (Illumina) 1 μL , T4 ligase 3 μL , T4 ligase buffer 1 μL , 加水补充至 35 μL), 22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 连接产物使用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化并洗脱至 75 μL , 重亚硫酸盐 CT 转化采用 Zymo Gold Methylation Kit (Zymo Research), 操作根据试剂盒说明书并将产物纯化至 20 μL , 加入 6 $\times$ loading dye

(Life Technologies) 4 μL , 2% 琼脂糖凝胶电泳回收 150~350 bp 片段, 胶回收采用 QiaAmp MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen), 回收至 20 μL 。加入文库扩增试剂 (Illumina Primer Mix 5 μL , 2 $\times$ KAPA uracil+ PCR Ready Mix (KAPA Biosystem) 20 μL , 反应程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) (1 μg DNA 起始采用 10 个循环, 100 ng DNA 及以下采用 15 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min), 得到的 PCR 产物采用 QiaAmp MinElute PCR Kit (Qiagen) 进行纯化至 20 μL , Qubit 测定文库浓度, BioAnalyzer 2100 (Agilent) 检测文库片段分布。

1.7 磁珠包被 RRBS 建库方法

磁珠包被 RRBS 建库方法 (WB Method, WB-M) (见图 1(c)), 采用 100 ng, 50 ng, 10 ng gDNA, 加 1 μL MspI 酶 (以下所有使用酶试剂及酶反应 buffer, 均使用 NEB 来源, 除特殊标注外) 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜, 加入末端修复试剂 (10 $\times$ Ligase Buffer 10 μL , 10 nmol/L dNTPs 4 μL , 10 mmol/L ATP 2.5 μL , T4 DNA Polymerase (3 U/ μL) 5 μL , T4 PNK (10 U/ μL) 5 μL , Klenow Large Fragment (5 U/ μL) 1 μL), 补水至 100 μL , 20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 产物用 150 μL Ampure XP Beads (Beckman) 纯化, 纯化步骤按照 AmpureXP Beads 说明书进行至挥发晾干残留乙醇, 加 EB Buffer (Qiagen) 37 μL , 室温放置 1 min, 无需去除磁珠, 直接加入末端加 A 反应试剂 (10 mmol/L dATP 5 μL , Klenow Buffer 5 μL , 5 U/ μL Klenow *exo*-3 μL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 产物加入 PEG/NaCl (20% PEG8000 (Sigma), 9% NaCl (Sigma)) 溶液 50 μL , 重悬磁珠, 并按照 AmPureXP Beads 说明书进行至挥发晾干残留乙醇, 加 EB Buffer (Qiagen) 41 μL , 室温放置 1 min, 无需去除磁珠, 加入测序接头连接反应试剂 (甲基化处理后的测序接头 (Illumina) 1 μL , T4 ligase (10 U/ μL) 3 μL , T4 ligase buffer 5 μL), 加水补充至 50 μL , 22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 产物加入 PEG/NaCl (20% PEG8000, 9% NaCl) 溶液 50 μL , 重悬磁珠, 并按照 AmPureXP Beads 说明书进行至挥发晾干残留乙醇, 加 EB Buffer (Qiagen) 75 μL , 室温放置 1 min, 无需去除磁珠, 重亚硫酸盐 CT 转化采用 Zymo Gold Methylation Kit 并纯化至 20 μL (本步骤使用 Zymo 试剂盒自带纯化柱, 将磁珠去除), 产物采用 AmpureXP Beads 二步筛选法筛选片段大小至 150~350 bp 之间, 采用 EB Buffer 洗脱至 20 μL , 加入文库扩增反应试剂 (Illumina Primer Mix 5 μL , 2 $\times$ KAPA uracil+ PCR Ready Mix (KAPA Biosystem) 20 μL , 反应程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) (1 μg DNA 起始采用 10 个

