

# 基于 MeCP2 蛋白和双酶信号放大的 DNA 甲基化 电化学免疫分析\*

栗莎莎<sup>1</sup>, 张姝<sup>2</sup>, 黄健<sup>2</sup>, 陈曦<sup>1</sup>, 李艳<sup>3</sup>, 方立超<sup>3</sup>, 邓钧<sup>3</sup>, 莫非<sup>2\*\*</sup>, 郑峻松<sup>3\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 临床检验中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 陆军军医大学 药学与检验医学系, 重庆 400038)

**[摘要]** 目的: 探讨甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 和双酶信号放大电化学免疫传感器用于 DNA 甲基化定量检测的效果。方法: 固定在纳米金 (AuNPs) 修饰电极表面的探针与靶 DNA 杂交后, 将电极于 37 °C 下与 MeCP2 蛋白溶液孵育, 再与葡萄糖氧化酶 (GOD) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 共同标记的 MeCP2-His 标签抗体 (GOD-HRP/anti-His tag) 反应; 于含葡萄糖和对苯二酚的检测液中测试其电化学信号, 建立信号大小与 DNA 甲基化浓度之间的关系, 确定该传感器的检测限, 考察实验所设计的双酶信号放大策略的放大效果。结果: 在  $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-7}$  mol/L 范围内, 信号大小与 DNA 甲基化浓度的对数呈线性关系, 回归方程为  $I(\text{峰电流值}, \mu\text{A}) = 1.038 \lg C(\text{DNA 甲基化的浓度}, \text{mol/L}) + 16.598$ , 相关系数  $r$  为 0.993, 检出限为 0.1 fmol/L; 双酶标记体系的 DPV 峰电流最高 (9.105  $\mu\text{A}$ ), 单独 HRP 标记体系的 DPV 峰电流为 1.99  $\mu\text{A}$ , 单独 GOD 标记体系的信号极其微弱, 仅为 0.969  $\mu\text{A}$ ; 重复性实验得  $RSD$  为 4.6%; 将传感器置于 pH 7.4 的 PBS 中, 4 °C 条件下放置 28 d 后, 响应电流大小为最初的 93.7%, 表明该传感器具有较好的稳定性; 与单酶标记体系相比, 双酶标记体系产生的电化学信号更强。结论: 采用基于 MeCP2 和双酶信号放大电化学免疫传感器具有较高的灵敏度, 能实现痕量 DNA 甲基化的检测。

**[关键词]** DNA 甲基化; 电化学; 生物传感技术; 甲基化 CpG 结合蛋白 2; 双酶催化; 免疫分析

**[中图分类号]** R446.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)09-1005-06

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.09.003

## Electrochemical Immunoassay for DNA Methylation Analysis Based on MeCP2 and Bi enzymatic Signal Amplification

SU Shasha<sup>1</sup>, ZHANG Shu<sup>2</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, CHEN Xi<sup>1</sup>, LI Yan<sup>3</sup>, FANG Lichao<sup>3</sup>,  
DENG Jun<sup>3</sup>, MO Fei<sup>2</sup>, ZHENG Junsong<sup>3</sup>

(1. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. College of Laboratory Science, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of bi-enzymatic signal amplification approach on the quantitative detection of DNA methylation of methylated CpG binding protein 2 (MeCP2) using electrochemical biosensor. **Methods:** The probe immobilized on the electrode which was covered with nano-gold (AuNPs) was hybridized with the target DNA, and then the electrode was incubated with the solution containing MeCP2 protein at 37 °C, followed by His tag antibody conjugated with glucose oxidase and horseradish peroxidase (GOD-HRP) to form MeCP2-His tag<sup>GOD-HRP</sup>. The electrochemical

\*[基金项目] 国家自然科学基金 (81572078)

