

· 述评 ·

DNA 甲基化定量检测的新方法: 甲基化敏感性高分辨率熔解分析

关明

【摘要】 DNA 甲基化被认为是新一代的肿瘤标志, 其对肿瘤风险评估、早期诊断以及肿瘤预后都有极其重要的诊断价值, MS-HRM 方法是一种新的定量检测甲基化的方法, 它是基于亚硫酸盐对 DNA 进行修饰后具有不同的碱基构成, 导致甲基化和非甲基化模板扩增后的产物热稳定性不同而进行检测。本文阐述了该方法在肿瘤和遗传性疾病检测中的应用及优点, 并对其在临床分子检测中的应用前景进行了展望。

【关键词】 DNA 甲基化; 聚合酶链反应; 分子诊断技术

A new approach for quantitative assessment of DNA methylation: methylation-sensitive high resolution melting GUAN Ming. Department of Laboratory Medicine, Huashan Hospital, Institute of Molecular and Translational Medicine Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Methylated DNA is considered as a new generation of tumor biomarker. It shows great value for evaluation of cancer risk, early detection and predicting prognosis. MS-HRM is a novel approach for quantitative assessment of methylation. It is based on the different base compositions after PCR amplification of bisulfite-modified DNA template, which give rise to different thermal properties of the PCR products originating from methylated or unmethylated target template. This article describes the advantages of this method and its role in the detection of cancer and inherit disease. The prospective application in the molecular diagnosis is also suggested.

【Key words】 DNA methylation; Polymerase chain reaction; Molecular diagnostic techniques

DNA 甲基化属于表观遗传学范畴, 它是一种表观遗传 (epigenetic) 修饰^[1], 在 DNA 甲基转移酶催化下, 利用 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基, 将胞嘧啶的第 5 位碳原子甲基化, 从而使胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶^[2]。在哺乳动物基因组中, DNA 甲基化的主要位点是 CpG 二核苷酸, 它在基因组中呈不均匀分布。

DNA 甲基化同众多疾病的发生与发展密切相关, 比如 2 型糖尿病、自身免疫性疾病以及各种癌症, 特别是对癌症而言, 其发生过程中癌细胞基因组整体的低甲基化和局部区域 (如启动子区) 的高甲基化是其典型特征。DNA 甲基化还参与了细胞的多种生理活动, 比如基因的时空特异性表达、X 染色体失活、基因的印迹缺失、衰老以及癌症的发生^[3-4]。

一、常用的甲基化检测技术

分析甲基化 DNA 的一个主要问题是, 在普通 PCR 和克隆处理过程中, 因为甲基胞嘧啶被胞嘧啶取代, 失去了甲基化的标志。为了解决这个问题, 目前绝大多数研究甲基化的方法都将 DNA 的亚硫酸氢盐处理作为甲基化分析的起点, 经亚硫酸氢盐处理后, 采用限制性内切酶分析^[5]及甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP)^[6-7]进行检测。前者是利用亚硫酸氢盐处理 DNA 后, 限制性内切酶酶切位点的改变来设

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1009-9158. 2010. 03. 001

作者单位: 200040 上海, 复旦大学附属华山医院检验科 分子与转化医学研究所

本文直接使用的缩略语: MS-HRM (methylation-sensitive high-resolution melting), 甲基化敏感的高分辨率熔解; PCR (polymerase chain reaction), 聚合酶链反应; HRM (high-resolution melting), 高分辨率熔解; SNP (single nucleotide polymorphism), 单核苷酸多态性; Tm (melting temperature), 熔解温度

计筛查的方法,但仅限于分析限制性内切酶能识别特异序列中所包含的 CG 二核苷酸,且由于限制性内切酶对 DNA 的消化不完全,会产生假阳性结果。后者利用甲基化特异引物和非甲基化特异引物来分析基因启动子区引物对应的几个 CG 二核苷酸甲基化状况,有时需要设计多对引物,且 PCR 条件必须严格控制以避免假阳性结合。这两种方法一般给出定性结果,不能定量。还有一种方法为亚硫酸盐测序,它是检测甲基化的“金标准”,由 Frommer 等^[8]最先报道,能明确目的片段中每一个 CpG 位点的甲基化状态,但需要大量的克隆测序,过程较为繁琐、昂贵。近年来研究者采用 DNA 甲基化芯片 (MeDIP-chip),可快速、高通量地发现靶基因组上的甲基化区域^[9],但这些甲基化区域还是需要上述的方法加以验证。