循环,100 ng DNA 及以下采用 15 个循环),72 ℃ 4 min),得到的 PCR 产物采用 AmpureXP Beads 进行

纯化至 20 μL,Qubit 测定文库浓度,BioAnalyzer 2100 检测文库片段分布。

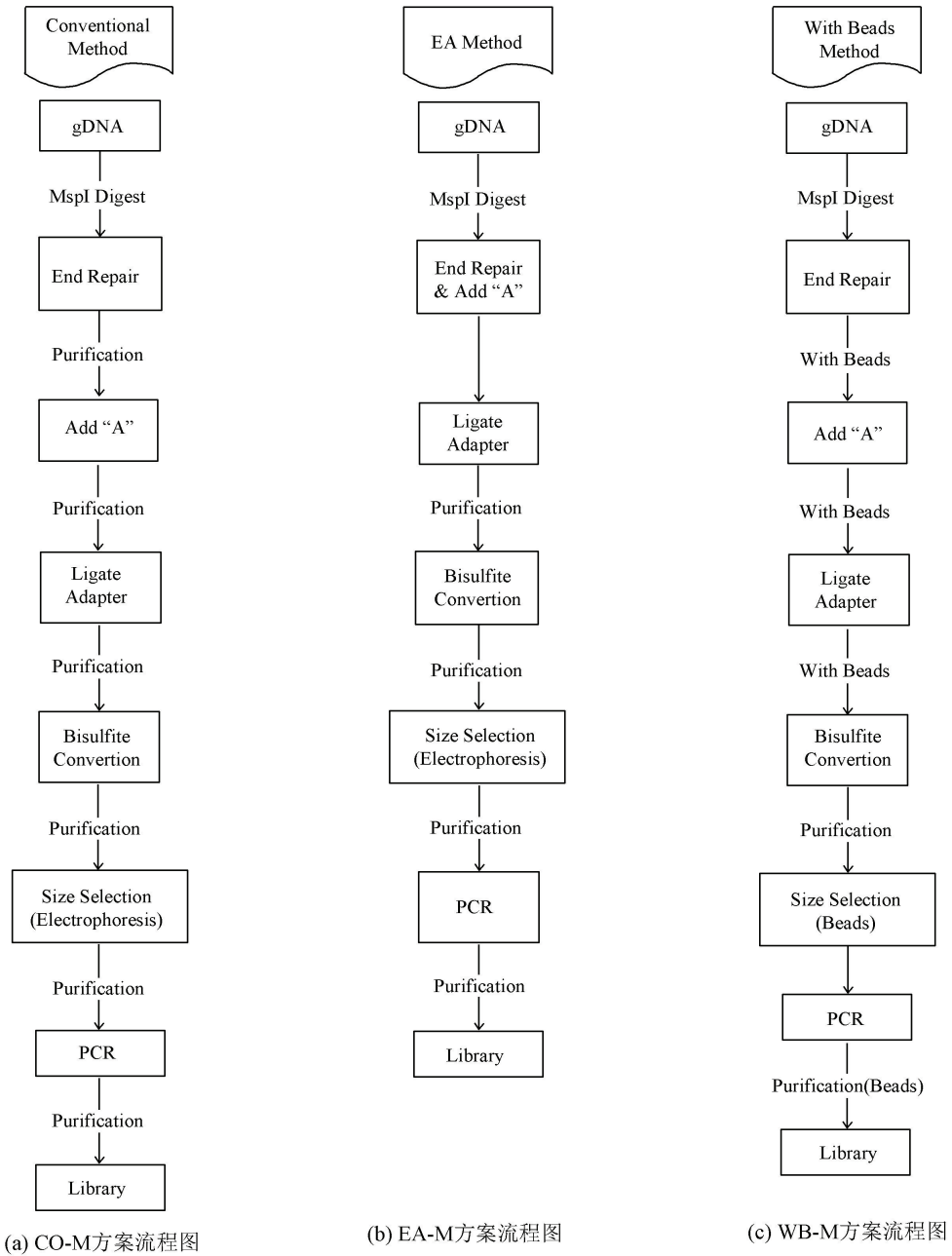


图 1 三种 RRBS 文库构建方法流程图

Fig.1 Three methods for RRBS library construction

1.8 WB-Method 验证实验

本实验使用人来源样本 3 例,采用 WB-Method 分别进行微量(10 ng)RRBS 和常量(1 μg)RRBS 文库构建,并使用 Illumina Hiseq 3000 平台进行高通量测序,每个样本测序 20 mol/L reads 以上。生物信息分析使用 Trim_galore 进行低质量(Q<20)数据过滤和去重,bismark 进行序列比对,参考基因组选用人类基因组 hg19,并对甲基化频率分布、甲基化覆盖度、3 种 context(CpG、CHG、CHH)下 C 碱基甲基化比例进行统计。

2 结果

2.1 gDNA 提取及质量测定

gDNA 提取方法采用经典 PK 法(细胞和组织样本),全血采用 QiaAmp 使用 Blood Mini Kit,Qubit 测定浓度并计算 K562 gDNA 总量为386 μg(Qubit 2.0 HSDNA Assay),Nanodrop 2000 检测 gDNA 纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.91,OD₂₆₀/OD₂₃₀ = 2.12),0.6% 琼脂糖凝胶检测 gDNA 纯度,电泳条带清晰单一,无降

解拖尾条带,片段均在40 kb以上(见图2)。人来源的每个常量样本均获得 2 μg 以上 DNA ($OD_{260}/OD_{280} = 1.94, OD_{260}/OD_{230} = 2.08$),微量样本获得

100 ng以上 DNA ($OD_{260}/OD_{280} = 1.90, OD_{260}/OD_{230} = 2.16$),纯度均符合质检标准($1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0, OD_{260}/OD_{230} > 2.0$)。

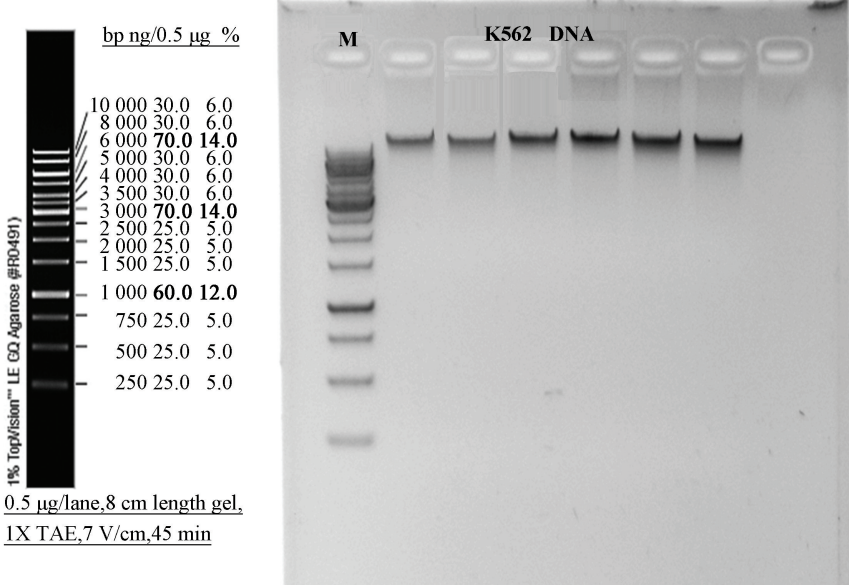


图2 基因组 DNA 电泳质量检测
Fig.2 gDNA electrophoresis

2.2 MspI 酶切条件优化

本实验提及的 3 种 RRBS 文库构建方法都需要使用 MspI 酶切富集 CpG Island 位点,所以需要优化 MspI 酶切条件,酶切条件选用 37 ℃ 做为酶切温度,选择酶切时间 1 h 设置酶用量 10 U,20 U,40 U,再根据 MspI 的酶切特性,选择 10 U 的酶活设置酶切时间条件为 0.5 h,1.0 h,2.0 h,4.0 h,O/N(16 h)。通过电泳图(见图3)可以看到,酶用量加大和酶切时间延长并不能让 MspI 的酶切效率提高,所以从时间和成本的角度出发,酶切条件使用 10 U,0.5 h,酶切温度 37 ℃,这里需要说明,10 U 的酶切用量已经可以将 1 μg DNA 酶切完整,所以本课题所用 100 ng DNA 使用 10 U,0.5 h,37 ℃ 的酶切条件完全可以消化完全。

