

服 务 科 技 创 新 护 航 人 类 健 康

Enzymatic methyl sequencing(EM-seq)  
boosts methylation studies in cell-free DNA

# EM-seq甲基化测序助力 Cell-free DNA甲基化研究

—液体活检新时代



上海伯豪生物技术有限公司  
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

# METHYLATION SEQUENCING: CONVERSION AND CAPTURE



## 目录

---

技术参数	02
实验流程	02
实验原理	03
样本要求	04
分析流程	04
各甲基化平台比较	05
结果展示 (ctDNA)	05
测试结果	06
EM-seq应用案例	07

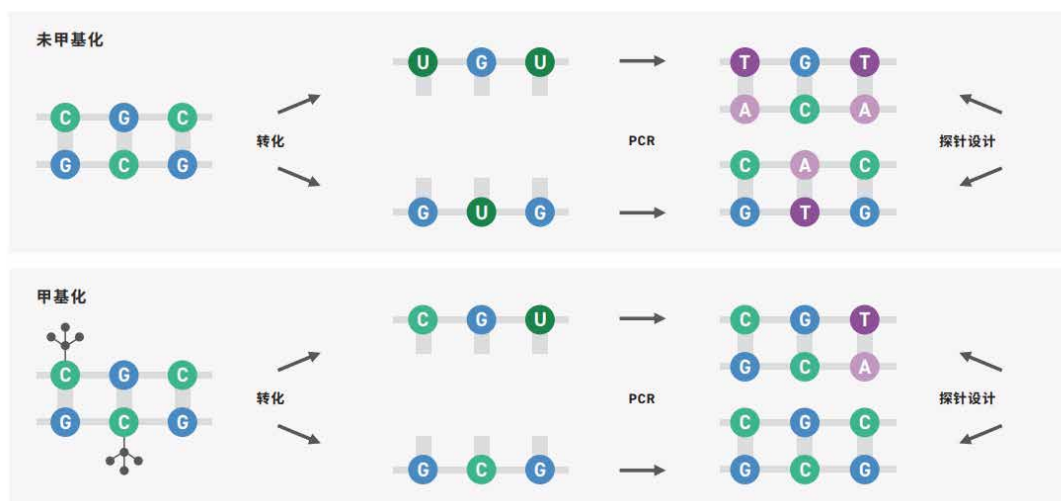
# 前言

人类基因组测序开展的数十年以来,研究人员建立了遗传因素与许多疾病之间的联系。但是,编码基因组DNA的核苷酸只是遗传因素中影响细胞功能和整体健康的一部分,表观遗传学(指在某些情况下不修改DNA序列而发生的可遗传的改变)也具有重要功能。DNA甲基化是一种已经过充分研究的表观遗传学标记,其可化学修饰胞嘧啶和腺嘌呤。胞嘧啶甲基化最常发生在基因组中的CG序列,称为CpG位点,它以细胞特异性的方式广泛地调控基因表达。全基因组关联研究(GWAS)将DNA甲基化的改变与复杂疾病例如癌症和肥胖以及复杂的生物学状态例如衰老和发育联系起来<sup>[1,2]</sup>。近年来,甲基化测序已扩展到基因表达之外,开始在疾病诊断中获得关注<sup>[1,3-5]</sup>。最近研究表明差异甲基化是癌症检测中信息丰富且灵敏的标记,不论甲基化是否与基因表达相关<sup>[6]</sup>。

目前,DNA甲基化在癌症液体活检(如cfDNA)中已经有很多相关研究,并受到越来越多的关注。常见的DNA甲基化研究手段都是基于亚硫酸氢盐(化学试剂)的转化,这种方法非常剧烈,对DNA损伤严重,对DNA起始量有着较高要求。而血液cfDNA的含量通常很低,只有几十ng,普通的亚硫酸氢盐测序手段很满足。因此伯豪生物引进EM-seq(Enzymatic methyl sequencing),该技术基于酶学温和转化,可实现DNA甲基化位点的单碱基分辨率,适用于癌症早筛液体活检样本的标志物研究(如:血浆cfDNA,尿液cfDNA,脑脊液cfDNA等)也适用于研究细胞分化的单个细胞超微量样本(如:卵母细胞,精母细胞,胚胎等)。