二、MS-HRM 技术的原理、技术特点

上述方法都是定性检测甲基化的方法,许多研究显示 DNA 甲基化水平和不同的疾病状态有关,因此异常 DNA 甲基化的定量检测对疾病的诊断、治疗监测和研究都是必不可少的^[10-13]。本期中华检验医学杂志上,郭林等^[14]报道了一种简单的闭管分析 PCR 方法,它结合了经亚硫酸盐处理后的 DNA 扩增和扩增后的高分辨率熔解两个步骤,可进行灵敏的、大批量的 DNA 甲基化定量检测,是一种可准确定量检测甲基化水平的新方法。

该方法由 Worm 等^[15]首先于 2001 年提出,并经 White 等^[16]改进将其发展成为目前较为成熟的 HRM 检测方法。高分辨熔解技术与普通熔解曲线的原理是一致的,都是通过实时监测升温过程中双链 DNA 荧光染料与 PCR 扩增产物的结合情况;二者不同之处主要表现在升温速率和所用的染料。它使用的是一种新型饱和染料(如 SYTO9),解链时染料脱落,荧光信号降低,通过检测荧光信号随温度的变化即可得到扩增产物的熔解曲线。传统熔解曲线技术应用的染料在高浓度时会抑制 PCR,故难以达到足够的浓度与 PCR 产物饱和结合。而 HRM 应用的饱和染料在相当大的浓度范围内均不影响 PCR,故能与 PCR 产物饱和结合而更准确地反映 DNA 解链过程。这种染料具有更强的 DNA 结合能力和很低的抑制作用,同时结合带有高分辨熔解分析功能的实时荧光定量 PCR 仪(如 Rotor-Gene 6000)精确的温度控制能力。此外,HRM 熔解仪与常规熔解仪相比,具有更高的数据采集速率、荧光信号敏感度和温度精确度,并确保样品间温度的一致性,从而大大提高了数据的精确性^[17]。由于 HRM 方法可检测到微小的变异,如单碱基突变、小的插入和缺失等^[18-19],HRM 开始被广泛用于 SNP 和突变的研究。如本期中华检验医学杂志上,陈志红等^[20]用 HRM 方法对 60 份大肠癌组织 KRAS 基因密码子 12 和 13 突变进行检测,发现 HRM 可检测到低至 10% 的突变,且敏感度为 100%,特异度为 96%。后来研究者将其用于甲基化的检测,也同样备受关注。它的原理为:样本 DNA 以亚硫酸氢盐处理后,由于发生甲基化的片段中 CG 碱基对有 3 个氢键相连,AT 碱基对为 2 个氢键,因此 GC 碱基稳定性比 AT 碱基好,需要更多的能量才能打开氢键,Tm 值也就比相应的非甲基化序列高。在熔解曲线图中,Tm 值会随着甲基化程度的升高而升高,曲线从左往右依次排列,因此能精确地区分标本甲基化程度^[21-22]。

MS-HRM 方法仅依赖 1 对引物,可同时以甲基化和非甲基化的模板进行扩增,由于亚硫酸氢盐修饰后,甲基化 DNA 具有较高的 CG 含量,这样不同 CG 含量的模板具有不同的扩增效率,经过数十轮 PCR 循环后,会出现某一种模板的扩增的倾向性,称为 PCR 偏倚(PCR bias)^[23],即在甲基化的研究中,扩增往往倾向于 GC 含量较低的非甲基化模板,这样过分扩增非甲基化的模板在 PCR 后 HRM 分析时会掩盖甲基化等位基因的存在,因此也就降低了该方法对甲基化检测的灵敏度和特异性。尽管许多研究者尝试采用不同的方法来克服 PCR 偏倚,例如提高 Tm,在 PCR 体系中加入添加物以提高扩增甲基化的模板的效率,但文献显示效果并不佳,有时候甚至是矛盾的^[24-25]。Wojdacz 等^[26]首先提出在引物中引入少数几个 CG 位点,这样选择性地使引物与甲基化序列能互补结合,因此能弥补对非甲基化序列倾向性导致的 PCR 偏倚,有效地增加了 MS-HRM 的灵敏度,他们采用此方法对 MGMT 启动子的甲基化进行检测,发现能检测到低至 0.1% 的甲基化水平,比甲基化荧光定量(methylight)PCR 的灵敏度更好^[27]。