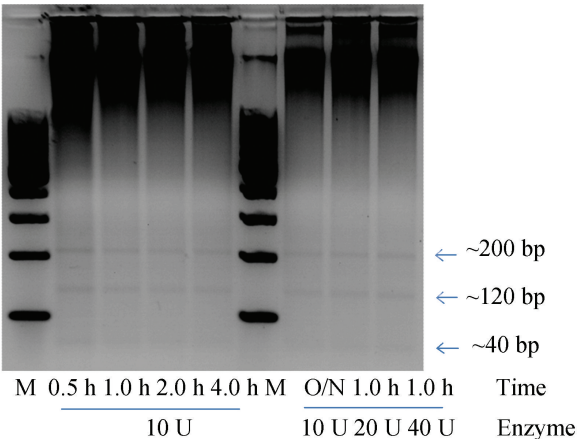


图3 MspI 酶切条件优化电泳检测
Fig.3 MspI digest condition optimization

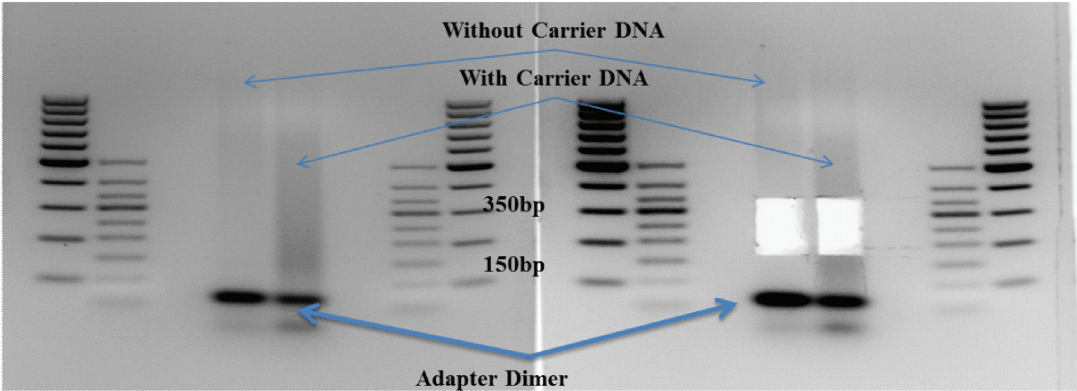
2.3 片段大小筛选方法优化

二代测序仪在测序时需要进行成簇反应(Cluster Generation),成簇反应对 DNA 片段长度有一定要求,根据 Illumina 官方解释,正常情况下,成簇反应需求 DNA 片段长度在 200~500 bp 之间,所以文库片段过大或过小都会影响成簇反应进行,这也使得筛选合适的 DNA 片段大小成为文库构建中不可缺少的一步。另外,片段筛选的另一个作用是去除接头二聚体,接头二聚体对测序质量会造成极大影响,据统计,5%的测序接头二聚体含量会导致最终数据 50% 的损失。片段筛选最常见的方法是琼脂糖凝胶电泳,本课题因起始 DNA 量很少,导致连接反应的产物在琼脂糖凝胶上基本不能显现,导致切胶时容易误判并且胶回收效率降低,所以本文采用了加入 Carrier DNA 的方式提高辨识度 and 胶回收效率,由于在片段大小筛选前,已经使用重亚硫酸盐处理过连接产物,Carrier DNA 因不含测序扩增接头序列,在最终的 PCR 扩增中不会被扩增,所以不会影响最终的测序结果。本实验采用加入 Carrier DNA 和未加入 Carrier DNA 进行对照实验,主要比较在琼脂糖凝胶(见图4(a))上的可辨识度,图上可以很清楚的加入 Carrier DNA 的目的电泳片段区域(150~350 bp)较未加入 Carrier DNA 的目的电泳片段区域清晰,切胶时可以明显的将接头二聚体与目的序列分开,有效提高辨识度并且在胶回收过程中,提高了回收效率,且

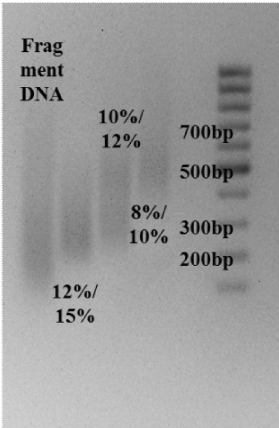
Carrier DNA 可以填补硅胶柱中的死体积,从而达到提高回收效率的目的。

使用加入 Carrier DNA 的方法可以提高胶回收的得率,但微量 DNA 通过琼脂糖凝胶后的损失率仍然可达到 50% 以上,为了进一步减少损失,采用了羧基磁珠(Ampure XP Beads)进行文库大小筛选,筛选原理是因羧基磁珠在 PEG 的影响下,结合 DNA 的能力会产生变化,PEG 含量越高,磁珠可结合的片段就越多,从片段大小上来看,能结合的小片段就越多,使用不同浓度的 PEG 对打断后的 DNA 进行筛

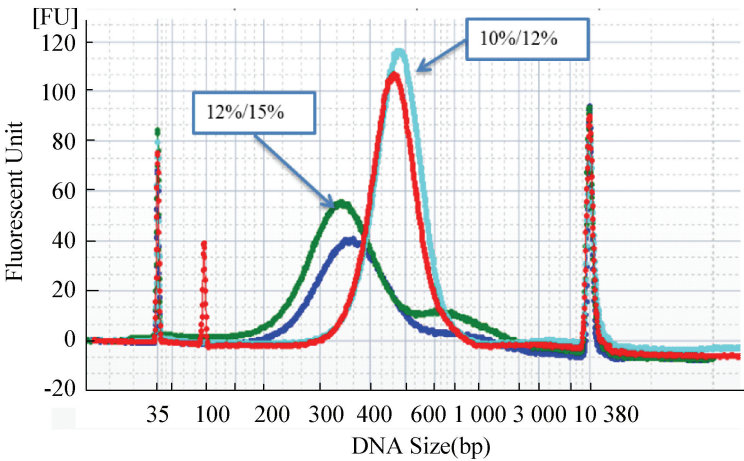
选,并使用琼脂糖凝胶电泳检测分布(见图 4(b)),由图中可以看到,12%~15%的 PEG 浓度已经可以满足 RRBS 文库构建的需要,为验证该方案的可重复性,继续设计优化实验如下:取 1 μ g Fragment DNA (200~600 bp),分别用 12%/15%筛选和 10%/12%筛选,并采用 BioAnalyzer 进行片段大小分析,做1个重复(见图 4(c)),从 2 100 检测图种可以看到,12%/15%可用于 RRBS 文库构建中的片段大小筛选,与琼脂糖凝胶分离切胶方法相比,得率和稳定性有较大提高(见图 4(c))。



(a) Carrier DNA掺入效果比较凝胶电泳图



(b) 不同浓度PEG筛选DNA片段凝胶电泳图



(c) 不同浓度PEG筛选DNA片段2100图

图 4 片段大小筛选方法优化
Fig.4 Size Selection Optimization

2.4 EA Method 与 Conventional Method 比较

EA Method(EA-M)方案主要是将 CO-M 中的末端修复及 3'端加 dA 合并成一步,并且在做完末端修复和 3'端加 dA 之后,直接加入 T4 ligase,减少了其中 2 步纯化步骤,从而减少 DNA 损失。该方法可以将末端修复及 3'端加 dA 步骤合并使用了 Taq Polymerase 在 72 ℃下可以在 3'端加 dA 的特性,将 Taq Polymerase 加入到末端修复的体系中即可实现 3'端加 dA 的目的,并且将这一步的 buffer 替换成 T4 DNA Ligase Buffer,这就使得在进行下一步连接