\*\* 通信作者 E-mail: mofei0312@gmc.edu.cn; zhengalpha@sina.com

网络出版时间: 2019-09-16 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190916.2137.003.html>

signal was measured in a buffer containing glucose and hydroquinone. Based on electrochemical signal, the correlation between electrical signal size and DNA methylation concentration was established, and the detection limit of the electrochemical biosensor and the amplification effect of the GOD-HRP strategy were determined. **Results:** In the range of  $1.0 \times 10^{-14}$  mol/L to  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L of DNA methylation concentration, the electrical signal size was linear with the logarithm of DNA methylation concentration. The regression equation was  $I = 1.038 \lg C + 16.598$ , ( $I$  represents peak current value ( $\mu\text{A}$ ),  $C$  represents the concentration of DNA methylation (mol/L), and correlation coefficient  $r$  is 0.993. The detection limit is 0.1 fmol/L. GOD-HRP led to the highest DPV peak current, reaching 9.105  $\mu\text{A}$ , while HRP alone made DPV peak current around 1.99  $\mu\text{A}$ , and GOD alone around 0.969  $\mu\text{A}$ . Using simultaneously prepared five electrochemical biosensors to detect 0.1  $\mu\text{mol/L}$  DNA methylation, RSD was 4.6%. When these five electrochemical immunosensors sensor were placed in PBS of pH 7.4, the response current was very stable, and the current was 93.7% of the initial current after 28 days, suggesting that the prepared electrochemical biosensors had good repeatability and stability. **Conclusion:** The bi-enzymatic labeling system produces a stronger electrochemical signal than the single enzyme labeling system, and improves the sensitivity of the electrochemical biosensor in detecting DNA methylation.

[**Key words**] DNA methylation; electrochemistry; biosensing technology; methylated CpG binding protein 2; bi-enzyme catalysis; immunoassay

DNA 甲基化一直是表观遗传领域研究的前沿和热点, 由于其在细胞分化、胚胎发育、遗传性疾病和肿瘤发生等基因表达调控方面起着重要作用, DNA 甲基化分析已成为表观遗传紊乱疾病和肿瘤早期预警的新手段<sup>[1-5]</sup>。传统 DNA 甲基化检测技术存在一定的不足, 如重亚硫酸氢测序存在测序深度、转化效率和庞大数据分析等不足, 甲基化限制性酶切分析引物设计受酶识别序列的限制等, 高效液相色谱、质谱等操作繁琐且需要庞大的仪器设备<sup>[6-11]</sup>。电化学传感分析检测技术克服了以上缺点, 具有成本低、操作简便、响应快速、灵敏度高和设备易于小型化等诸多优点<sup>[12-14]</sup>, 国内外应用电化学传感器检测 DNA 甲基化主要是通过检测 DNA 甲基转移酶的活性间接反映 DNA 甲基化的水平, 灵敏度、特异性仍有待提高<sup>[15]</sup>。本研究利用甲基化 CpG 结合蛋白 2 (Methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2) 特异性识别结合 DNA 甲基化位点, 以葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOD) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 双酶标记的抗体作为信号放大体系, 通过级联催化作用实现信号放大, 同时利用电极表面修饰的纳米金有效促进电极表面的电子转移, 两者相结合, 探讨 DNA 甲基化的定量检测效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

CHI660D 电化学工作站购自上海辰华仪器公司, 电极为三电极体系, 辅助电极为铂丝电极, 参比电极为 Ag/AgCl 电极, 工作电极为金电极 (直径为 2 mm)。crossbeam 340 zeiss 扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 购自德国蔡司公司, 氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>)、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 及人重组 MeCP2 购自上海近岸科技有限公司, GOD、HRP 和抗 6 × His 鼠单克隆抗体 (Anti-His tag antibody) 购自上海生物工程有限公司, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]、K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O、NaCl 和 MgCl<sub>2</sub> 购自国药集团化学试剂有限公司, 三羟甲基氨基甲烷乙二胺四乙酸 (Tris-EDTA, TE) 缓冲液、KCl、磷酸盐 (phosphate buffer saline, PBS) 缓冲粉剂和三(2-羧基乙基) 磷盐酸盐 [Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP] 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 其他所用试剂均为分析纯, 实验用水均为超纯水 (电阻率 18.2 MΩcm)。