三、MS-HRM 技术的应用

本期中华检验医学杂志上,郭林等^[14]以亚硫酸盐修饰后的 CpGenome Universal Methylated DNA 为 100% 甲基化的样本,以 100% 非甲基化的健康人外周血 DNA 作为稀释剂,分别制成 100%、80%、50%、30%、10%、0% 系列浓度的标准曲线,建立了定量检测肝癌缺失 1 基因(deleted in liver cancer-1, DLC-1)启动

子 DNA 甲基化的方法,该方法显示较好的灵敏度和稳定性。同时作者用该技术定量检测石蜡切片上前列腺癌细胞中 DLC-1 甲基化 DNA 水平,探讨 DLC-1 甲基化 DNA 程度与前列腺癌患者年龄、前列腺特异抗原 (PSA) 水平和前列腺癌 TNM 分期的关系。作者发现 DLC-1 甲基化 DNA 水平与 TNM 分期显著相关,会随着 TNM 分期增高而增高,显示 DLC-1 启动子甲基化 DNA 有望成为评估前列腺癌恶性程度的分子指标。Zhang 等^[28]采用 MS-HRM 技术在 100 例胃癌、100 例结肠癌和 70 例胰腺癌患者和他们各自的癌旁组织中检测 ADAMTS9 甲基化 DNA 水平,发现该基因的甲基化水平与表达水平呈负相关,且在癌组织中的甲基化水平远远高于癌旁组织。他们认为 MS-HRM 方法是一高通量、快速筛查临床标本的方法。

MS-HRM 除了能用于肿瘤的检测和恶性程度评估外,还用于遗传性疾病的检测。Beckwith-Wiedemann 综合征和 Silver-Russell 综合征都是先天性遗传病,由染色体 11p15.5 上印记缺失造成的,临床上采用对 H19 和 KCNQ10T1 基因的差异性甲基化区域进行 Southern 杂交 (Southern blot) 分析来诊断。Alders 等^[29]采用 MS-HRM 方法对 16 例已经 Southern blot 确诊的 Beckwith-Wiedemann 综合征和 Silver-Russell 综合征患者和 45 名健康人进行分析,发现 MS-HRM 可检测出所有的 DNA 甲基化,且比 Southern blot 更为灵敏。

越来越多的研究者开始认识到甲基化 DNA 是新一代的肿瘤标志,对肿瘤风险评估、早期诊断以及肿瘤预后都有极其重要的诊断价值,因此 MS-HRM 在诊断上的应用具有巨大的潜力,与传统的 MSP 方法相比,MS-HRM 采用闭管操作,操作简单,降低了 PCR 污染的风险,节省了分析时间。另外,该法可检测杂合甲基化,可在同一反应中检测甲基化和非甲基化等位基因,不像 MethyLight 那样需要内参基因^[27]。

四、展望

目前采用血清游离甲基化 DNA 作为肿瘤标志物的研究正方兴未艾,但有效检出血清游离甲基化 DNA 并予以定量对我们临床检验工作者仍然是一个挑战! 这些游离 DNA 常常由于其浓度过低且混杂有大量的正常细胞 DNA 而难以被检测到,MS-HRM 方法能较好地解决这一问题,在此高分辨率平台上能够鉴定单个 CG 位点,灵敏度低至 0.1% ~ 1.0%,完全能满足对微甲基化 DNA 的鉴定,最新的研究显示该方法已经成熟地运用在组织切片上肿瘤细胞内甲基化的检测^[30],这表明随着人们对该方法认识的进一步深入,MS-HRM 方法应用范围会越来越广,它可以任意检测与肿瘤相关的甲基化位点,可对特定基因甲基化状态的特征进行描述,在临床分子检测中有巨大的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 2007, 128: 635-638.
- [2] Bird AP. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet*, 1987, 3: 342-347.
- [3] Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 2003, 59: 21-32.
- [4] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16: 6-21.
- [5] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 2532-2534.
- [6] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 9821-9826.
- [7] 武立鹏, 朱卫国. DNA 甲基化的生物学应用及检测方法进展. *中华检验医学杂志*, 2004, 27: 468-474.
- [8] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 1827-1831.
- [9] Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M. Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome. *Biotechniques*, 2008, 44: 35, 37, 39.
- [10] Shi H, Wang MX, Caldwell CW. CpG islands: their potential as biomarkers for cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007, 7: 519-531.
- [11] Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, et al. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol*, 2006, 76: 23-32.
- [12] Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, et al. Promoter methylation of RASSF1A, RAR β and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer*, 2006, 54: 109-116.
- [13] Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res*, 2003, 63: 7641-7645.
- [14] 郭林, 张心菊, 关明, 等. 前列腺癌组织中 DLC-1 启动子甲基化定量检测的 HRM 方法建立及其应用意义. *中华检验医学杂志*, 2010, 33: 204-207.
- [15] Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clin Chem*, 2001, 47: 1183-1189.
- [16] White HE, Hall VJ, Cross NCP. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clin Chem*, 2007, 53: 1960-1962.
- [17] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 2007, 8: 597-608.