操作时,不需进行纯化。本实验使用 100 ng,50 ng,10 ng gDNA,每个实验组设置 3 个重复,共 9 个样本,分别使用 CO-M 和 EA-M 进行 RRBS 文库构建,本实验中 PCR 控制 12 个循环数,并使用 Qubit 测定并统计比较 2 种方法的文库总量(见图 5(a)),CO-M法在处理 10 ng,50 ng gDNA 时文库构建失败,在处理 100 ng DNA 时 3 个样本的其中 1 个失败,2 个样本得率很低,EA-M法在处理 10 ng DNA 时得率很低,文库质量差,处理 50 ng,100 ng DNA 时已能得到很好的结果。

本实验使用 1 μ g gDNA 起始CO-M进行 RRBS 文库构建作为文库合格的阳性参照,该阳性参照使用 Qubit 测定文库浓度并计算总量为 151.2 ng,并使用 BioAnalyzer 2100 分别测定阳性文库(见图 5(b))和 EA-M 构建的文库(见图 5(c)),使用EA-M法构建的 RRBS 文库与阳性对照文库相比,

大小均分布在 200 ~ 550 之间,没有接头二聚体 (Adapter dimer), 图中看到 BioAnalyzer2100 (Agilent) 检测出的峰不呈现良好的正态分布,是因 RRBS 文库构建中 DNA 片段化使用 MspI 酶切产生的酶切末端导致,不会对后续测序结果产生任何影响。

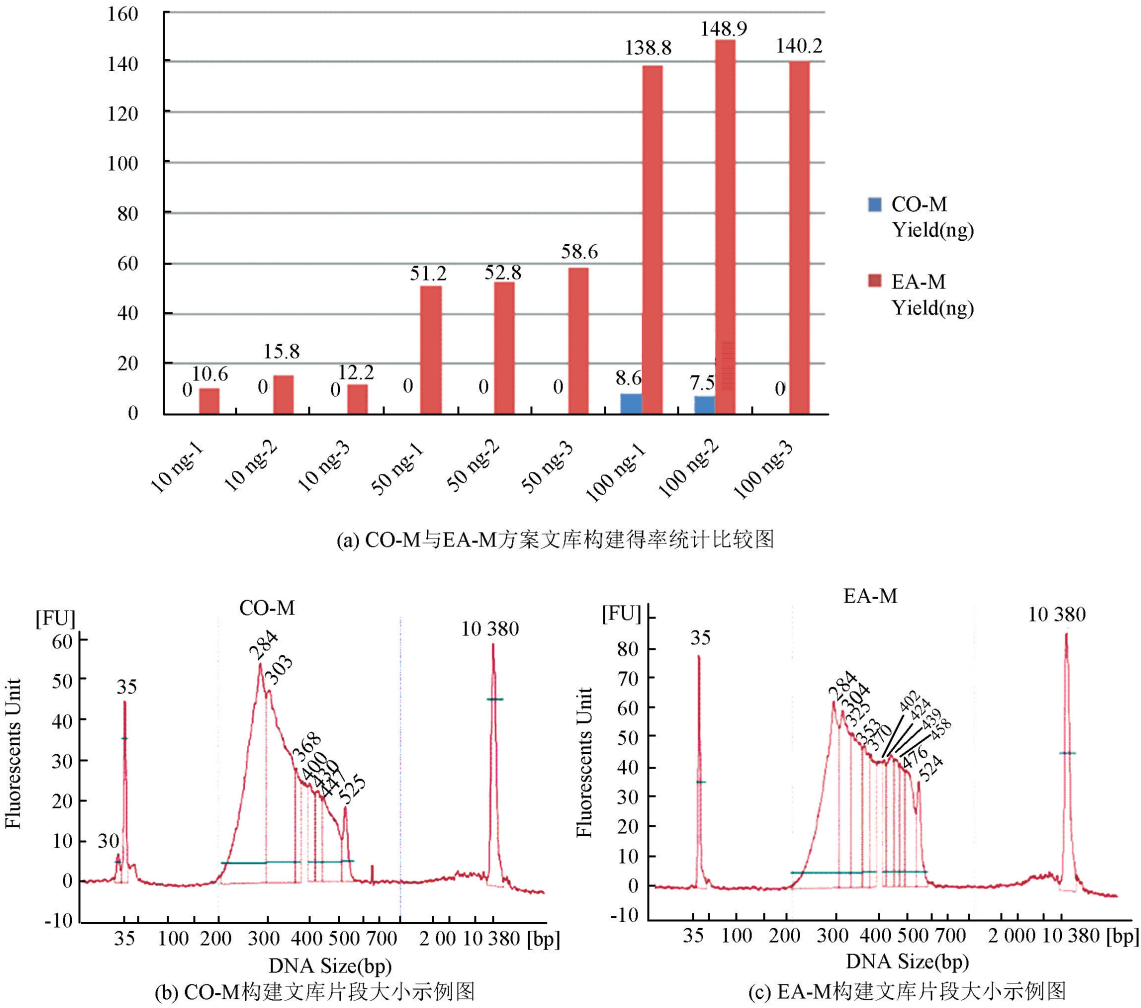


图 5 EA-M 与 CO-M 构建 RRBS 文库比较*

Fig.5 EA-M vs CO-M

* 注:(a): EA-M 和 CO-M 构建 RRBS 文库,DNA 起始分别使用 10 ng,50 ng,100 ng,蓝色 * 标注使用 CO-M 建库,红色 * 标注使用 EA-M 建库;(b): CO-M 文库大小分布;(c): EA-M 文库大小分布。

彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn.ch/login.aspx>) (2017 年第 1 期 doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2017.01.201609001)。

2.5 EA Method 稳定性测试

根据 EA Method 与 Conventional Method 比较试验的结果,发现 EA Method 在处理 50 ng DNA 起始量时,已经有很好的效果。为了进一步测试 EA Method 的稳定性,将 600 ng gDNA 平均分成 12 份(每份 50 ng),采用 EA Method 进行 RRBS 文库构建,使用 Qubit 测定文库得率并统计 CV(见图 6),发现 EA Method 在处理 50 ng DNA 进行 RRBS 文库构建时,成功率高,文库产出也很稳定(CV<0.05)。

