



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105223346 A

(43) 申请公布日 2016.01.06

(21) 申请号 201410265710.7

(22) 申请日 2014.06.16

(71) 申请人 北京雅康博生物科技有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地北清路
103号C座207室

(72) 发明人 陈钊 莫敏俐 李晖 李隽 丁凤

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

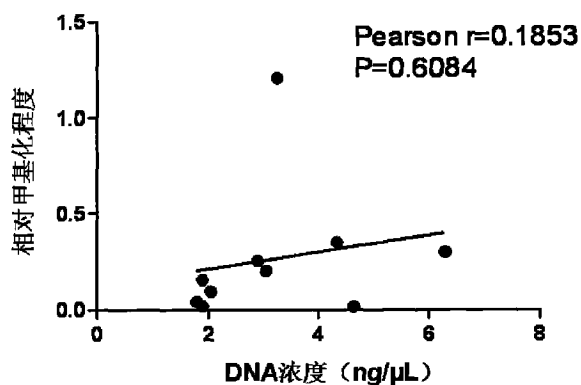
权利要求书2页 说明书6页 附图10页

(54) 发明名称

检测 DNA 甲基化的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种检测 DNA 甲基化的方法和试剂盒。具体地说,本发明的方法采用酶联免疫吸附测定 (ELISA),对来源于细胞、组织、血清中 DNA 的整体甲基化程度进行测定,操作简单,重复性好, DNA 用量少 (可检测至 ng 级),定量计算方便,能够实现高通量检测。



1. 一种检测 DNA 甲基化的方法,其包括:
 - (1) 提取、限制性内切酶处理、纯化基因组 DNA;
 - (2) 将 DNA 变性后加入封闭液;
 - (3) 用抗甲基胞嘧啶抗体包被 ELISA 实验板;
 - (4) 弃去包被抗体,在实验板的每个孔中加入封闭液;
 - (5) 弃去封闭液,加入预混的封闭液与 DNA 样品;
 - (6) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入抗单链 DNA 抗体;
 - (7) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入二抗;
 - (8) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入 TMB 底物;
 - (9) 加入硫酸溶液后用酶标仪读数;
 - (10) 根据用基因组 DNA 标准品制得的标准曲线,计算出样本的相对 DNA 甲基化程度。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述限制性内切酶是 MseI。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述封闭液是 PBS+3% BSA+0.05% Triton X-100。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体是 Santa Cruz#sc-56615。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体的浓度是 1 ~ 10 μ g/mL。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体的浓度是 5 μ g/mL。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述抗单链 DNA 抗体是 IBL code#18731。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗单链 DNA 抗体的浓度是 0.1 ~ 1 μ g/mL。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述抗单链 DNA 抗体的浓度是 0.5 μ g/mL。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述二抗是偶联辣根过氧化物酶的抗兔源 IgG 的抗体。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述 TMB 底物是 PIERCE#34028。
12. 一种检测 DNA 甲基化的试剂盒,其包括:
 - (1) 封闭液;
 - (2) 抗甲基胞嘧啶抗体;
 - (3) 抗单链 DNA 抗体;
 - (4) 二抗;
 - (5) TMB 底物;
 - (6) 2M 硫酸;以及
 - (7) PBS 溶液。
13. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述封闭液是 PBS+3% BSA+0.05% Triton X-100。
14. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体是 Santa Cruz#sc-56615。
15. 权利要求 14 的试剂盒,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体的浓度是 1 ~ 10 μ g/mL。
16. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述抗甲基胞嘧啶抗体的浓度是 5 μ g/mL。
17. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述抗单链 DNA 抗体是 IBL code#18731。
18. 权利要求 17 的试剂盒,其中所述抗单链 DNA 抗体的浓度是 0.1 ~ 1 μ g/mL。
19. 权利要求 18 的试剂盒,其中所述抗单链 DNA 抗体的浓度是 0.5 μ g/mL。
20. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述二抗是偶联辣根过氧化物酶的抗兔源 IgG 的抗体。
21. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述 TMB 底物是 PIERCE#34028。
22. 权利要求 12 的试剂盒,其用于对癌组织进行化疗疗效预测。