EM-seq提供了稳健的全流程完整解决方案,用于识别人类基因组中的甲基化区域。文库制备过程中,采用独特的酶促转化,它对脱氧核糖核酸(DNA)的损害小得多,需要的样本输入更少,从而获得更高质量、性能更好的文库。Twist自定义甲基化探针组合设计为CpG检测提供了特别高效的探针,用于靶向富集。优化的杂交试剂增加了工作流程的时间灵活性,并提高了中靶率。

甲基化测序涉及酶或化学方法,这些方法可使未甲基化的胞嘧啶通过一系列反应,最终通过脱氨基基转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则保持完整(图1)。在扩增过程中,尿嘧啶对应的互补链上会互补配对加上腺嘌呤,造成未甲基化的胞嘧啶的原始位置引入胸腺嘧啶。如图所示序列终产物是不对称的,转化后形成两条不同的双链DNA分子(图上);对于甲基化的DNA,同样的过程则产生另外不同序列(图下)。



## 01 技术参数

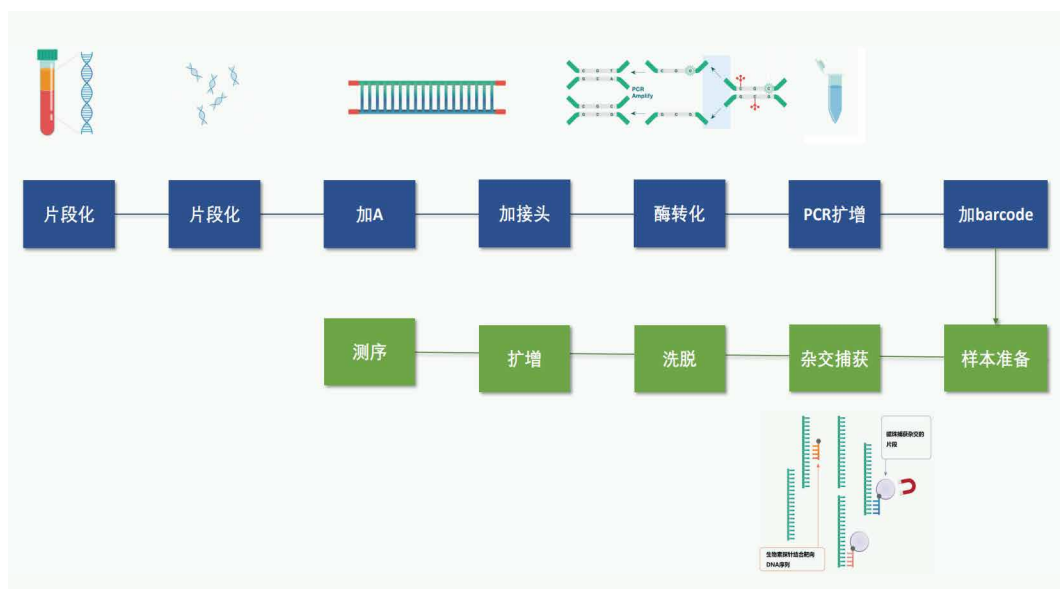
### 产品优势

- 酶转化最大限度降低DNA损坏, 超低DNA起始量要求, 低至10ng;
- 卓越的比对率, GC均一性;
- 高灵敏度, 分辨率可达到单个碱基;
- 相比亚硫酸氢盐方法检测可多检测15%的甲基化位点;
- 灵活适用不同靶向区域。

### 目录化产品

- 人 (hg38) 的134Mb设计长度 (覆盖约400万 CpG位点), 基于最新的UCSC, Ensembl, ENCODE等最新的数据库, 关注那些已知甲基化可影响基因调节的区域: 57% CpG open seas (interCGI), 21% CpG island shores, 15% CpG islands, 8% CpG island shelves。