### 1.2 DNA 序列

探针序列 5'-HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GCG CGC TGG GTC

GGCm CCC GCG GCG CT-3', 甲基化序列 5'-AC GCC GCG GGG CmCC ACC CAG CGC GC-3', 非甲基化序列 5'-AGC GCC GCG GCG CCC ACC CAG CGC GC-3'。

### 1.3 方法

**1.3.1 缓冲液的配制** 缓冲液有 3 种:一是探针固定缓冲液(50 mmol/L NaCl、1.0 mmol/L TCEP 和 pH 7.4 的 1 × TE 缓冲液),即准确称取 NaCl 0.029 g、TCEP 0.002 8 g,用适量 1 × TE 缓冲液溶解并定容至 10 mL 所得;二是杂交缓冲液(50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 pH 7.4 的 1 × TE 缓冲液),准确称取 NaCl 0.029 g、MgCl<sub>2</sub> 0.020 3 g,用适量 1 × TE 缓冲液溶解并定容至 10 mL 所得;三是蛋白固定缓冲液,即量取 5 mL 甘油,倒入容量瓶后加入 1 × PBS 定容至 100 mL 所得。

**1.3.2 双酶标记抗体的制备** HRP 和 GOD 标记抗体分两个阶段完成,第一阶段是根据文献[16]标记 GOD,即 1 g/L 抗体逐滴加入溶有 GOD 2 mg 的 1.25% 戊二醛溶液中,加入 1 mol/L、pH 9.5 PBS 进行搅拌,继续加入 200 mmol/L 赖氨酸混匀后,4 °C 静置 1 h,离心弃上清液,沉淀物即为 GOD/anti-His tag;第二阶段是根据文献[17]将 HRP 偶联到 GOD/anti-His tag 上,先用 60 mmol/L 的过碘酸钠和 160 mmol/L 的乙二醇混合液将 HRP 活化,将酶与 GOD 标记后的抗 His tag 抗体按 1:1 比例进行偶合。依次加入浓度为 5 g/L 的硼氢化钠溶液和等体积的饱和硫酸铵溶液,再次离心、弃上清液,并用 10 mmol/L PBS 重悬,混合液在 0.15 mol/L PBS 中透析,透析结束后将标记的抗体与等体积甘油混合,标记产物记为 GOD-HRP/anti-His tag,取适量进行紫外可见分光光谱扫描鉴定,其余分装后于 -20 °C 避光保存。

**1.3.3 DNA 电化学生物传感器构建** (1) AuNPs/Au 的制备:首先用 0.05 μm 的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抛光粉将金电极(Au)在麂皮上打磨光滑,接着依次用丙酮、乙醇和超纯水各超声清洗 5 min,清洗完成后将电极置于新鲜配制的 Piranha 溶液(98% 硫酸溶液与 30% 过氧化氢按 3:1 体积比混合)中活化 15 min,完成活化过程;取出电极,用 0.5 mol/L 浓硫酸进行电化学清洗,直到获得稳定重复的循环伏安曲线,随后用超纯水将电极表面彻底淋洗干净;在 3 mmol/L 氯金酸溶液(含 0.1 mol/L 硝酸钾)中于 -0.2 V 电位下沉积 120 s,再次充分淋洗电极,并用氮气吹干,制备得纳米金(AuNPs)修饰的电极,

标记为 AuNPs/Au,然后采用 SEM 对电沉积纳米金的表面形貌进行表征,观察纳米粒的大小及分布情况,并推算出纳米金的直径大小。(2) 探针固定与杂交:在上述制备的 AuNPs/Au 电极上滴加 10 μL 探针固定缓冲液(含 0.1 μmol/L 巯基化探针 DNA),4 °C 放置 12 h,得到探针 DNA 修饰的电极,杂交之前先用 PBS 和超纯水充分淋洗干净以除去多余吸附的 DNA 探针,滴加 10 μL 杂交缓冲液(含 0.1 μmol/L 靶 DNA),于 37 °C 杂交 1 h,电极取出后再次用 PBS 和超纯水淋洗干净。(3) DNA 电化学生物传感器构建过程的电化学表征:电极每一步组装后均在含 0.1 mol/L KCl 的 3 mmol/L [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 溶液中采用电化学阻抗法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)扫描,EIS 参数设置为初始电位 0.24 V,频率范围 0.1 ~ 105 Hz,扫描速度 50 mV/s。(4) MeCP2 蛋白固定与免疫反应:杂交完成后,电极用 0.5% BSA 封闭 30 min,接着滴加 10 μL、200 mg/L MeCP2 置于 37 °C 水浴箱孵育 1 h,PBS 淋洗 3 次,滴加 10 mg/L GOD-HRP/anti-His tag 液 10 μL、于 37 °C 完成免疫反应,最后 PBS 淋洗 3 次待干。(5) 电化学信号测定:将电极浸入含 0.5 mmol/L 葡萄糖 10 mL 和 0.25 mmol/L 对苯二酚的 PBS 溶液中,采用差分脉冲伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)进行扫描并记录峰电流大小,DPV 检测参数设置为电压范围 -0.1 ~ 0.6 V,脉冲幅度 0.05 s,脉冲宽度 0.05 s,脉冲周期 0.2 s,静置时间 2 s。