- [18] Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2:59-66.
- [19] 吴吉芹, 朱利平, 光明, 等. 高分辨溶解方法的建立及在真菌感染患者 CYP2C19 遗传多态性检测中的应用. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 274-278.
- [20] 陈志红, 郭爱弗, 安社娟, 等. HRM 法检测大肠癌组织 KRAS 基因密码子 12 和 13 点突变. *中华检验医学杂志*, 2010, 33:208-211.
- [21] Guldberg P, Worm J, Grønbaek K. Profiling DNA methylation by melting analysis. *Methods*, 2002, 27:121-127.
- [22] Dahl C, Grønsvov K, Larsen LA, et al. A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome. *Clin Chem*, 2007, 53:790-793.
- [23] Wojdacz TK, Hansen LL. Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *Biotechniques*, 2006, 41:274, 276, 278.
- [24] Warnecke PM, Stitzaker C, Melki JR, et al. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acid Res*, 1997, 25:4422-4426.
- [25] Shen L, Guo Y, Chen X, et al. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques*, 2007, 42:48-50, 52.
- [26] Wojdacz TK, Borgbo T, Hansen LL. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics*, 2009, 4:231-234.
- [27] Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35:e41.
- [28] Zhang C, Shao Y, Zhang W, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 196:38-44.
- [29] Alders M, Blik J, vd Lip K, et al. Determination of KCNQ10T1 and H19 methylation levels in BWS and SRS patients using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17:467-473.
- [30] Balic M, Pichler M, Strutz J, et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn*, 2009, 11:102-108.

(收稿日期:2009-10-03)

(本文编辑:史红)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华检验医学杂志网站及稿件远程管理系统开通

为顺应当期刊网络化、数字化的发展趋势,更好地为广大作者、读者提供高质量的服务,本刊从 2009 年 5 月 15 日起将开通中华检验医学杂志网站及稿件远程管理系统。网站的开通,将为广大读者、作者、编者提供一个学术交流和沟通的平台。通过本刊网站,读者、作者、编者将能及时了解本领域的国内外学术动态及各专业学术会议的召开事宜。目前本刊有 VIP 会员 1 200 余人,网站的开通将有利于我们更好地为 VIP 会员提供优质服务。中华检验医学杂志网站的网址为 <http://www.medlab.org.cn>。

稿件远程管理系统包括作者在线投稿、在线查稿、专家在线审稿、编委在线定稿、总编办公、远程编辑等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建成为一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿、方便作者及时了解稿件进程、缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:(1)第一次使用本系统进行投稿的作者,必须先注册(点击本刊网站的投稿注册),才能投稿。注册时各项信息请填写完整。

作者自己设定用户名和密码,该用户名和密码长期有效。(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件时信息不完整。如果遗忘密码,可以从系统自动获取,系统将自动把您的账号信息发送到您注册时填写的信箱中。本刊的审稿专家可使用同一个用户名作为审稿人进行稿件审理或作为作者进行投稿。(3)作者投稿请直接登录本刊网站,点击在线投稿。投稿成功后,系统自动发送回执邮件。作者可随时点击“在线查稿”,获知该稿件的审稿情况、处理进展、审稿意见、终审结论等;有关稿件处理的相关结果编辑部不再另行文通知。

中华检验医学杂志网站尚在不断完善之中,除编辑部努力之外,离不开广大读者、作者的支持和帮助,在网站使用中遇到任何问题,请与我们联系。联系人:武昱、唐栋,电话:010-85158270、010-85158269,电子信箱:wuyu@cma.org.cn、tangdong@cma.org.cn。

相信通过我们的共同努力,一定能够把《中华检验医学杂志》网站办得更好、更有活力!

