

基于 5-甲基胞嘧啶抗体的 DNA 甲基化电化学检测*

栗莎莎¹, 张姝², 黄健², 陈曦¹, 李艳³, 方立超³, 邓钧³, 莫非^{2**}, 郑峻松^{3**}

(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: 构建一种基于 5-甲基胞嘧啶(5-mC)抗体的电化学生物传感器,用于 DNA 多甲基化位点的定量分析。方法: 采用纳米金修饰金电极(AuNPs/Au),以自组装方式依次将单链 DNA(ssDNA)、巯基乙醇(MCH)和靶 DNA 连接到 AuNPs/Au 上制备 DNA 电化学传感器,经过电化学表征检测电极修饰效果;再以 5-mC 抗体特异性识别靶 DNA 中的甲基化位点,并以辣根过氧化物酶标记二抗(HRP-IgG)为信号示踪物,优化杂交时间及抗 5-mC 抗体浓度;采用差分脉冲伏安法(DPV)分别检测非甲基化与不同数量甲基化 DNA 的电化学信号,同时考察该方法的重复性与稳定性。结果: 电化学表征结果表明电极修饰成功,优化实验条件结果显示最优杂交时间为 90 min、最佳抗体浓度为 10 mg/L,在该条件下 DNA 电化学传感器能有效区分甲基化与非甲基化 DNA,并且 DPV 峰电流的大小与 DNA 甲基化位点的数量呈线性关系,具有较好的重复性与稳定性。结论: 制备的 DNA 电化学传感器能对多个位点的 DNA 甲基化定量检测,有望成为临床 DNA 甲基化位点定量检测的有效手段。

[关键词] DNA 甲基化; 电化学传感器; 5-甲基胞嘧啶; 抗体; 定量分析

[中图分类号] R446.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)11-1262-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.004

Electrochemical Detection of DNA Methylation Based
on 5-Methylcytosine Antibody

SU Shasha¹, ZHANG Shu², HUANG Jian², CHEN Xi¹, LI Yan³,
FANG Lichao³, DENG Jun³, MO Fei², ZHENG Junsong³

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

[Abstract] **Objective:** To construct an electrochemical biosensor based on 5-methylcytosine (5-mc) antibody for quantitative analysis of DNA polymethylated sites. **Methods:** The single-stranded DNA (ssDNA), mercaptohexanol (MCH) and target DNA were sequentially attached on the gold nanoparticles (AuNPs) modified electrode through self-assembly. Then, the prepared electrode was incubated with anti 5-mC antibody, and reacted with the horseradish labeled secondary antibody (HRP-IgG). Differential pulse voltammetry (DPV) was used to detect the electrochemical signals of non-methylated DNA and different amounts of methylated DNA, the effects of experimental condition have been investigated. **Results:** Under the optimal experiment conditions, DNA electrochemical sensor can effectively distinguish methylated DNA from non-methylated DNA, and the DPV peak current is linearly related to the number of DNA methylated sites with good repeatability and stability. **Conclusion:** This approach can detect multiple methylation sites in the DNA sequence, which can be an effective means for the quantitative detection of DNA methylation site in clinical analysis.

*[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:2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.004.html>

[**Key words**] DNA methylation; electrochemistry sensor; 5-methylcytosine; antibody; quantitative analysis

DNA 甲基化是 DNA 化学修饰的一种形式,在细胞分化、基因表达调控及基因组稳定等方面起着重要作用^[1-3]。研究表明,异常 DNA 甲基化与癌症等人类很多疾病相关,肺癌 *CDKN2A* 基因、肝癌 *ARID2* 基因、结肠癌 *CDKN2A* 基因及白血病 *HOXA10* 基因等甲基化可作为肿瘤标志物^[4-10],因此,DNA 甲基化检测对于肿瘤的预测、诊断和治疗具有重要意义。传统的 DNA 甲基化检测技术主要有甲基化敏感限制性内切酶分析 (MSRE)^[11]、重亚硫酸氢盐测序 (Bisulfite-Seq)^[12] 和甲基化免疫共沉淀 (MeDIP)^[13],这些方法大多操作繁琐、耗时,且需要昂贵的仪器设备^[14-16],而 DNA 电化学传感器因操作简便、快速、灵敏,能选择性识别待分析对象中的电化学活性物质,是理想的快速分析 DNA 甲基化的手段^[17-19]。目前大多数应用电化