## 02 实验流程



### 03 实验原理

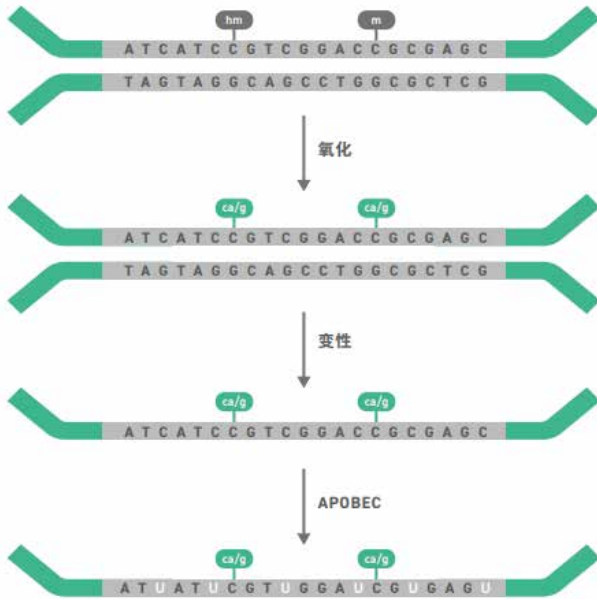
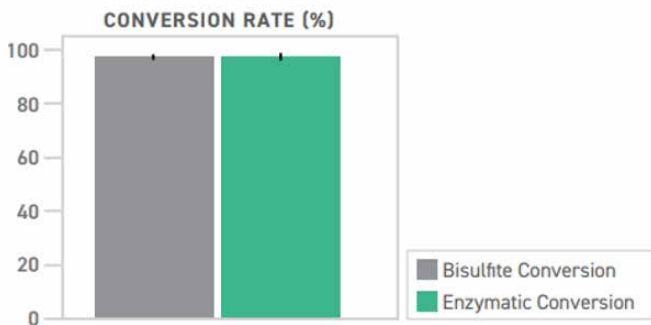


图.EM-seq转化涉及一系列酶反应,以识别未甲基化胞嘧啶。在第一次反应期间,10-11易位双加氧酶2(TET2)将甲基化胞嘧啶(5mC和5hmC)转化为5-羧基胞嘧啶(5caC)以及氧化增强剂葡糖苷酸5hmC(5ghmC)。这些反应保护5mC和5hmC免受下游脱氨作用。然后,在APOBEC将胞嘧啶脱氨至尿嘧啶之前,使DNA变性。随后的聚合酶链式反应(PCR)扩增将修饰的5mC或5hmC转化为胞嘧啶,并将尿嘧啶转化为胸腺嘧啶。PCR后,核苷酸序列与重亚硫酸盐转化的序列一致,使得EM-seq与现有分析流程(如Bismark和bwa-meth)相兼容。

#### 酶法的高效转化

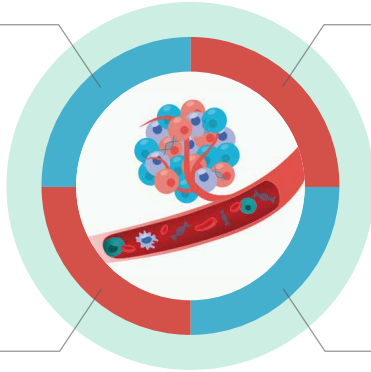
指标	未甲基化 Lambda DNA	CpG 甲基化 pUC19 DNA
预期转化效率	>=99.5%	>=99.5%
实测转化效率	99.77%	99.57%
预期 CpG 甲基化水平	约0.5%	95-98%
实测 CpG 甲基化水平	0.22228%	95.7572%



在EM-seq和BS-seq中,酶和亚硫酸氢盐都是将未甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶,且转化效率接近。选择CpG甲基化的pUC19 DNA和未甲基化的Lambda DNA这种已知甲基化DNA作为质控对象,结果显示,两种文库转换方法的转化率均达到99.5%,以胞嘧啶在非CpG位点转化为胸腺嘧啶的百分比来测量。

