

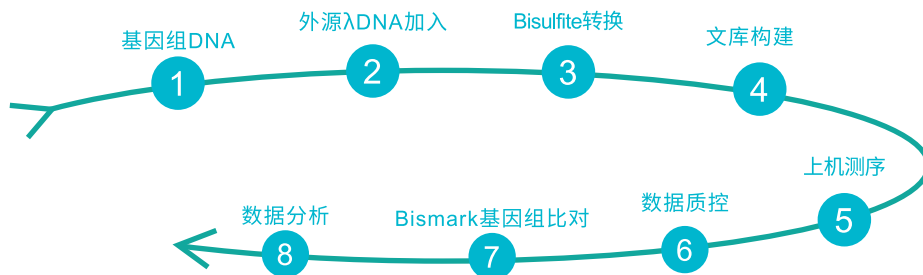
WGBS 测序解决方案

全基因组DNA甲基化测序 (Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS) 被视为DNA甲基化研究的“金标准”，结合重亚硫酸盐 (Bisulfite) 处理和高通量测序技术，实现全基因组范围内单个C碱基的甲基化分析，适用于全基因组精细甲基化图谱的构建。通过研究DNA甲基化与肿瘤、神经变性疾病和自身免疫性疾病等的相关性，以及胚胎发育、基因印迹和X染色体失活等过程，探讨表观遗传学研究的重要意义。

锐博技术特色

- 平台完整：从样本处理、建库、测序到生物信息学分析提供一站式优秀服务
- 精确度高：成熟的甲基化转化处理技术，精确实现单个C碱基甲基化状态分析
- 覆盖范围广：可在全基因组水平上实现甲基化位点检测
- 重复性好：稳定处理，适用于多样本间的比较分析

项目流程



数据分析

标准信息分析

数据质量评估及QC
基因组比对
测序深度和覆盖度统计
数据的可视化
甲基化位点检测质控
甲基化位点检测及统计

甲基化位点附近序列特征检测
样本相关性分析
PCA分析
差异甲基化位点分析
差异甲基化区域分析
差异甲基化启动子分析

高级信息分析

特定区域甲基化数据的可视化
与其他数据关联分析
其他定制化分析

生物信息分析软件

分析内容	分析软件
数据质控	Trimmomatic
序列比对及统计	Bismark, bowtie2, samtools, circos
甲基化注释	ANNOVAR
序列特征检测	MEME
差异甲基化检测	MethylKit, eDMR
GO 和 KEGG 分析	KOBAS

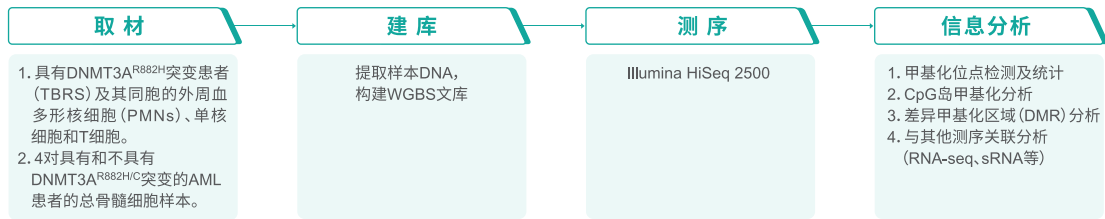
推荐测序模式：HiSeq, 测序深度30×

【案例一】DNMT3A介导的CpG岛高甲基化是AML进展的结果

【研究背景】

表观遗传状态的改变是所有癌症类型的共同特征。在原发癌症样品中，最深入研究的表观遗传修饰是DNA甲基化。DNA甲基化全基因组研究显示癌症相关的甲基化变化是普遍的。在约25%的急性髓性白血病(AML)患者中发生了DNMT3A突变。最常见的突变DNMT3A^{R882H}具有显性失活活性，在体外可将DNA甲基化活性降低约80%。然而，关于DNMT3A如何在AML样本中形成特定的甲基化模式，以及在具有DNMT3A^{R882H}的AML中低甲基化相关的基因组环境仍然知之甚少。此外，DNMT3A突变或DNMT3A依赖性DNA甲基化改变对白血病发展的作用机制目前尚不清楚。