学传感器检测 DNA 甲基化的研究主要是通过检测 DNA 甲基转移酶活性以间接反映 DNA 甲基化水平,而不能精确测定 DNA 中 5-甲基胞嘧啶 (5-mC) 的水平^[20-23];此外,DNA 甲基转移酶仅催化双链 DNA 中特定序列发生甲基化,不能定量检测多甲基化位点的靶序列。本研究拟构建一种简单、直接,能有效分析 DNA 序列中 5-mC 数量的电化学生物传感器,从而为临床 DNA 甲基化位点的定量检测提供一种简便有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DNA 序列 实验所用探针及不同甲基化数量的靶 DNA 序列均由上海生工生物工程有限公司合成,-20 ℃ 保存备用,见表 1。

表 1 实验所用 DNA 序列
Tab. 1 The base sequences of DNA used in this experiment

名称	序列 (5'-3')
ss DNA	-HS-(CH ₂) ₆ -GCG CGC TGG GTG GGC GCC GCG GCG CT
DNA S0	AGC GCC GCG GCG CCC ACC CAG CGC GC
DNA S1	AGC GCC GCG GCG /i5med C/CC ACC CAG CGC GC
DNA S2	AG/i5med C/GCC GCG GCG/i5med C/CCA CCC AGC GCG C
DNA S3	AG/i5med C/G/i5med C/ CGC GGC G/i5med C/CCA CCC AGC GCG C
DNA S4	AG/i5med C/G/i5med C/ CGC GGC G/i5med C/CCA CCC AGC G/i5med C/GC
DNA S5	AG/i5med C/G/i5med C/CG/i5med C/GGC/i5med C/CCA CCC AGC G/i5med C/GC

注:“/i5med C/”表示甲基化位点,DNA S0 为非甲基化 DNA,DNA S1 ~ S5 分别为含有 1、2、3、4、5 个甲基化位点的靶 DNA。

1.1.2 主要试剂 铁氰化钾 (K₃[Fe(CN)₆])、亚铁氰化钾 (K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O)、氯化钾 (KCl)、氯金酸 (HAuCl₄ · 3H₂O)、三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP)、巯基己醇 (MCH) 及牛血清白蛋白 (BSA) 均购自上海生工生物工程有限公司,5-mC 抗体及 HRP-IgG 购自 Abcam 公司,氯化钠 (NaCl)、硝酸钾 (KNO₃)、氯化镁 (MgCl₂) 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、对苯二酚、氯化钾 (KCl) 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 MΩ · cm)。

1.1.3 仪器 超声波清洗仪、电子天平、CHI660D 电化学工作站 (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)。

1.2 方法

1.2.1 纳米金修饰金电极 (AuNPs/Au) 的制备 将直径为 2 mm 的金电极用 0.05 μm 的 Al₂O₃ 粉打磨成镜面,然后分别在超纯水、无水乙醇、超纯水中超声清洗 5 min。室温晾干后,将电极放入现配的 Piranha 溶液 (98% H₂SO₄ 与 30% H₂O₂ 按 3:1 的体积混合) 中活化 15 min 以上,然后用超纯水彻底清洗干净,氮气吹干。将上述处理好的金电极浸入 3 mmol/L HAuCl₄ · 3H₂O (含 0.1 mol/L KNO₃) 溶液中,于 -0.2 V 电位下沉积 120 s,最后用超纯水充分淋洗干净,制得 AuNPs/Au。

1.2.2 DNA 电化学传感器的制备 向 AuNPs/Au 电极表面滴加 10 μL 含有 0.1 μmol/L 探针 DNA、50 mmol/L NaCl 和 1.0 mmol/L TCEP 的 1 × TE 缓

冲液(pH 7.4),于4℃孵育过夜,使末端巯基化的DNA探针通过Au-S键固定在电极表面。取出电极,用PBS充分淋洗去除多余吸附的DNA,即制得单链DNA(ssDNA)修饰的AuNPs/Au(ssDNA/AuNPs/Au)。然后滴加1 mmol/L MCH 10 μL,室温放置1 h,以封闭电极表面的空白位点,PBS淋洗电极后氮气吹干。继续滴加10 μL含0.1 μmol/L靶DNA、50 mmol/L NaCl和10 mmol/L MgCl₂的1×TE缓冲液(pH 7.4),于37℃水浴箱杂交90 min。杂交完成后,电极用PBS重复冲洗3次,得到双链DNA(dsDNA)修饰的AuNPs/Au(dsDNA/AuNPs/Au),即制得实验所用DNA电化学传感器。