## 04 样本要求

**样本类型:**人, 尤其适用液体活检样本, 比如血浆, 尿液, 脑脊液, 唾液等, 同样也适用FFPE, 单细胞样本这类微量样本。

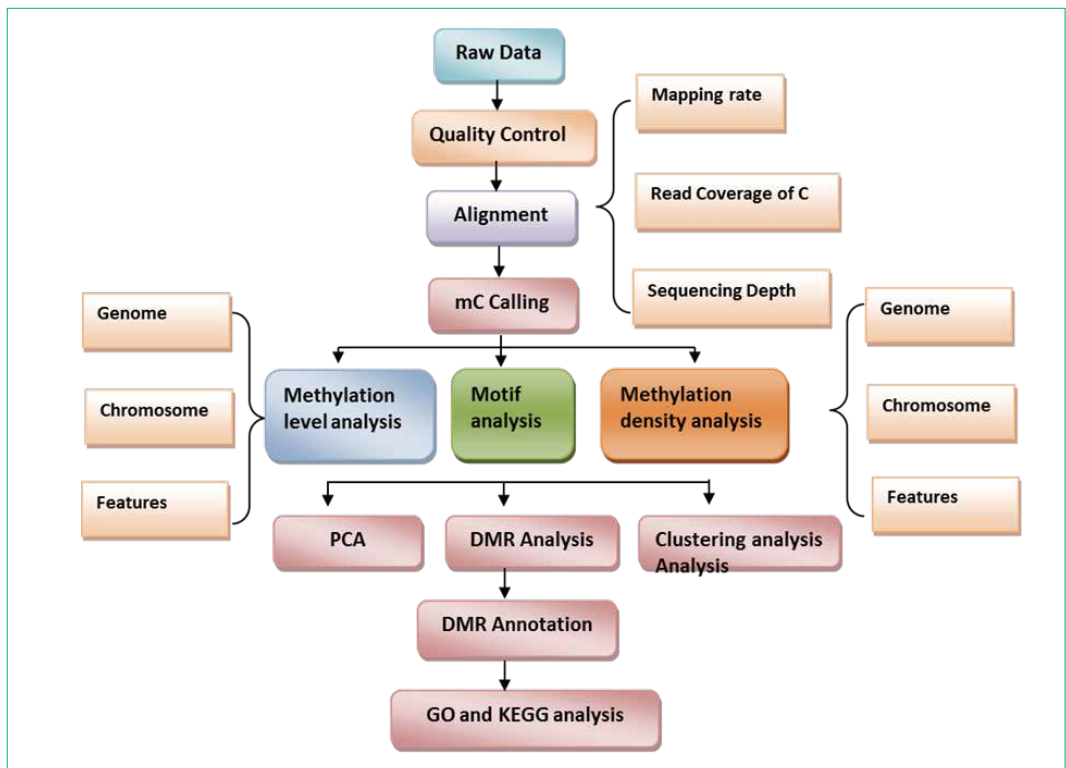


**样本收集:**由于肿瘤释放的cfDNA的含量低, 半衰期短, 稳定性差等特点。建议采集样品时要采用含固定剂的专用cfDNA收集管(10ml), 以稳定cfDNA, 4°C低温保存, 48h内分离血浆, -80°C长期储存。

**样品总量:**每个样品DNA起始总量不低于10ng。

**样品浓度:**使用Qubit准确定量DNA浓度。

## 05 分析流程



## 06 各甲基化平台比较

项目类别	平台	特点	数据量	位点 (10X)	起始量(μg)	周期 (工作日)	技术原理	样本要求 (建议)
850K	芯片	单碱基分辨率	/	86万	0.25	10	亚硫酸氢盐转化	8的倍数
WGBS	高通量测序	单碱基分辨率	90G	500万	1	30	亚硫酸氢盐转化	/
MC-seq	高通量测序	单碱基分辨率	20G	270万 (84M)	1	20	亚硫酸氢盐转化	/
EM-SEQ	高通量测序	单碱基分辨率	25G	400万 (134M)	0.01	20	Enzya	/
scWGBS	高通量测序	单碱基分辨率	15G	500万	0.01	30	亚硫酸氢盐转化	/
Pyrosequencing	一代测序	单碱基分辨率	50-90 bp	/	0.5	20	亚硫酸氢盐转化	/