2.6 WB Method 与 EA Method 比较

由上述研究可以看出,EA-M 法对于微量样本的处理已初具优势,但因为需要进行切胶和多次 DNA 转移导致处理 50 ng 以下的样本仍比较困难,为了能进一步降低 DNA 出发量和优化文库质量,在磁珠筛选文库大小方案的启发下,建立了全程将 DNA 与磁珠包被的文库构建方案,该方案的优势在于,DNA 全程与磁珠结合,大大减少 DNA 转移的次数,提高最终有效文库得率。该方案与 CO-M 法的步骤基本相

同,但在所有的酶反应中,DNA 都与磁珠结合在一起进行孵育,纯化方案中,采用 PEG Buffer 进行结合和洗脱,在连接反应前,使用的 PEG 浓度均为 20%,连接反应中采用 12%/15%进行洗脱,本实验采用了 EA-M 法作为对照,分别取 10 ng,50 ng,100 ng 做 2 组重复,RRBS 文库构建完成后,Qubit 进行测定并统计比较 2

种方法的文库得率(见图 7(a)),BioAnalyzer 2100 分别随机抽取 2 种方法中的 1 个文库进行文库片段大小测定(见图 7(b),7(c)),发现 WB-M 法在处理更微量 DNA 样本上比 EA 有更大的改善,基本可以达到 3 倍左右的文库总量,并且得到的文库范围与 EA 法有高度一致性(见图 7(a)~图 7(c))。

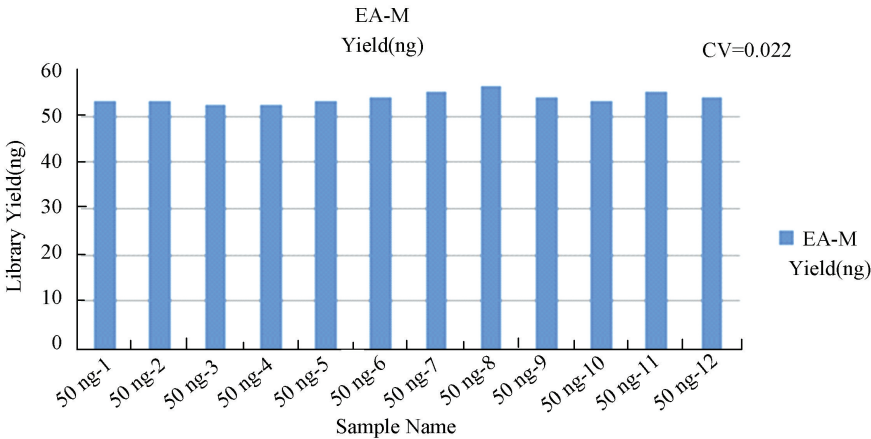
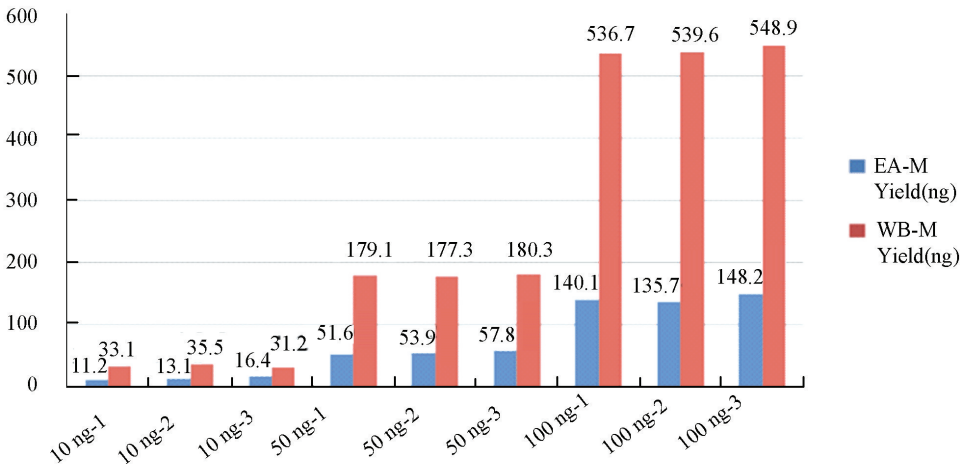
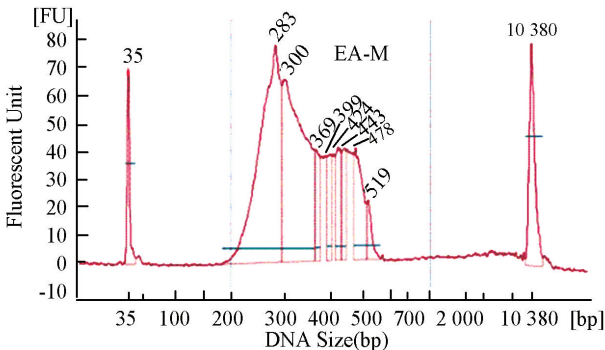


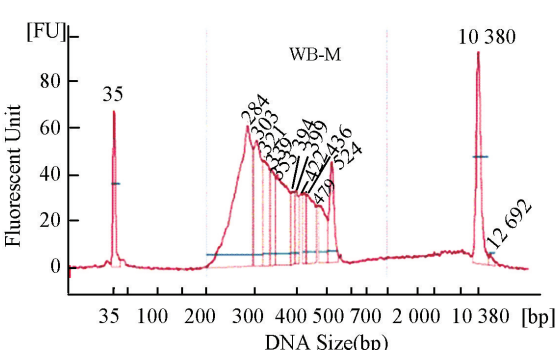
图 6 EA 方案稳定性测试
Fig.6 EA Method stability test



(a) EA-M与WB-M方案文库构建得率统计比较图



(b) EA-M与WB-M方案文库构建得率统计比较图



(c) EA-M与WB-M方案文库构建得率统计比较图

图 7 WB-M 与 EA-M 构建 RRBS 文库比较*

Fig.7 WB-M vs EA-M

* 注:(a) : EA-M 和 CO-M 构建 RRBS 文库,DNA 起始分别使用 10 ng,50 ng,100 ng,蓝色 * 标注使用 CO-M 建库,红色 * 标注使用 EA-M 建库;(b) : CO-M 文库大小分布;(c) : EA-M 文库大小分布。

彩图见电子版(<http://swxxx.alljournals.cn.ch/login.aspx>)(2017 年第 1 期 doi : 10.3969/j.issn.1672-5565.2017.01.201609001)。

2.7 WB Method 稳定性测试

根据 WB Method 与 EA Method 比较试验的结果,发现 WB Method 在处理 10 ng gDNA 起始量时,也有较为满意的结果。为了进一步测试 WB Method 的稳定性,将 120 ng gDNA 均分成 12 份样本(每份