**1.3.4 可行性分析** 按照 1.3.3 项下的方法制备 DNA 电化学生物传感器对 0.1 μmol/L 非甲基化 DNA 与甲基化 DNA 进行测定,通过比较各自的峰电流大小,对该电化学检测方法的可行性进行验证。

**1.3.5 DNA 甲基化定量分析** 将 0.1 μmol/L 甲基化 DNA 按 10 倍比稀释依次得到 1.0 × 10<sup>-8</sup>、1.0 × 10<sup>-9</sup>、1.0 × 10<sup>-10</sup>、1.0 × 10<sup>-11</sup>、1.0 × 10<sup>-12</sup>、1.0 × 10<sup>-13</sup>、1.0 × 10<sup>-14</sup>、1.0 × 10<sup>-15</sup> 及 1.0 × 10<sup>-16</sup> mol/L 的靶序列溶液,按照 1.3.3 项下的方法制备 DNA 电化学生物传感器,用电化学方法测得该传感器的最低检测限,通过所得电信号对靶标浓度作线性关系曲线,计算回归方程和相关系数 *r*。

**1.3.6 双酶信号放大策略的电化学表征** 实验设置 3 组实验体系,分为 GOD 和 HRP 双酶标记体系(GOD-HRP/anti-His tag)、单独 HRP 标记体系(HRP/anti-His tag)及单独 GOD 标记体系(GOD/

anti-His tag), 在相同的条件下, 将所制备的 DNA 电化学传感器先后进行杂交、MeCP2 蛋白固定后, 再与 3 组不同的酶标记抗体反应, 通过比较各自 DPV 峰电流的大小, 考察实验所设计的双酶信号放大策略的放大效果。

**1.3.7 传感器的重复性与稳定性研究** 在相同条件下, 同时制备 5 支电化学免疫传感器, 对 0.1 μmol/L 甲基化 DNA 同时进行检测, 比较结果之间的差距, 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 评价该电化学方法检测甲基化 DNA 的重复性; 通过将制备好的电极浸入 0.1 mol/L、pH 7.4 的 PBS 溶液中, 于 4 °C 冰箱放置, 每 7 天测定 1 次, 评估电化学传感器的稳定性。

## 2 结果

### 2.1 双酶修饰抗体表征

将偶联物进行紫外扫描鉴定, HRP 的最大吸收光谱分别为 403 nm, GOD 的最大吸收光谱为 275 nm, 双酶标记抗体后的最大吸收峰向 HRP 及 GOD 的最大吸收峰处偏移。见图 1。