【方法流程】



【研究结果】

(1) 具有组成性DNMT3A^{R882H}突变患者的非白血病造血细胞中发生局部甲基化丢失

对具有DNMT3A^{R882H}突变患者(TBRS)的外周血多形核细胞(PMNs)、单核细胞和T细胞进行WGBS甲基化分析。发现所有测量的CpGs显著降低。此外，在TBRS患者与其同胞间的三种外周血细胞中鉴定了4054个DMRs。这些DMRs中，99%在TBRS患者中低甲基化，证实DNMT3A^{R882H}等位基因损害原代造血细胞中的DNA甲基化。另外，DMRs的甲基化模式在三种细胞中高度保守，TBRS患者具有低甲基化值，其同胞的所有细胞类型具有较高的甲基化值。

(2) DNMT3A^{R882H/C}对AML细胞DNA甲基化的作用

对具有和不具有DNMT3A^{R882H/C}突变的AML患者的骨髓细胞进行WGBS。发现所有AML样本在所有测量的CpGs中都有相似的甲基化分布和平均甲基化值，两个AML组均显示

出比正常CD34细胞更低的总甲基化程度，与CD34细胞相比，具有野生型DNMT3A的AML在CpG岛中显著高甲基化，而DNMT3A^{R882H/C}AML在CpG岛岸处被低甲基化。在DNMT3A^{R882H/C}和DNMT3A^{WT} AML样本中鉴定了3898个常染色体DMRs，99%的DMRs在DNMT3A^{R882H/C} AMLs中低甲基化。AML DMRs高度富集于CpG密集区域。

(3) DNMT3A介导的CpG岛高甲基化

研究发现几乎所有具有野生型DNMT3A的AMLs显示出CpG岛高甲基化，但这种变化与基因沉默无关，并且在具有DNMT3A^{R882H}突变的AML中基本不存在。原发性造血干细胞在细胞因子的作用下以DNMT3A依赖性方式进行高甲基化，表明高甲基化可能是对细胞增殖的反应，而不是细胞增殖的原因。进一步说明DNMT3A依赖性CpG岛高甲基化是AML进展的结果。

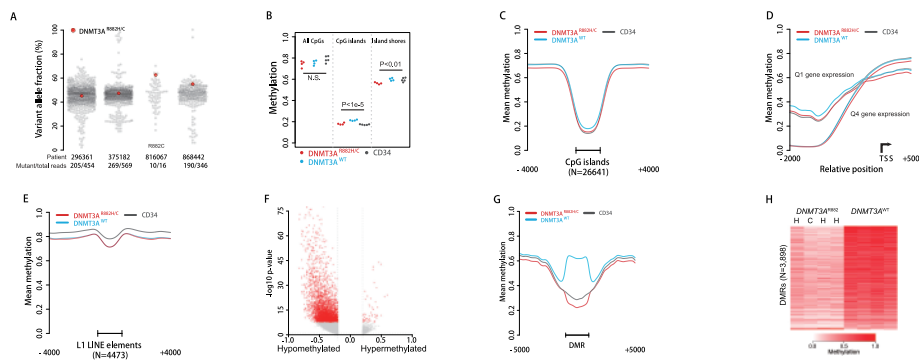


图1.具有和不具有DNMT3A^{R882H}或DNMT3A^{R882C}突变的原发性AML样品的WGBS测序

【参考文献】

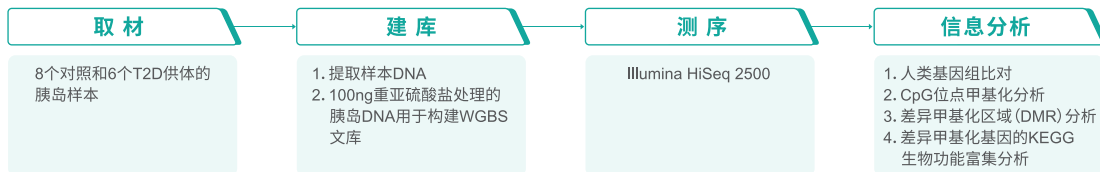
Spencer D H, Russler-Germain D A, Ketkar S, *et al.* CpG Island hypermethylation mediated by DNMT3A is a consequence of AML progression[J]. *Cell*, 2017, 168(5): 801-816. e13. IF: 30.41

【案例二】人类胰岛细胞WGBS测序揭示2型糖尿病发病机制中新的差异甲基化区域

【研究背景】

胰岛素分泌受损是2型糖尿病(T2D)的关键特征。然而，T2D中胰岛功能障碍的分子机制在很大程度上是未知的。因此，必须寻找其他能揭示致病机制的方法。鉴于环境因素在T2D发病机制中的重要作用，介导基因-环境相互作用的机制(如表观遗传学)可能具有特别重要的意义。在原发性致病重要组织中(胰岛细胞)研究表观遗传过程可能揭示T2D的中心机制。已经鉴定了来自人类T2D供体胰岛中DNA甲基化的改变。然而，以前使用的方法只覆盖了大约1.5%的基因组CpG位点。为了获得更完整的人类胰岛甲基化组图谱，并进一步分析表观遗传学对T2D的影响，需要对大部分CpG位点进行分析。