10 ng),采用 WB Method 进行 RRBS 文库构建,使用 Qubit 测定文库得率并统计 CV,发现 WB Method 在处理 10ng DNA 进行 RRBS 文库构建时,成功率高,文库产出也很稳定($CV<0.05$)(见图 8)。

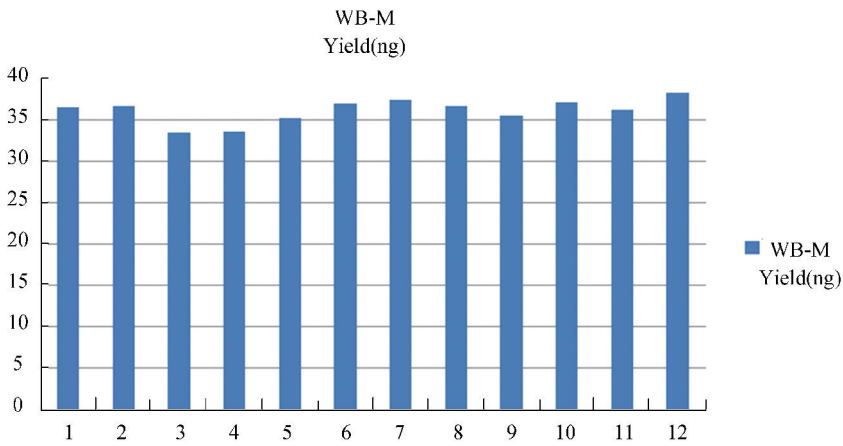


图 8 WB 方案稳定性测试
Fig.8 WB Method stability test

2.8 WB-M 验证实验

使用 WB-M 对 3 个人来源样本分别进行常量 (1 μ g)RRBS 和微量 (10 ng) RRBS 文库构建,并在 Illumina Hiseq3000 平台上进行 PE150 测序,每个样本至少获得 20 mol/L Reads 数据。数据使用 Trim_galore 进行数据质量 QC(见表 1),可见 3 个常量样本和 3 个对应微量样本的 QC 结果一致,得到高质量 ($Q\ Score>20$)数据后,再使用 Bismark 将数据比对至人类参考基因组(hg19 版本),可看到常量与微量对应样本数据 Unique Reads 均可达 65%(见表 1),再将得到

的 bam 文件统计各个位点甲基化位点的甲基化比例及覆盖度,并比较常量和微量样本的差异,可见从不同甲基化水平碱基分布来看,微量和常量样本均符合 RRBS 文库的特点,甲基化区域均富集在 Reads 的两头(见图 9(c),9(d)),并且覆盖 CpG 区域 2X 以上的 reads 占比 80%以上(见图 9(a),图 9(b)),两者保持了高度一致。最后统计了甲基化通常发生的 CpG, CHG,CHH 三种不同的 context 下 C 碱基的甲基化比例,其中 CpG context 最常见(见表 2),可以看到常量和微量样本的甲基化水平也保持一致。

表 1 WB 方案实验数据 QC
Table 1 WB Method Data QC Analysis

Sample ID	Total Reads (Num.)	Filtered Reads (Q Score<30) (Num.)	Remain/ %	Total Reads Pair(Num.)	Unique Mapped Reads Pair (Num.)	Mapping Efficiency/%
Hm1-10 ng	34 256 516	110 047	99.68	17 018 211	11 651 930	68.47
Hm2-10 ng	23 555 452	87 623	99.63	11 690 103	7 499 263	64.15
Hm3-10 ng	31 868 170	71 149	99.78	15 862 936	10 820 557	68.21
Hm1-1 μ g	39 004 032	82 525	99.79	19 419 491	14 134 808	72.79
Hm2-1 μ g	27 431 948	44 967	99.84	13 671 007	9 150 814	66.94
Hm3-1 μ g	26 980 010	48 779	99.82	13 441 226	9 194 982	68.41

表 2 WB 方案 CpG,CHG,CHH 中 C 碱基甲基化比例
Table 2 WB Method MethyC Content In CpG,CHG,CHH

Sample ID	CpG context	CHG context	CHH context
	Methylated Rate	Methylated Rate	Methylated Rate
Hm1-10 ng	66.40	3.40	3.20
Hm2-10 ng	69.60	4.10	3.80
Hm3-10 ng	69.80	3.60	3.20
Hm1-1 μ g	72.20	5.30	5.60
Hm2-1 μ g	70.60	4.60	4.20
Hm3-1 μ g	71.00	3.70	3.30