23. 权利要求 12 的试剂盒,其用于对血清进行检测。

检测 DNA 甲基化的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及检测 DNA 甲基化的方法和试剂盒。具体地说,本发明涉及用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法检测 DNA 甲基化的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] DNA 甲基化发生在 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的 5' 碳原子上,在人类癌症中广泛存在,是表观遗传学的重要研究对象 [1]。DNA 甲基转移酶 (DNMT) 负责胞嘧啶的甲基共价修饰 [2]。在 DNMT 家族中, DNMT1 主要负责维持 DNA 甲基化程度,例如在 DNA 复制时,对新生 DNA 链进行甲基化修饰 [3]; DNMT3a 和 DNMT3b 主要负责从无到有的对 DNA 进行甲基化修饰 [4, 5]。DNA 甲基化的信息在细胞分裂过程中能够稳定的传递,对于器官的发育和行使功能、Z 染色体的失活、基因组印记 (imprinting)、转座子等的沉默以及基因的适度表达等发挥重要作用 [6]。

[0003] 在癌细胞中,基因组整体表现出甲基化程度降低的现象 [7];而在特定的区域表现出甲基化程度升高,同一些基因的转录沉默相关 [8]。DNA 甲基化程度已成为新一代的肿瘤标志物,原则上可以用于癌症的早期检测、预后评估、疗效监测等方面 [9]。

[0004] 在用于研究 DNA 整体甲基化程度的方法中,高效液相色谱 (HPLC) 是一种经典的方法 [10],能够进行定量分析,可重复性强。然而这一方法所需的基因组 DNA 用量比较大,对 DNA 的质量要求也比较高,不适宜用于高通量分析。也有以亚硫酸氢钠处理为基础的方法,检测重复序列 (例如 Alu 元件或 LINE) 的含量 [11, 12]。但是这类方法的操作步骤比较繁琐。

发明内容

[0005] 本发明采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法,对来源于细胞、组织、血清中 DNA 的整体甲基化程度进行测定,操作简单,重复性好, DNA 用量少 (可检测至 ng 级),定量计算方便,能够实现高通量检测。

[0006] 具体的说,本发明涉及一种检测 DNA 甲基化的方法,其包括:

- [0007] (1) 提取、限制性内切酶处理、纯化基因组 DNA;
- [0008] (2) 将 DNA 变性后加入封闭液;
- [0009] (3) 用抗甲基胞嘧啶抗体包被 ELISA 实验板;
- [0010] (4) 弃去包被抗体,在实验板的每个孔中加入封闭液;
- [0011] (5) 弃去封闭液,加入预混的封闭液与 DNA 样品;
- [0012] (6) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入抗单链 DNA 抗体;
- [0013] (7) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入二抗;
- [0014] (8) 用 PBS 溶液清洗,干燥后加入 TMB 底物;
- [0015] (9) 加入硫酸溶液后用酶标仪读数;
- [0016] (10) 根据用基因组 DNA 标准品制得的标准曲线,计算出样本的相对 DNA 甲基化程

度。

[0017] 优选地,在本发明的方法中,所述限制性内切酶是 MseI ;所述封闭液是 PBS+3% BSA+0.05% Triton X-100 ;所述抗甲基胞嘧啶抗体是 Santa Cruz#sc-56615,其浓度是 1 ~ 10 μ g/mL,优选 5 μ g/mL ;所述抗单链 DNA 抗体是 IBL code#18731,其浓度是 0.1 ~ 1 μ g/mL,优选 0.5 μ g/mL ;所述二抗是偶联辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 的抗兔源 IgG 的抗体 ;所述 TMB 底物是 PIERCE#34028。

[0018] 本发明还涉及一种检测 DNA 甲基化的试剂盒,其包括 :

[0019] (1) 封闭液 ;

[0020] (2) 抗甲基胞嘧啶抗体 ;

[0021] (3) 抗单链 DNA 抗体 ;

[0022] (4) 二抗 ;

[0023] (5) TMB 底物 ;

[0024] (6) 2M 硫酸 ;以及

[0025] (7) PBS 溶液。

[0026] 优选地,在本发明的试剂盒中,所述封闭液是 PBS+3% BSA+0.05% Triton X-100 ;所述抗甲基胞嘧啶抗体是 Santa Cruz#sc-56615,其浓度是 1 ~ 10 μ g/mL,优选 5 μ g/mL ;所述抗单链 DNA 抗体是 IBL code#18731,其浓度是 0.1 ~ 1 μ g/mL,优选 0.5 μ g/mL ;所述二抗是偶联辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 的抗兔源 IgG 的抗体 ;所述 TMB 底物是 PIERCE#34028。进一步优选地,本发明的试剂盒用于对癌组织进行化疗疗效预测,并且优选用于对血清进行检测。