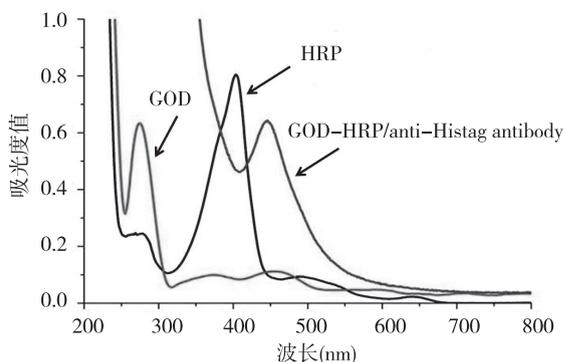


图 1 HRP、GOD 和 GOD-HRP/anti-His tag antibody 的紫外 - 可见光谱分析

Fig. 1 UV-visible spectroscopy of HRP, GOD and GOD-HRP/anti His tag antibody

### 2.2 AuNPs/Au 形貌表征

采用 SEM 表征纳米金修饰的金电极 AuNPs/Au 形貌, AuNPs 呈球形、均匀地分布在电极表面, 其直径大小约为 35 nm。见图 2。

### 2.3 传感器构建的电化学表征

用电化学阻抗法研究传感器制备过程中的电化学特性, 裸电极的电阻抗图可以观察到有一个很小的半圆, 表明电极表面电阻很小; 当修饰上纳米

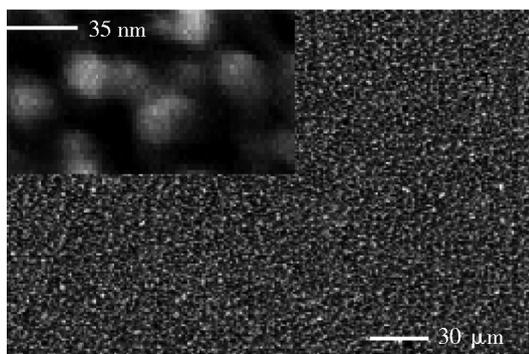
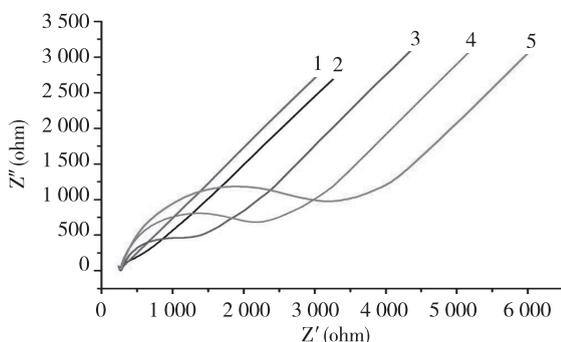


图 2 纳米金修饰金电极 SEM

Fig. 2 SEM image of electrode covered with AuNPs 金后, 几乎变为一条直线, 电阻减小; 当探针组装在电极表面后, 其负电荷的磷酸骨架排斥 [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>, 曲线半圆增大, 电阻增大; 同样, 当电极表面的探针 DNA 与互补序列杂交形成 DNA 双链, 电极表面的负电荷增多, 电阻继续增大; 当 MeCP2 蛋白结合在甲基化的 CpG 上后, 蛋白的分子结构对电极表面的电子转移有一定的阻碍, 电阻进一步增大。见图 3。



注: 1 为纳米金修饰金电极, 2 为裸 Au, 3 为探针固定, 4 为杂交, 5 为 MeCP2 蛋白固定。

图 3 DNA 电化学传感器构建的电化学表征  
Fig. 3 Characterization of EIS of the self-assembling electrochemical biosensor

### 2.4 可行性分析

非甲基化 DNA 出现较小的背景电流, 约 2.6 μA; 甲基化 DNA 则出现显著的氧化电流信号, 约 9.1 μA, 是非甲基化 DNA 电信号的 3.5 倍。见图 4。

### 2.5 DNA 甲基化定量分析

在优化的实验条件下, 随着甲基化靶序列 DNA 浓度的增加, DPV 峰电流逐渐增加; 在 10<sup>-14</sup> ~ 10<sup>-7</sup> mol/L 范围内, DPV 峰电流的大小与甲基化的靶 DNA 浓度对数呈线性关系, 线性回归方程为

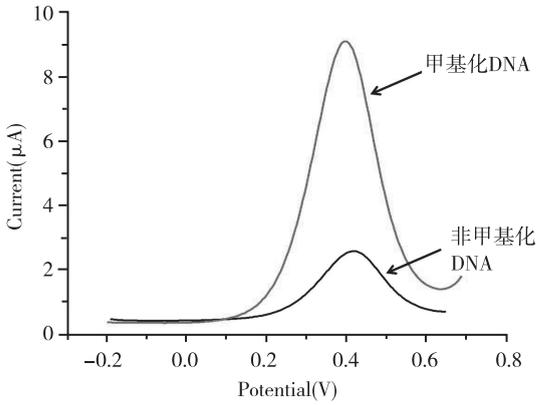
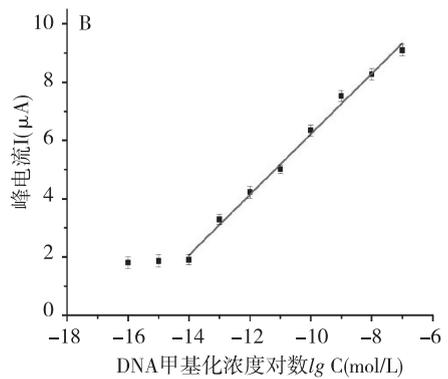
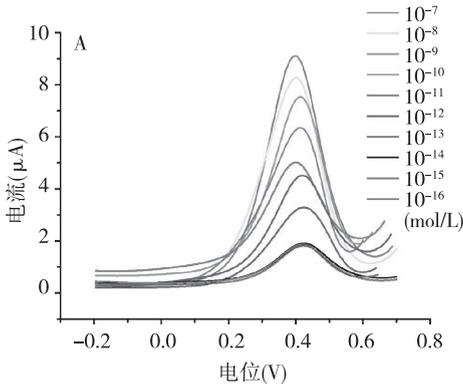