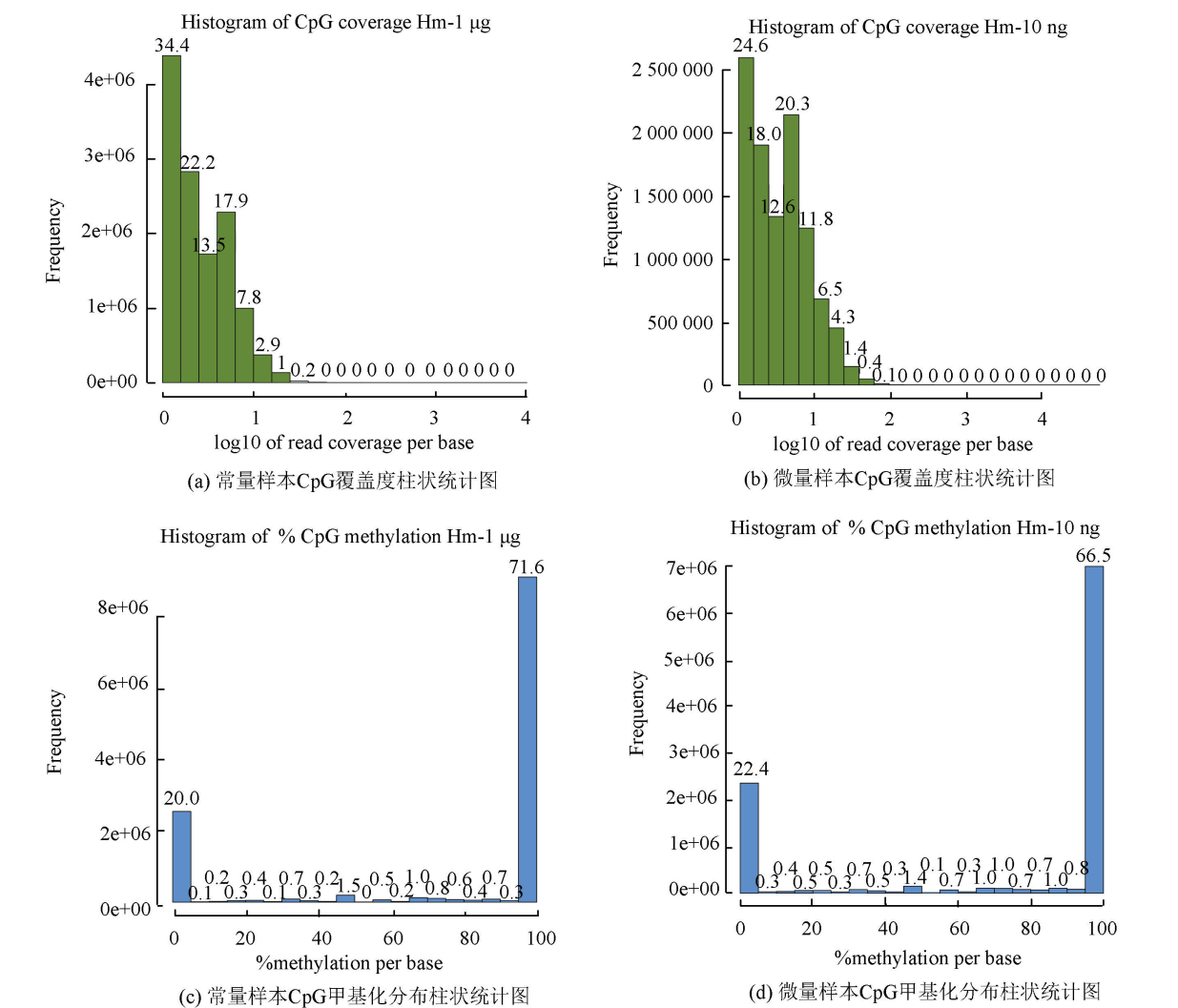


图 9 WB 方案甲基化覆盖度
Fig.9 WB method methylation base coverage

3 讨论

随着表观遗传学研究的深入,二代测序在甲基化测序中的研究方法也大幅增多,RRBS(简化甲基化)测序以经济,分辨率高的优点在人、小鼠、大鼠的甲基化研究中被高频使用。RRBS 文库是测序前样本处理的关键步骤,其中的核心问题包括:(1) RRBS 文库需要符合 *MspI* 酶切的特性;(2) RRBS 文库必须没有接头二聚体存在(约 125~128 bp);(3) 文库总量必须满足二代测序基本需求(20 ng 以上);(4) 实验方法的稳定性(可重复性)高。本研究使用的 2 种改进后的基于微量 DNA 样品的 RRBS 文库构建方法,可以很好的解决以上 4 个问题,从而满足 RRBS 文库用于后续测序的需求。首先,经过 *MspI* 酶切优化实验,确定了 *MspI* 酶的最优酶切条件,并且在最终文库中也可以明显的看到人 gDNA 被 *MspI* 酶完整酶切的特征序列,并且文库分布在

200~600 bp,有利于在测序仪上进行成簇反应(cluster generation);其次,通过片段大小筛选优化方案,切胶纯化通过加入 carrierDNA 提高胶的辨识度,从而将接头二聚体与目的片段间有效分离,磁珠筛选通过不同比例 PEG 浓度将小片段完整去除,两种方案都可以有效的将接头二聚体去除,保证后期测序数据的高质量;第三,EA-M 法通过末端修复以及加“A”反应,连接合并成一步,大大缩短了步骤,从而提高 DNA 回收效率,实现提高最终文库得率的目的,WB-M 法通过将 DNA 固定在磁珠上的方法减少 DNA 的被转移次数,从而提高最终文库总量,两种方法分别从减少步骤和减少 DNA 转移次数的角度提高了文库得率,从而实现 10~50 ng 微量 DNA 起始样品的 RRBS 文库构建;最后,分别通过 2 种方法的稳定性实验,可以看到 2 种方法的可重复性很高,成功率基本达到 100%,并且针对同一个 DNA 样本的重复性可以达到 $CV<0.05$ 的要求,表明这 2 种方法构建 RRBS 文库稳定性较好,并且 WB-M 因全

程使用磁珠纯化,适用于液体工作站上使用,在有效提高建库规模化的同时,有效减少人工参与带来的建库误差。

本研究中最关键的因素在于 DNA 起始量低,所以根据不同的 DNA 起始量,研发了 2 种方案,其中 EA-M 可以针对 50~100 ng 的微量 DNA 样品的 RRBS 文库构建,WB-M 可以针对 10~50 ng 的微量 DNA 样品的 RRBS 文库构建,然而 WB-M 方案针对 50~100 ng DNA 出发量时会有更好的效果。原因如下:(1)经过 2 个方案的比较发现,减少 DNA 转移次数可以大大降低 DNA 在建库中的损耗及损伤,DNA 被固定在磁珠上对 DNA 自身也具有一定保护作用,所以 WB-M 方案可以有效保证酶切末端,减少在建库过程中酶切末端的损伤。(2) Unique Reads Ratio(唯一不重复 Reads 比例)是二代测序数据质控中的一个重要指标,而影响该指标的因素主要是 DNA 起始量和文库构建中 PCR 的循环数。本课题研究的微量 DNA RRBS 文库构建方案,起始 DNA 样本量少成为影响该指标的制约因素,因此如何有效减少文库构建中 PCR 循环数,成为本研究中的关键因素。WB-M 可以有效减少 DNA 损耗,使最终减少 PCR 循环数变成可能,在后续实验中,发现 50 ng DNA 起始样本量可以将最终 PCR 循环次数降低至 10 次,10 ng DNA 起始可有效降低 PCR 循环数至 14 次,大大提高测序数据的有效性。经过 2 种方案的比较发现,WB-M 方法在构建微量 DNA RRBS 文库时,比 CO-M 和 EA-M 更加适合,但 EA-M 在文库构建时间上有一定优势,因为减少了纯化和反应程序,所以 EA-M 法构建 RRBS 文库比其他 2 种方法减少约 1/3 时间。另一方面,从经济角度来看,EA-M 的成本是 CO-M 的 70%左右,WB-M 的成本是 CO-M 的 77%左右,所以在进行 100 ng 左右 DNA 起始 RRBS 文库时,从时间和经济的角度上,推荐使用 EA-M 法进行文库构建,但从质量上来看,WB-M 法则更为优秀。