【方法流程】



【研究结果】

(1) 人类T2D胰岛细胞中的DMRs

在T2D胰岛细胞中鉴定了25820个DMRs。其中13696个DMRs显示甲基化水平增加，12124个甲基化水平下降。ARX和TFAM是具有最大甲基化差异的区域。其中两个最重要的DMRs覆盖了164和105个CpG位点，它们跨越了3301和2676 bp的PDX1(关键胰岛转录因子)区域。159个胰岛DMRs注释到43个已知的T2D候选基因。糖尿病患者和对照组之间甲基化最大差异的DMR位于ADCY5。具有最高数目的DMRs的T2D候选基因是GLIS3、THADA、KCNQ1和TCF7L2。

(2) T2D相关胰岛DMRs分布

发现有~55% T2D相关胰岛DMRs位于TSS 50kb内，有~1.5%位于TSS 1500bp内，并且有~1.0%位于TSS 200bp内。此外，所有DMRs的~1.4%位于第1外显子，~3.0%位于后续外显子，~20%位于内含子，而~12.5%DMRs位于TES 10kb内。此外，由ChIP-seq鉴定的胰岛特异性转录因子、

增强子区域和不同组蛋白标记的结合位点在T2D相关DMRs中富集。

(3) 注释到T2D相关DMRs的基因异常表达

鉴定了457个基因，其在T2D胰岛中具有显著的表达改变和DMR(s)。这些基因包括对胰岛功能和新陈代谢很重要的基因，如NR4A3、PARK2、PID1、SLC2A2和SOCS2。此外，26个基因表现出差异表达和甲基化差异 $\geq 10\%$ 的DMR(s)。为了模拟T2D胰岛的情况，在培养的 β 细胞中过表达或沉默候选基因，会导致胰岛素分泌受损，从而将差异甲基化与胰岛功能障碍联系起来。

(4) 人类胰岛甲基化组

进一步研究人类胰岛甲基化组，发现甲基化水平和组蛋白标记之间的强烈联系。另外，不同基因组区域和不同转录物类型(即蛋白质编码，非编码和假基因)的DNA甲基化与胰岛表达水平相关。

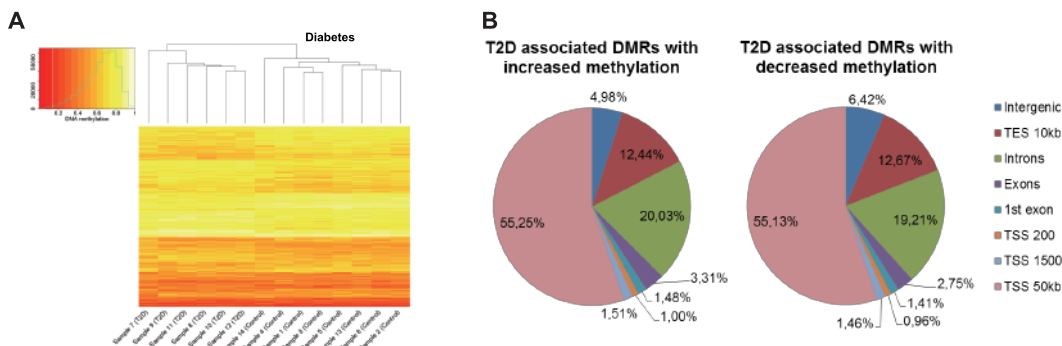


图2. T2D相关DMRs及其基因组分布

【参考文献】

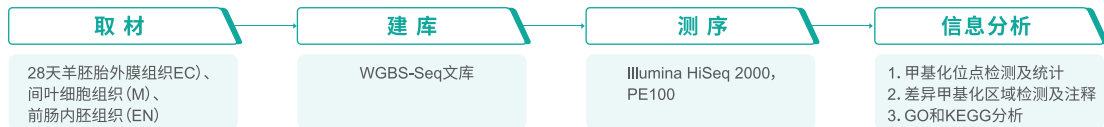
Volkov P, Bacos K, Ofori J K, *et al.* Whole-genome bisulfite sequencing of human pancreatic islets reveals novel differentially methylated regions in type 2 diabetes pathogenesis[J]. *Diabetes*, 2017: db160996. IF: 8.684