图4 0.1  $\mu\text{mol/L}$  甲基化 DNA 与 0.1  $\mu\text{mol/L}$  非甲基化 DNA 的 DPV 电信号检测

Fig. 4 DPV signals in response to 0.1  $\mu\text{mol/L}$  unmethylated DNA and methylated DNA



注:A 为电流响应曲线,B 为回归曲线。

图5 电化学生物传感器对不同浓度甲基化 DNA 的电流响应曲线及其回归曲线

Fig. 5 The DPV curves at different concentrations of methylated DNA and the correlation of peak current and DNA methylation concentration

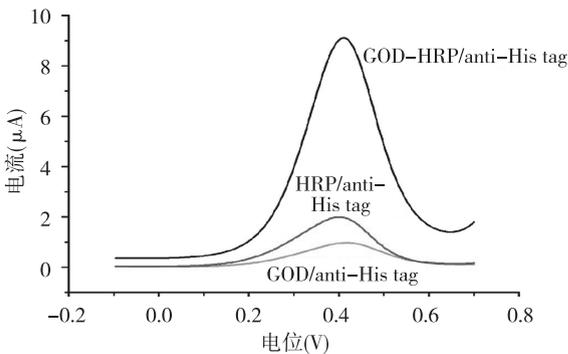


图6 双酶标记体系的电化学表征

Fig. 6 The effect of different enzyme-labeled antibodies on DPV response currents

$I$  (峰电流值,  $\mu\text{A}$ ) = 1.038  $\lg C$  (DNA 甲基化的浓度,  $\text{mol/L}$ ) + 16.598, 相关系数  $r$  为 0.993, 检测限为 0.1  $\text{fmol/L}$ 。见图 5。

## 2.6 双酶信号放大的表征

双酶标记体系的 DPV 峰电流最高, 达 9.105  $\mu\text{A}$ , 单独 HRP 标记体系的 DPV 峰电流约为 1.99  $\mu\text{A}$ , 单独 GOD 标记体系的电信号极其微弱, 仅为 0.969  $\mu\text{A}$ 。见图 6。

## 2.7 电化学免疫传感器的重复性与稳定性

通过同时制备 5 支电化学免疫传感器, 在相同条件下对 0.1  $\mu\text{mol/L}$  浓度的靶甲基化 DNA 进行电化学检测,  $RSD$  为 4.6%; 将传感器置于 pH 7.4 的 PBS 中, 响应电流非常稳定, 28 d 后其电流大小为最初电流的 93.7%, 提示所制得的传感器具有良好的重复性和稳定性。

## 3 讨论

到目前为止, DNA 甲基化的检测方法已经开发出很多种, 每种方法都有各自的优势与劣势, 对 DNA 甲基化检测技术特异性、灵敏度以及高效性要求更高, 生物传感分析无疑成为 DNA 甲基化检测新方法研究的趋势, 其在 DNA 甲基化的检测方面显示出了研究人员期待的优点: 快速、相对廉价、灵敏度高、能进行多样本分析、易于小型化、特别适合床旁检测。因此, 生物传感技术也成为当前 DNA 甲基化研究领域的热点。本研究提出了一种简单而灵敏的 DNA 电化学免疫传感检测方法, 首先, 采用纳米金修饰金电极, 其作用有三: 一是提高