1.2.3 抗5-mC和HRP-IgG的固定 将上述制备的电极用5% BSA室温封闭30 min以防止后续加入抗体的非特异性吸附。向电极表面滴加10 mg/L抗5-mC抗体10 μL,37℃孵育1 h后,再次淋洗电极;继续滴加80 mg/L HRP-IgG 10 μL,于室温孵育30 min;以上两步反应每一步后均用PBS重复淋洗3次后再进行下一步操作。

1.2.4 电化学测定 在含1 mmol/L H₂O₂和1 mmol/L对苯二酚的PBS溶液中,采用差分脉冲伏安法(DPV)进行电化学测定。测定参数:电位扫描范围-0.3~0.1 V、采样间隔0.016 7 s、脉冲宽度0.05 s、脉冲周期0.2 s、静止时间2 s。

1.3 观察指标

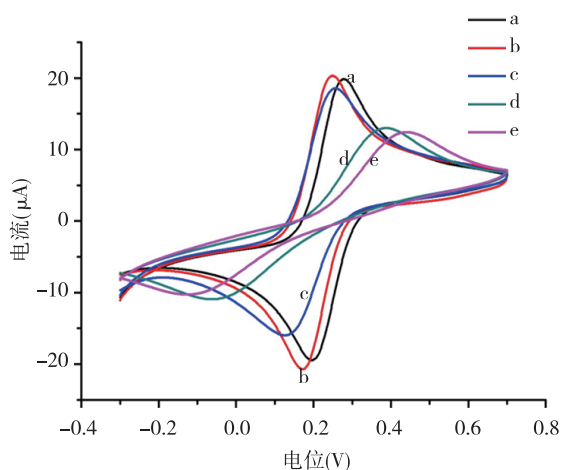
(1)对电极进行电化学表征,裸金电极经过纳米金修饰、探针固定、MCH封闭及靶序列杂交的修饰,每一步修饰后均在含0.1 mol/L KCl的1 mmol/L[Fe(CN)₆]^{3-/4-}溶液中采用循环伏安法(CV)进行电化学表征;(2)DNA甲基化电化学测定条件的优化,包括杂交时间的优化及抗5-mC抗体浓度的优化;(3)可行性分析,对甲基化和非甲基化DNA进行电化学测定,区分甲基化与非甲基化DNA;(4)DNA甲基化位点定量分析,分别对DNA S1~S5进行检测,观察DPV峰电流与靶DNA甲基化位点数量的关系;(5)重复性及稳定性检测。

2 结果

2.1 电极的电化学表征

采用CV法进行电极的电化学表征,结果显示,裸金电极在0.2~0.3 V出现一对明显的氧化还原峰,电势差小于0.1 V,提示[Fe(CN)₆]^{3-/4-}在电极表面转移速度快;当电沉积纳米金后,由于

电极表面的AuNPs有效提高电极比表面积,促进电子转移,所以氧化还原峰电流增高;当电极表面修饰上探针后,由于其带负电荷的磷酸骨架排斥溶液中同样带负电荷的离子扩散至电极表面,所以氧化还原峰电流减小,氧化峰与还原峰之间的电位差增大。同样,当MCH成功修饰上电极后,排斥溶液中同样负电荷的[Fe(CN)₆]^{3-/4-},峰电流进一步减小;当与靶序列杂交后,由于电极表面的负电荷增多,峰电流继续减小,氧化还原峰之间的电位差进一步增大。电化学表征结果表明各成分均成功修饰到电极上,电极组装成功。见图1。



注:a为裸金电极,b为纳米金修饰金电极,c为探针固定,d为MCH封闭,e为靶序列杂交。

图1 DNA电化学传感器自组装CV表征
Fig.1 Characterization of CV obtained for the self-assembling biosensor

2.2 DNA甲基化电化学测定条件的优化

2.2.1 杂交时间的优化 杂交时间是影响传感器性能的重要因素,随着杂交时间从0延长到180 min,DPV峰电流一开始迅速增大,杂交90 min后变化不大,为了节约时间,提高传感器分析效率,最终选择90 min为最优杂交时间。见图2。