【案例三】羊不同胚层全基因组甲基化特征鉴定

【研究背景】

哺乳动物基因组CpG甲基化是一种可遗传的表观遗传标记,同时也是联系环境与基因功能间的重要媒介。在胚胎编程过程中,表观遗传修饰对维持胚胎不同胚层正确生长发育以及分化成不同的组织和器官意义重大。绵羊胚胎的发育、人类,本文选择孕羊研究胚胎编程、胚胎发育、生存代谢和营养。外部因素如发育过程中的营养状况的改变,均会导致表观遗传修饰变化甚至引起表型变异,可在一定程度上预测育种值和表型间的关系,依此改善畜牧业的繁殖和管理。

【方法流程】



【研究结果】

(1) 不同胚胎组织甲基化修饰检测

对EC、M和EN组织进行全基因组甲基化测序,检测到163209个甲基化区域(MRs),其中1459个MRs比对到CpG岛(CGI)。根据CpG甲基化频率,基因和3'UTR区普遍存在高甲基化,而5'UTR和CGI区有较高比例的低甲基化区域。CGI shore和shelve的CpG甲基化程度随着远离CGIs而升高,其中EC组织中的甲基化程度较低。有趣的是,797个低甲基化区域(约84.4%)在三种组织中保守,而高甲基化的CGIs的保守较低(约32.0%)。

(2) 不同组织间差异甲基化区域分析

三种不同胚胎组织间,20.2%的CGIs甲基化水平存在差异。差异CGIs中28.8%定位在TSSs附近(±2 Kb),而46.1%

定位于基因内。全基因组甲基化分析表明,差异CpG甲基化主要发生在基因内、5'UTR和3'UTR(分别对应7.2%、11.1%和10.9%,DMR/MRs)。对不同组织CGIs、gene body区、5'UTR和3'UTR中最重要的差异甲基化区域(DMRs)进行聚类分析。

(3) 相关信号通路分析

4554个DMRs被注释到2695个差异甲基化基因(DMGs)。对DMGs做通路分析,gene body区存在CpG甲基化差异的基因积极参与组织成形和发育,如多细胞生物信号、细胞-细胞连接组装和组织、心肌发育、轴突导向和突触组织。而CGIs中CpG甲基化最为频繁的基因则与神经系统调节密切相关。

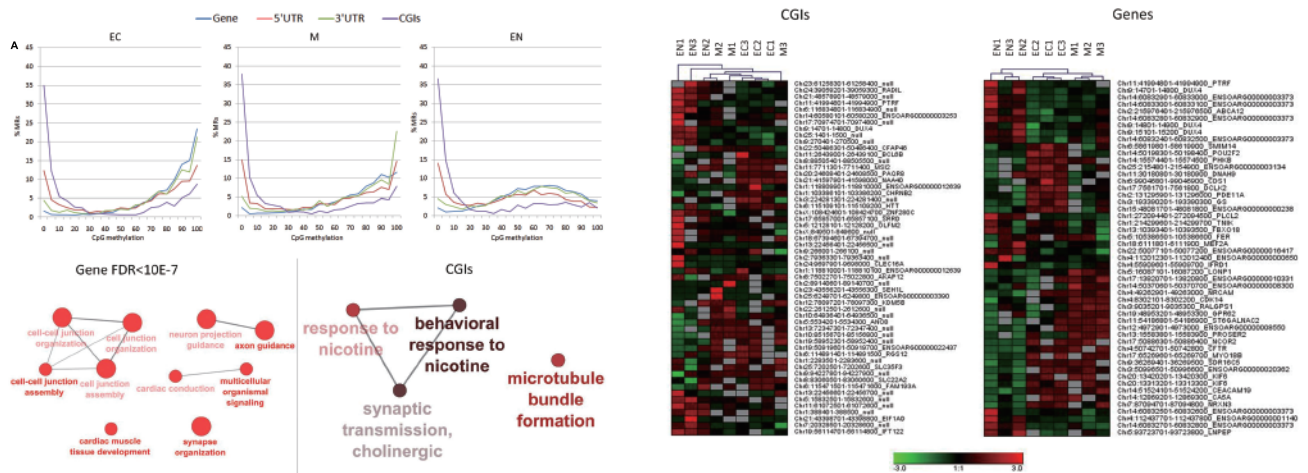


图3. DNA甲基化修饰特征及参与的信号通路

【参考文献】

Capra E, Toschi P, Del Corvo M, et al. Genome-Wide Epigenetic Characterization of Tissues from Three Germ Layers Isolated from Sheep Fetuses[J]. *Frontiers in genetics*, 2017, 8: 115. IF: 3.789