本刊编辑部

DNA甲基化定量检测的新方法:甲基化敏感性高分辨率熔解分析

作者: 关明, GUAN Ming
作者单位: 复旦大学附属华山医院检验科分子与转化医学研究所, 上海, 200040
刊名: 中华检验医学杂志 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE
年, 卷(期): 2010, 33(3)

参考文献(30条)

1. [Wojdacz TK;Dobrovic A Methylation-sensitive high resolution melting\(MS-HRM\):a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation](#) 2007
2. [Wojdacz TK;Borgbo T;Hansen LL Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications](#) 2009
3. [Shen L;Guo Y;Chen X Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis](#) 2007
4. [Shi H;Wang MX;Caldwell CW CpG islands:their potential as biomarkers for cancer](#) 2007
5. [Bird AP CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus](#) 1987
6. [Jacinto FV;Ballestar E;Esteller M Methyl-DNA immunoprecipitation\(MeDIP\):hunting down the DNA methylome](#) 2008
7. [Frommer M;McDonald LE;Millar DS A genomic sequencing protocol that yields a positive disphly of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands](#) 1992
8. 武立鹏;朱卫国 DNA甲基化的生物学应用及检测方法进展[期刊论文]-中华检验医学杂志 2004(7)
9. [Herman JG;Graff JR;Myohanen S Methylation-specific PCR:a novel PCR assay for methylation status of CpG islands](#) 1996
10. [Xiong Z;Laird PW COBRA:a sensitive and quantitative DNA methylation assay](#) 1997
11. [Bird A DNA methylation patterns and epigenetic memory](#) 2002
12. [Reik W;Santos F;Dean W Mammalian epigenomics:reprogramming the genome for development and therapy](#) 2003
13. [Balic M;Pichler M;Strutz J High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis](#) 2009
14. [Alders M;Bliet J;vd Lip K Determination of KCNQ10T1 and H19 methylation levels in BWS and SRS patients using methylation-sensitive high-resolution melting analysis](#) 2009
15. [Zhang C;Shao Y;Zhang W High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers](#) 2010
16. [Warnecke PM;Stirzaker C;Melki JR Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA\[外文期刊\]](#) 1997(21)
17. [Wojdacz TK;Hansen LL Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay](#) 2006
18. [Dahl C;Grønnskov K;Larsen LA A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome](#) 2007

19. [Guldberg P;Worm J;Gnφnbaek K Profiling DNA methylation by melting analysis 2002](#)
20. [陈志红;郭爱弗;安社娟 HRM法检测大肠癌组织KBAS基因密码子12和13点突变 2010](#)
21. [吴吉芹;朱利平;关明 高分辨溶解方法的建立及在真菌感染患者CYP2C19遗传多态性检测中的应用\[期刊论文\]-中华检验医学杂志 2009\(3\)](#)
22. [Montgomery J;Wittwer CT;Palais R Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis 2007](#)
23. [Reed GH;Kent JO;Wittwer CT High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics 2007](#)
24. [White HE;Hall VJ;Cross NCP Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for PraderWilli and Angelman syndromes 2007](#)
25. [Worm J;Aggerholm A;Guldberg P In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis 2001](#)
26. [郭林;张心菊;关明 前列腺癌组织中DLC-1启动子甲基化定量检测的HHM方法建立及其应用意义 2010](#)
27. [Muller HM;Widschwendter A;Fiegl H DNA methylation in serum of breast cancer patients:an independent prognostic marker 2003](#)
28. [Fischer JR;Ohnmacht U;Rieger N Promoter methylation of RASSF1A, BAR β and DAPK predict poorprognosis of patients with malignant mesothelioma 2006](#)
29. [Aggerholm A;Holm MS;Guidberg P Promoter hypermethylation of p15INK4B, H1C1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients 2006](#)
30. [Goldberg AD;Allis CD;Bernstein E Epigenetics:a landscape takes shape 2007](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhyxjy201003001.aspx