## 07 结果展示 (ctDNA)

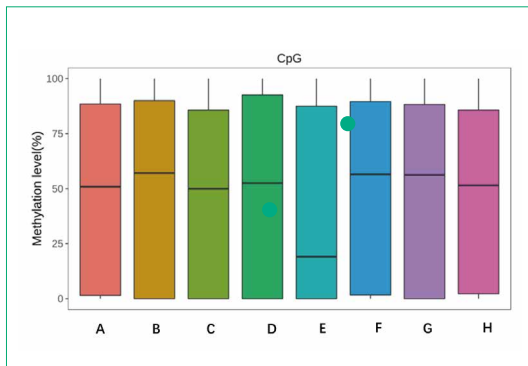


图 所有样本整体甲基化水平展示

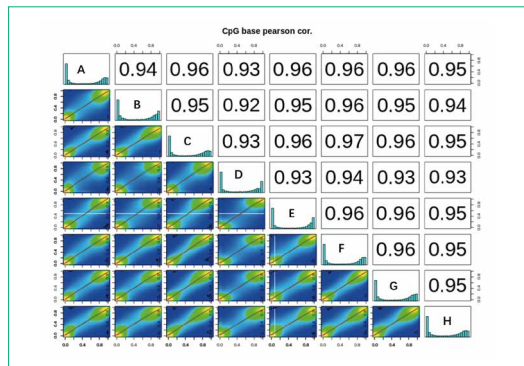


图 样品间的相关性分析

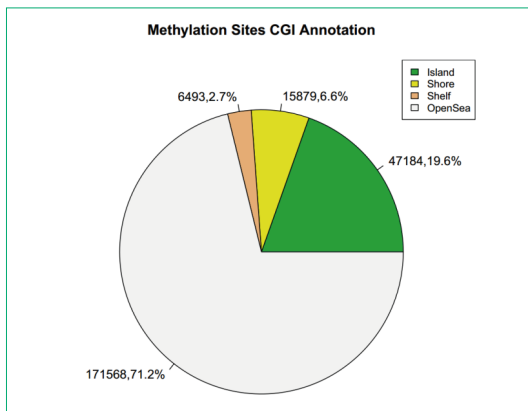


图 差异位点的饼图展示

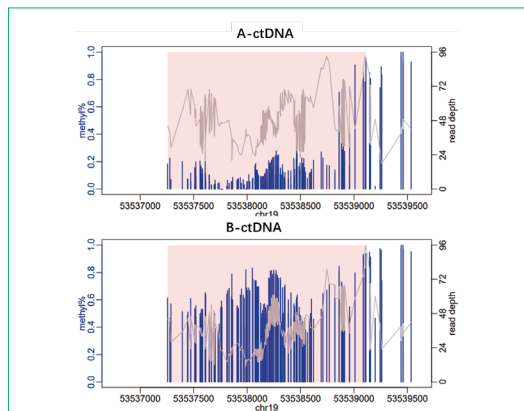
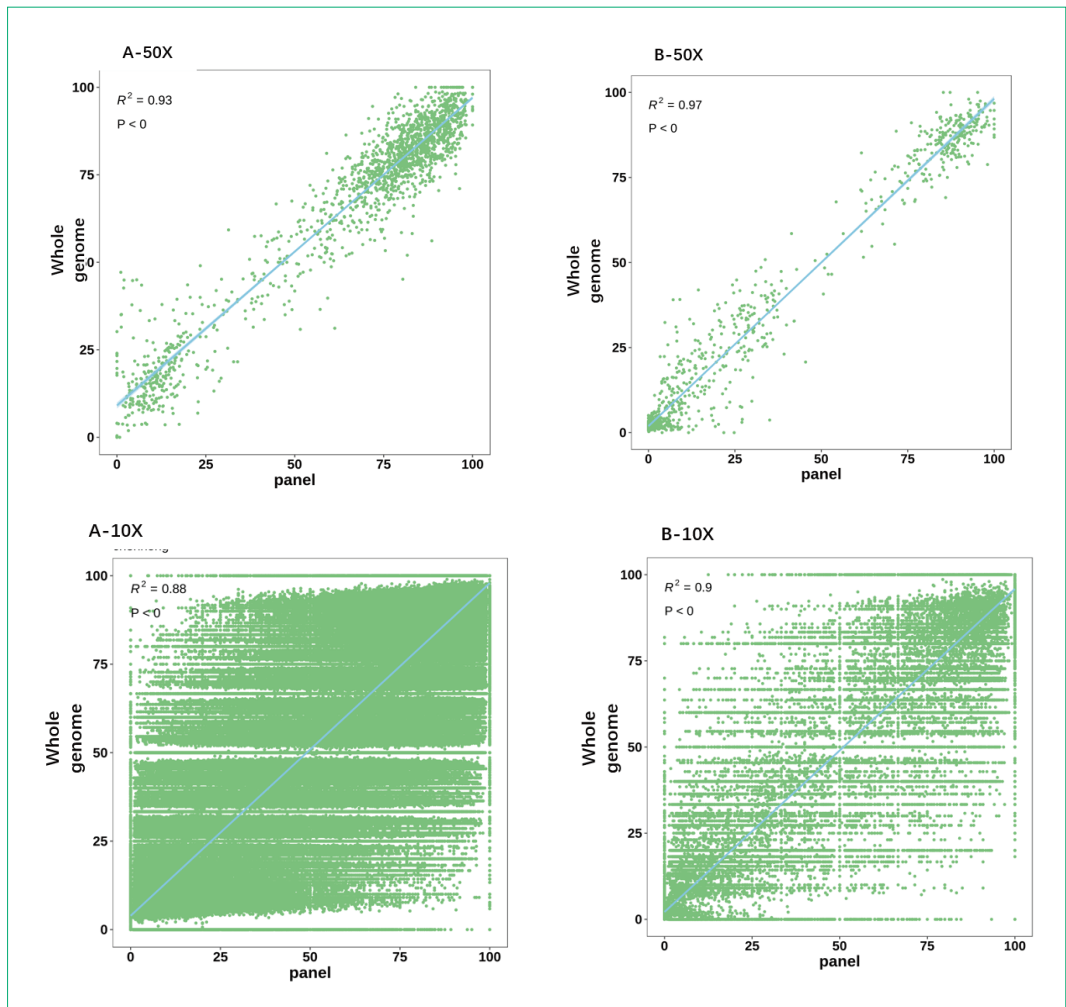