2.2.2 抗5-mC抗体浓度的优化 抗体浓度直接影响其与5-mC的结合,因此,需要对抗5-mC抗体浓度进行优化。随着抗体浓度增加,峰电流迅速升高,但当抗体浓度超过10 mg/L,电流趋于平缓,说明反应达到饱和,因此,选择10 mg/L浓度为最佳浓度。见图3。

2.3 DNA甲基化电化学检测的可行性分析

由于甲基化DNA能特异性结合抗5-mC抗体,与抗体结合的HRP-IgG能催化H₂O₂还原产生

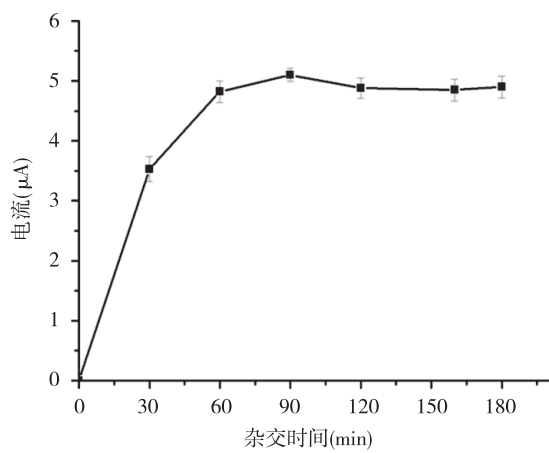


图 2 杂交时间对 DPV 峰电流的影响
Fig. 2 Effect of hybridization time on DPV peak current

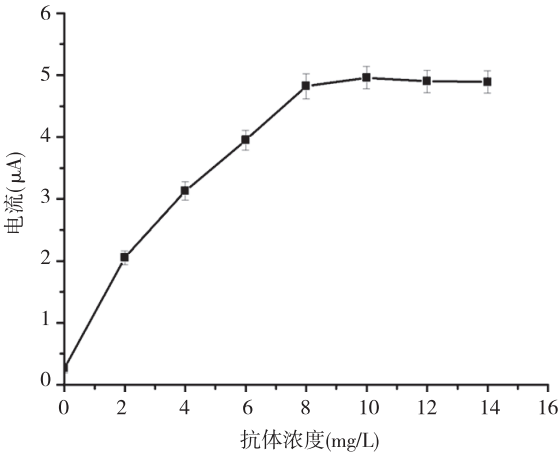
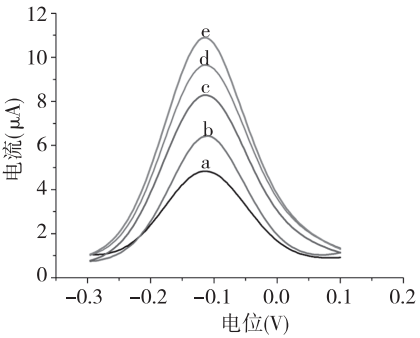
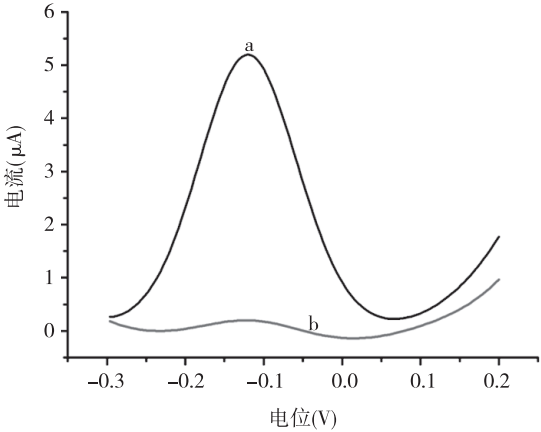


图 3 抗 5-mC 抗体浓度对 DPV 峰电流的影响
Fig. 3 Effect of anti 5-mC concentration on DPV peak current



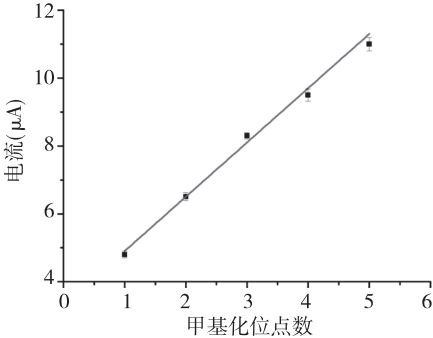
电流,通过测定电流的大小可区分甲基化和非甲基化 DNA。实验结果表明,非甲基化 DNA 的 DPV 峰电流极其微弱,可能是由于部分抗 5-mC 抗体非特异性吸附在电极表面而形成;而甲基化 DNA 则出现较强的峰电流,约 5.2 μA ,说明该方法可以有效区分甲基化与非甲基化 DNA。见图 4。