电极比表面积,增大探针固载量;二是纳米金和探针之间通过 Au-S 键结合,使得探针牢牢固定在电极表面;三是促进电子转移<sup>[18-21]</sup>。因此,纳米金在本研究中具有重要的作用。扫描电镜观察到采用电沉积制备的纳米金呈球形,均匀地分布在电极表面,表明电极的比表面积扩大;EIS 表征纳米金修饰电极后电阻较裸金电极减小,可明显提高检测的灵敏度,具有信号放大作用。传感器构建过程的 EIS 表征证明各成分均成功组装在电极上,传感器构建成功。其次,本研究利用 MeCP2 特异性结合双链 DNA 甲基化位点能力,有效保证检测结果的可靠性,这一结论通过对传感器的可行性分析得以证实。第三,在本次设计的 3 种标记体系中,采用 GOD 和 HRP 联合标记的双酶体系比单独标记 HRP 的体系提高约 4.6 倍。通常的电化学免疫传感器都是单独采用某种酶进行标记,与之不同的是,双酶联合催化信号放大的机制在于 GOD 和 HRP 的联合催化作用,即 GOD 催化葡萄糖氧化在电极表面原位产生  $H_2O_2$ ,后者会立即被 HRP 利用,将对苯二酚氧化生成苯醌,从而检测电子转移,加上电极表面修饰的 AuNPs 有效促进了电子转移,从而实现双重信号放大,通过该方法最终获得甲基化 DNA 浓度低至 0.1 fmol/L 的检测限,线性范围为  $10^{-14} \sim 10^{-7}$  mol/L,重复性实验 RSD 为 4.6%,比以往研究结果低<sup>[21-23]</sup>,具有较好的重复性。但传统方法如比色法、高效液相色谱、重亚硫酸氢盐转化、毛细管电泳法等,这些方法大多存在样本用量大、检测时间长、处理复杂等缺点,相比而言,本实验设计的电化学免疫传感器是一种相对简单、快速、灵敏的检测方法,更适用于临床分析。

综上所述,本研究采用双酶标记信号放大技术制备的电化学免疫传感器具有超高的灵敏度,能实现痕量 DNA 甲基化的检测,有望成为肿瘤和其他甲基化相关疾病早期诊断有用的分析工具。

## 4 参考文献

- [1] SUZUKI M M, BIRD A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(6):465 - 476.
- [2] SMITH Z D, MEISSNER A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(3):204 - 220.
- [3] 冯敏,曾景棠,谭益清,等. 表观遗传学与肿瘤及其临床应用 [J]. *国际遗传学杂志*, 2016, 39(5):264 - 268.
- [4] LAI H C, WANG Y C, YU M H, et al. DNA methylation as a biomarker for the detection of hidden carcinoma in endometrial atypical hyperplasia [J]. *Gynecologic Oncology*, 2014, 135(3):552 - 559.
- [5] BAEK S J, YANG S, KANG T W, et al. MENT: methylation and expression database of normal and tumor tissues [J]. *Gene*, 2013, 518(1):194 - 200.
- [6] WAN Y, WANG Y, LUO J, et al. Bisulfite modification of immobilized DNAs for methylation detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(11):2415 - 2421.
- [7] BAKSHI A, EKRAM M B, KIM J. Locus-specific DNA methylation analysis of retrotransposons in ES, somatic and cancer cells using High-Throughput Targeted Repeat Element Bisulfite Sequencing [J]. *Genomics Data*, 2015, 3:87 - 89.
- [8] LOPEZ T A, YANEZ B E, WROBEL K, et al. Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-Bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20):7999 - 8005.
- [9] VON K T, GERBER D, SCHALLER A, et al. Quantitative 1-Step DNA methylation analysis with native genomic DNA as template [J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(7):1098 - 1106.
- [10] HEAD J A, MITTAL K, BASU N. Application of the luminometric methylation assay to ecological species: tissue quality requirements and a survey of DNA methylation levels in animals [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(5):843 - 952.
- [11] HUANG W, QI C B, LV S W, et al. Correction to determination of DNA and RNA methylation in circulating tumor cells by mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(8):4581.
- [12] SAGE A T, BESANT J D, LAM B, et al. Ultrasensitive electrochemical biomolecular detection using nanostructured microelectrodes [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(8):2417 - 2425.
- [13] JING X, CAO X, WANG L, et al. DNA-AuNPs based signal amplification for highly sensitive detection of DNA methylation, methyltransferase activity and inhibitor screening [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 58:40 - 47.
- [14] LI W, LIU X, HOU T, et al. Ultrasensitive homogeneous electrochemical strategy for DNA methyltransferase activity assay based on autonomous exonuclease III-assisted isothermal cycling signal amplification [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 70:304 - 309.