本研究中因偏重于人来源的微量样本研究(例如:石蜡切片,显微微切割等),所以只使用了人来源的 gDNA 样本,后期验证 WB-M(因 WB-M 方案制备的文库质量更优于 EA-M 方案,且在实际应用中 WB-M 方案更适合检测技术发展方向,所以本验证实验只验证了 WB-M 方案。)也只使用了人来源样本,并通过信息学分析可看到 WB-M 在同时处理常量样本和微量样本时,Unique Reads 均可达到 65%以上,并且可发现的 CpG context 中 C 碱基甲基化比例也保持高度一致。本研究中提及的 WB-M 已成功应用于显微微切割样本的处理。目前还未应用于

FFPE 样本的处理,从 WB-M 方案来看,可以适用于 FFPE 样本的处理,但在进行 MspI 酶切之后,应使用 UDG 和 FpG 酶对 FFPE 来源 DNA 进行 DNA 修复,从而提高文库构建的成功率。随着二代测序技术的发展,单细胞测序也广泛应用到医疗及诊断领域,如 PGD,CTCs 等,本课题研究中推荐的 WB-M 方案也可应用于单细胞领域,通过单细胞扩增技术将单个细胞 DNA 少量扩增后,使用 WB-M 方案进行微量 DNA 样品的 RRBS 文库构建,可以获得高质量的 RRBS 文库,为后续测序及生物信息分析打下坚实基础。

参考文献(References)

[1] GOLDBERG A D, ALLIS C D, BERNSTEIN E. Epigenetics: a landscape takes shape[J]. Cell, 2007, 128(4):635-638.DOI:10.1016/j.cell.2007.02.006.

[2] BIRD A P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus[J]. Trends in Genetics, 1987, 3(12):342-347. DOI: 10.1016/0168-9525(87)90294-0.

[3] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. Genes & Development, 2002, 16(1):6-21.DOI:10.1101/gad.947102.

[4] 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):101-103.

HUANG Qing, GUO Yin, FU Weiling. Human epigenome project [J]. Chemistry of Life, 2004,24(2):101-103.

[5] ESTELLER M, ALMOUZNI G. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond[J]. EMBO Reports, 2005, 6(7):624-628.DOI:10.1038/sj.embor.7400456.

[6] GARDINER G M, FROMMER M. CpG islands in vertebrate genomes[J]. Journal of Molecular Biology, 1987, 196(2):261-282. DOI: 10.1016/0022-2836(87)90689-9.

[7] TAKAI D, JONES P A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(6):3740-3745. DOI: 10.1073/pnas.052410099.

[8] WANG Y, LEUNG F C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers [J]. Bioinformatics, 2004, 20(7):1170-1177.DOI:10.1093/bioinformatics/bth059.

[9] LARSEN F, GUNDERSEN G, LOPEZ R, et al. CpG islands as gene markers in the human genome[J]. Genomics, 1992, 13(4):1095-1107. DOI: 10.1016/0888-7543(92)90024-M.

[10] HANSEN R S, STØGER R, WIJMEGA C, et al. Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant [J]. Human

- Molecular Genetics, 2000, 9(18):2575–2587. DOI: 10.1093/hmg/9.18.2575.
- [11] YAMADA Y, WATANABE H, MIURA F, et al. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q[J]. Genome Research, 2004, 14(2):247–266. DOI: 10.1101/gr.1351604.
- [12] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1):57–70. DOI: 10.1016/S0092–8674(00)81683–9.
- [13] SULTAN M, SCHULZ M H, RICHARD H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. Science, 2008, 321(5891):956–960. DOI: 10.1126/science.1160342.
- [14] SCHUSTER S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nature Methods, 2008, 5(1):16–18. DOI: 10.1038/nmeth1156.
- [15] COKUS S J, FENG S, ZHANG X, et al. Shotgun bisulfite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. Nature, 2008, 452(7184):215–219. DOI: 10.1038/nature06745.
- [16] LI N, YE M, LI Y, et al. Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology[J]. Methods, 2010, 52(3):203–212. DOI: 10.1016/j.jymeth.2010.04.009.
- [17] YAN H H, KIKUCHI S, NEUMANN P, et al. Genome-wide mapping of cytosine methylation revealed dynamic DNA methylation patterns associated with genes and centromeres in rice[J]. Plant Journal, 2010, 63(3):353–365. DOI: 10.1111/j.1365–313X.2010.04246.x.
- [18] XIANG H, ZHU J, CHEN Q, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5):516–520. DOI: 10.1038/nbt.1626.
- [19] LISTER R, PELIZZOLA M, DOWEN RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences[J]. Nature, 2009, 462(7271):315–322. DOI: 10.1038/nature08514.
- [20] TURCOT V, BOUCHARD L, FAUCHER G, et al. DPP4 gene DNA methylation in the omentum is associated with its gene expression and plasma lipid profile in severe obesity[J]. Obesity, 2011, 19(2):388–95. DOI: 10.1038/oby.2010.198.
- [21] LI Y, ZHU J, TIAN G, et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells[J]. PLoS Biology, 2010, 8(11):e1000533. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000533.
- [22] MEISSNER A, GNIRKE A, BELL G W, et al. Reduced representation Bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(18):5868–5877. DOI: 10.1093/nar/gki901.
- [23] SMITH Z D, GU H C, BOCK C, et al. High-throughput Bisulfite sequencing in mammalian genomes[J]. Methods, 2009, 48(3):226–232. DOI: 10.1016/j.jymeth.2009.05.003.
- [24] GU H C, BOCK C, MIKKELSEN T S, et al. Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution[J]. Nature Methods, 2010, 7(2):133–136. DOI: 10.1038/nmeth.1414.
- [25] WANG L, SUN J, WU H, et al. Systematic assessment of reduced representation Bisulfite sequencing to human blood samples: A promising method for large-sample-scale epigenomic studies[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1):1–6. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.034.
- [26] WANG J, XIA Y, LI L, et al. Double restriction-enzyme digestion improves the coverage and accuracy of genome-wide CpG methylation profiling by reduced representation Bisulfite sequencing[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):1–12. DOI: 10.1186/1471–2164–14–11.
- [27] CHRISTOPH B, ELENI M T, ARIE B B, et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies[J]. Nature biotechnology, 2010, 28(10):1106–1114. DOI: 10.1038/nbt.1681.
- [28] GU H, SMITH Z D, BOCK C, et al. Preparation of reduced representation Bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling[J]. Nature Protocol, 2011, 6(4):468–481. DOI: 10.1038/nprot.2010.190.
- [29] MAXIMILIAAN S, ANJA S, LOBS A K, et al. Laser capture microdissection-reduced representation Bisulfite sequencing (LCM-RRBS) maps changes in DNA methylation associated with gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the mouse[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(11):249–274. DOI: 10.1093/nar/gkt230.