图 ctDNA样本差异甲基化区域的展示

## 08 测试结果

表 质控数据展示

样本名称	DNA类型	总量( $\mu\text{g}$ )	实测数据量	Q20	有效数据	比对率	冗余度	覆盖率	捕获效率	平均深度	CpG Methylated ratio	CHG Methylated ratio	CHH Methylated ratio
1	cfDNA	0.04	20.08	0.95	99.63%	81.25%	20.04%	99.24%	74.15%	104.87	48.40%	1.00%	0.80%
2	cfDNA	0.04	20.04	0.95	99.59%	81.17%	21.47%	99.07%	72.62%	55.43	50.40%	1.70%	1.50%
3	cfDNA	0.05	16.58	0.95	99.65%	81.97%	20.76%	99.25%	74.51%	96.93	48.00%	1.00%	0.90%
4	cfDNA	0.05	21.65	0.95	99.63%	81.77%	22.73%	99.26%	76.01%	79.53	48.20%	0.90%	0.80%
5	cfDNA	0.02	11.80	0.95	99.74%	80.65%	13.85%	99.27%	72.78%	38.7	40.40%	0.60%	0.60%
6	cfDNA	0.03	22.85	0.95	99.63%	81.81%	22.54%	99.35%	73.53%	109.14	51.00%	1.00%	0.90%
7	gDNA	0.89	8.64	0.95	99.64%	81.87%	26.51%	99.22%	75.17%	81.04	49.90%	0.90%	0.80%
8	cfDNA	0.99	16.15	0.95	99.67%	81.47%	23.94%	99.18%	74.74%	97.05	49.50%	1.00%	0.90%



同一个样本,基于WGBS和 EM-seq(panel)的共有位点,分析甲基化水平的相关性,两个样本的相关性都在0.9以上,说明基于酶学的转化,和twist EM-seq(panel)的结果相对稳定。随着覆盖深度的加深,相关性也呈现递增的趋势。