注:a 为甲基化 DNA,b 为非甲基化 DNA。
图 4 甲基化与非甲基化 DNA 的 DPV 检测信号
Fig. 4 DPV signal of methylated and unmethylated DNA

2.4 DNA 甲基化位点定量分析

分别对 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 DNA S1 ~ S5 进行检测,随着 DNA 甲基化位点数量的增加,DPV 峰电流随之增高,以甲基化位点数量和 DPV 峰电流值分别为横纵坐标作图,并计算得回归方程 $I(\mu\text{A}) = 1.598N + 3.309, r = 0.991$,在 1 ~ 5 个甲基化位点范围内,DPV 峰电流与靶 DNA 甲基化位点的数量呈线性关系。见图 5。



注:a、b、c、d、e 分别为 1、2、3、4、5 个甲基化位点。
图 5 不同数量甲基化位点的 DPV 曲线及回归曲线
Fig. 5 The DPV curve obtained from methylated DNA with different numbers of methylation sites and the regression curve

2.5 重复性及稳定性

在相同条件下,对含一个甲基化位点的靶 DNA 重复测定 5 次,得到相对标准差(*RSD*)约为 6.49%,证明该方法重复性在可接受范围内。此外,将制备的传感器于 0.1 mol/L PBS 溶液中 4 ℃ 放置 28 d,结果峰电流仍维持在最初峰电流的 92.6%,表明所制备的传感器具有较好的稳定性。

3 讨论

电化学传感分析是通过将分析体系中识别分子与靶分子的相互作用转化为电响应信号而实施的一类具有响应快速、灵敏度高、操作方便、成本低等优点的新型分析技术,在临床疾病的快速诊断、疗效观察等方面具有广阔的应用前景^[24-26]。

电极的组装是 DNA 甲基化分析的关键技术之一,本实验通过电沉积的方式将 AuNPs 修饰到电极表面后,末端巯基化的 DNA 探针与 AuNPs 之间形成 Au-S 键使得探针牢牢固定在电极表面,利用 MCH 封闭电极表面的空白位点,防止 DNA 非特异性吸附,靶 DNA 与探针之间则通过碱基互补配对的作用杂交形成双链 DNA,从而将靶 DNA 连接到电极表面。对电化学传感器的每一步修饰效果用 CV 进行表征,最先当电极表面修饰上 AuNPs 后,氧化还原峰电流增高,说明电沉积制备的 AuNPs 有效促进了电子转移,从而提高传感器的灵敏度。当在电极表面依次组装上探针 DNA、MCH 和靶 DNA 后,由于其带负电荷的磷酸骨架排斥溶液中同样带负电荷的粒子扩散至电极表面,所以氧化还原峰电流逐渐减小,氧化峰与还原峰之间的电位差增大。这些结果表明,各成分均成功修饰到电极上,电极组装成功。

为了提高传感器的性能,研究中对杂交时间和 5-mC 抗体浓度两个重要条件进行了优化,实验结果表明,杂交时间为 90 min 可获得最佳杂交效果,5-mC 抗体浓度为 10 mg/L 为最佳孵育条件。在此优化的条件下,本实验分析了含 1、2、3、4、5 个甲基化位点的靶 DNA,以 5-mC 抗体为捕获抗体,以 HRP 标记的抗 5-mC 抗体 IgG 作为电化学信号示踪物,结果表明,DPV 峰电流的大小是与靶 DNA 中甲基化的数量成正比的,所以该方法可用于 DNA 甲基化位点的定量分析。由于大多数报道主要通过甲基转移酶催化产生的单个甲基化位点进行检测,不能分析多个甲基化位点的 DNA 靶序列,

并且由于不同个体内环境差异可能对酶活性产生影响,因而,通过检测甲基转移酶的活性来反映甲基化水平并不是最可靠的分析手段。在本研究中,随着甲基化位点数量的增多,结合到电极表面的 HRP-IgG 就越多,因此获得的电流信号就越高,通过 DPV 峰电流大小与 DNA 甲基化位点的数量关系,实现了 DNA 甲基化位点的定量检测,线性方程为 $I(\mu\text{A}) = 1.598 N + 3.309$,相关系数为 0.991。