## 09 EM-seq应用案例



### ORIGINAL ARTICLE

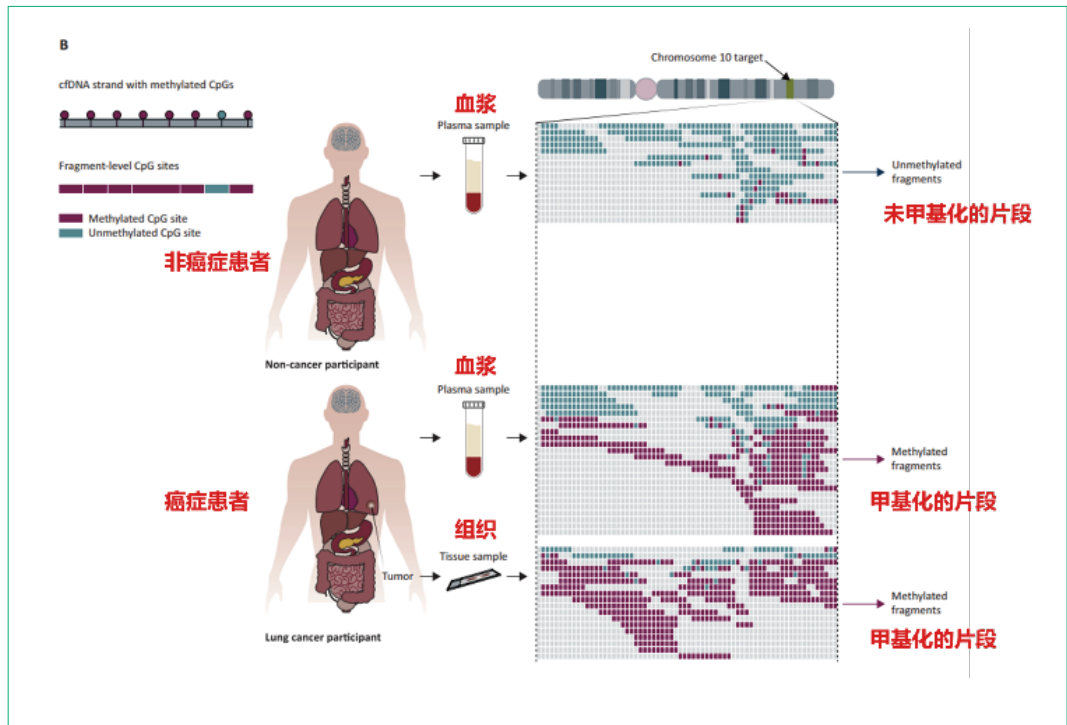
## Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA

时间: 2020年6月

杂志: Ann Oncol. 32:976

单位: 美国梅奥诊所

研究人员对1500名癌症患者和1500名健康对照血液样本的cfDNA使用靶向EM-seq方法进行甲基化分析, 建立一种高效的利用血液检测癌症的系统。然后使用该系统分析了650例癌症患者和610例非癌症患者的血液样本。结果表明, 该系统在鉴别出癌症方面的特异性为99.3%, 这意味着仅0.7%的非癌症患者被误认为罹患癌症。目前, 为了检测该系统的可靠性, 研究人员计划在未来在更大范围的人群中使用该方法<sup>[7]</sup>。



Method

## Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA

Romualdas Vaisvila,<sup>1</sup> V.K. Chaithanya Ponnaluri,<sup>1</sup> Zhiyi Sun,<sup>1</sup> Bradley W. Langhorst, Lana Saleh, Shengxi Guan, Nan Dai, Matthew A. Campbell, Brittany S. Sexton, Katherine Marks, Mala Samaranyake, James C. Samuelson, Heidi E. Church, Esta Tamanaha, Ivan R. Corrêa Jr., Sriharsa Pradhan, Eileen T. Dimalanta, Thomas C. Evans Jr., Louise Williams, and Theodore B. Davis

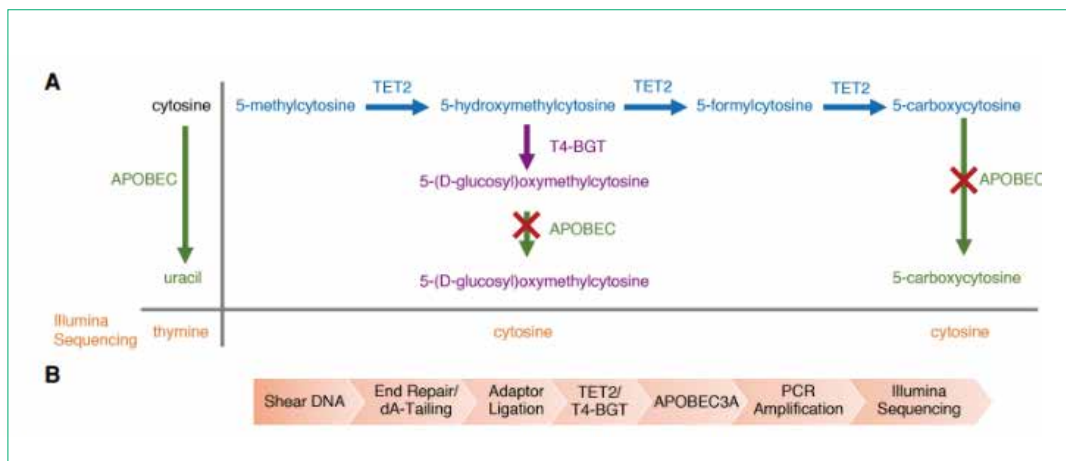
New England Biolabs, Incorporated, Ipswich, Massachusetts 01938, USA

时间:2022年2月

杂志: Genome Res. 9.043

单位: New England Biolabs

亚硫酸氢盐测序在单碱基分辨率下检测5mC和5hmC。然而,亚硫酸氢盐处理会损伤DNA,导致DNA片段化、DNA丢失和测序数据偏差。为了克服这些问题,作者开发了EM-seq。该方法利用两组酶促反应检测5mC和5hmC。在第一个反应中,TET2和T4-BGT将5mC和5hmC转化为APOBEC3A不能脱氨基的产物。在第二种反应中,APOBEC3A通过将未修饰的胞嘧啶转化为尿嘧啶使其脱氨。因此,这三种酶都可以鉴定5mC和5hmC。将EM-seq文库与亚硫酸盐转化的DNA进行比较,并在转化前将每种文库类型连接到Illumina适配器。使用NA12878基因组DNA、细胞游离DNA和FFPE DNA在一系列DNA输入中建立文库。EM-seq文库中检测到的5mC和5hmC与亚硫酸氢盐文库中检测到的5mC相似。然而,使用EM-seq制作的库在所有检测的具体指标(覆盖率、重复、灵敏度等)上都优于亚硫酸氢盐转换库。EM-seq库显示了均匀的GC分布,更好的DNA输入相关性,基因组特征中CpGs的数量增加,以及胞嘧啶甲基化调用的准确性。EM-seq仅使用100pg的DNA就能有效地进行测序,而且这些文库保持了亚硫酸氢盐测序的优势。EM序列文库的构建,使用具有挑战性的样本和较低的DNA输入,为研究和临床应用开辟了新的途径<sup>[8]</sup>。



## 10 参考文献

- ① Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484-492.
- ② Yang X, Shao X, Gao L, Zhang S. Comparative DNA methylation analysis to decipher common and cell type-specific patterns among multiple cell types. *Brief Funct Genomics* 2016; 15: 399-407.
- ③ Loh M, Zhou L, Ng HK, Chambers JC. Epigenetic disturbances in obesity and diabetes: Epidemiological and functional insights. *Mol Metab* 2019; 27S: S33-S41.
- ④ Ferrucci L, Gonzalez-Freire M, Fabbri E et al. Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell* 2020; 19: e13080.
- ⑤ Perez RF, Santamarina P, Tejedor JR et al. Longitudinal genome-wide DNA methylation analysis uncovers persistent early-life DNA methylation changes. *J Transl Med* 2019; 17: 15.
- ⑥ Locke WJ, Guanzon D, Ma C et al. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front Genet* 2019; 10: 1150.
- ⑦ Liu MC, Oxnard GR, Klein EA et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol* 2020; 31: 745-759.
- ⑧ Vaisvila R, Ponnaluri VKC, Sun Z et al. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res* 2021.



更多详情请咨询当地销售  
或拨打:400-820-3699



**上海伯豪生物技术有限公司**

地址:中国(上海)自由贸易试验区蔡伦路999号1号楼5楼

电话:400-820-3699

邮箱:market@shbio.com

网址:www.shbio.com