综上所述,本研究成功构建用于 DNA 多甲基化位点定量分析的电化学传感器,方法简单、直接、特异性好,无需重亚硫酸氢盐转化和 PCR 扩增等繁琐的步骤,有望应用于癌症和其他相关疾病的临床诊断及发病风险的评估。

4 参考文献

- [1] 王丽娟,刘家熙. 表观遗传及表观遗传学概述[J]. 生物学教学, 2017,42(1):2-4.
- [2] FARZEEN K, MEENU G. DNA methylation and application in forensic sciences [J]. Forensic Science International, 2015,249:255-265.
- [3] DIRK S. Function and information content of DNA methylation [J]. Nature, 2015,517(7534):321-326.
- [4] 陈笑,李乐赛,陈亦乐. DNA 甲基化在肿瘤诊断和治疗中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017,25(9):1476-1480.
- [5] 候海金,张振华,闫慧明. 表观遗传在肿瘤中的作用[J]. 中华临床医师杂志, 2016,10(18):2780-2783.
- [6] COPPEDE, FABIO. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: focus on DNA methylation [J]. Cancer Letters, 2014,342(2):238-247.
- [7] ANDRESEN K, BOBERG K M, VEDELD H M, et al. Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma [J]. Hepatology, 2015,61(5):1651-1659.
- [8] XU R H, WEI W, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Nature Materials, 2017,16(11):1155-1161.
- [9] JONES P A, ISSA J P J, BAYLIN S. Targeting the cancer epigenome for therapy [J]. Nature Reviews Genetics, 2016,17(10):630-641.
- [10] STIEGLITZ E, MAZOR T, OLSHEN A B, et al. Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia [J]. Nature Communications, 2017,8(1):2127-2134.
- [11] 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.
- [12] ASSENOV Y, MULLER, FABIAN, et al. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads [J]. *Nature Methods*, 2014, 11 (11): 1138 – 1140.
- [13] NAIR S S, COOLEN M W, STIZAKER C, et al. Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(1): 34 – 44.
- [14] LAIRD, PETER W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3): 191 – 203.
- [15] 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.
- [16] BECK D, SADLER-RIGGLEMAN I, SKINNER M K. Generational comparisons (F1 versus F3) of vinclozolin induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm differential DNA methylation regions (epimutations) using MeDIP-Seq [J]. *Environmental Epigenetics*, 2017, 3(3): 1 – 12.
- [17] 李博, 郑磊, 王前, 等. 电化学 DNA 生物传感器设计及在医学检验中的应用进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1): 46 – 50.
- [18] SHEN Q, HAN L, FAN G, et al. Highly sensitive photo-electrochemical assay for DNA methyltransferase activity and inhibitor screening by exciton energy transfer coupled with enzyme cleavage biosensing strategy [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 449 – 455.
- [19] PENG X, HU T, BAO T, et al. A label-free electrochemical biosensor for methyltransferase activity detection and inhibitor screening based on graphene quantum dot and enzyme-catalyzed reaction [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2017, 799: 327 – 332.
- [20] YIN H, ZHOU Y, XU Z, et al. An electrochemical assay for DNA methylation, methyltransferase activity and inhibitor screening based on methyl binding domain protein [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41(1): 492 – 497.
- [21] BAO J, GENG X, HOU C, et al. A simple and universal electrochemical assay for sensitive detection of DNA methylation, methyltransferase activity and screening of inhibitors [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, 814: 144 – 152.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] LU D Q, XU Q D, PANG G C, et al. A novel electrochemical immunosensor based on Au nanoparticles and horseradish peroxidase signal amplification for ultrasensitive detection of α -fetoprotein [J]. *Biomedical Microdevices*, 2018, 20 (2): 46 – 56.
- [25] GAO F, FAN T, OU S, et al. Highly efficient electrochemical sensing platform for sensitive detection DNA methylation, and methyltransferase activity based on Ag-NPs decorated carbon nanocubes [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 201 – 208.
- [26] HUANG J, ZHANG S, MO F, et al. An electrochemical DNA biosensor analytic technique for identifying DNA methylation specific sites and quantify DNA methylation level [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 127: 155 – 160.

(2019-09-03 收稿, 2019-10-29 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 冉海勇