附图说明

[0027] 图 1 显示在来源于不同样本的 DNA 中, DNA 相对甲基化程度与 DNA 浓度无显著相关性。

[0028] 图 2 显示经甲基转移酶抑制剂处理后 DNA 相对甲基化程度显著降低。

[0029] 图 3 显示相对甲基化程度测定的饱和曲线。

[0030] 图 4 显示相对甲基化程度测定的标准曲线。

[0031] 图 5 显示肺癌组织相对于癌旁正常组织的 DNA 相对甲基化程度显著下降 (非成对检验)。

[0032] 图 6 显示肺癌组织相对于癌旁正常组织的 DNA 相对甲基化程度显著下降 (成对检验)。

[0033] 图 7 显示肺癌患者癌组织相对甲基化程度随年龄增高而下降。

[0034] 图 8 显示肺癌患者癌组织相对甲基化程度在吸烟患者中有下降趋势。

[0035] 图 9 显示肺癌患者癌组织相对甲基化程度随癌症分期升高而显著下降。

[0036] 图 10 显示肺癌患者 (II、III、IV 期) 癌组织相对于正常肺组织的相对甲基化程度的受试者作业特征曲线 (ROC) 分析。

[0037] 图 11 显示在接受化疗的肺癌患者中,癌组织的相对甲基化程度对患者总体生存率的影响。

[0038] 图 12 显示在甲基化程度高的肺癌患者中,接受化疗与否对患者总体生存率的影响。

响。

[0039] 图 13 显示癌症患者相对于健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度显著升高。

[0040] 图 14 显示癌症患者血清中 DNA 相对甲基化程度与年龄无显著相关性。

[0041] 图 15 显示癌症患者血清中 DNA 相对甲基化程度与性别无显著相关性。

[0042] 图 16 显示健康对照与癌症患者血清中 DNA 相对甲基化程度比较。

[0043] 图 17 显示癌症患者血清中 DNA 相对甲基化程度随癌症分期升高而显著上升。

[0044] 图 18 显示癌症患者相对于健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度的受试者作业特征曲线 (ROC) 分析。

[0045] 图 19 显示男性癌症患者相对于男性健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度的受试者作业特征曲线 (ROC) 分析。

[0046] 图 20 显示女性癌症患者相对于女性健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度的受试者作业特征曲线 (ROC) 分析。

具体实施方式

[0047] 实验步骤

[0048] 样品处理:组织基因组 DNA 提取使用 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)。测定浓度后,使用 MseI 限制性内切酶处理 (37°C 放置 2 小时) 后使用 DNA 纯化试剂盒 (天根生化科技有限公司,北京) 纯化 DNA。测定 DNA 浓度后,将 DNA 稀释至 10 ~ 50ng/μL,95°C 变性 10 分钟,立即冰上放置。取 1 μL 与 49 μL 1× 封闭液 (PBS+3% BSA+0.05% Triton X-100) 混合,冰上放置。

[0049] 血清 / 血浆 (200 μL) 基因组 DNA 提取使用 QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen),用 45 μL 水洗脱。95°C 变性 10 分钟,立即冰上放置。加入 5 μL 10× 封闭液混合,冰上放置。

[0050] 夹心法酶联免疫吸附测定 (ELISA) 实验步骤:用抗甲基胞嘧啶抗体 (Santa Cruz#sc-56615,5 μg/mL) 包被 ELISA 实验板,每孔加入 50 μL。覆盖平板,4°C 过夜放置。次日弃去包被抗体,用 PBS 溶液 (0.2g/L KH₂PO₄,2.16g/L Na₂HPO₄·7H₂O,0.2g/L KCl,8.0g/L NaCl) 洗两遍,每次每孔使用 200 μL,拍干。每孔中加入 200 μL 封闭液,室温放置 2 小时。随后弃去封闭液。每孔加入预混的 49 μL 封闭液与 1 μL DNA 样品。4°C 放置至少 2 小时。使用 PBS 洗两遍,拍干。将抗单链 DNA 抗体 (IBL code#18731,0.5 μg/mL) 加入 96 孔 ELISA 实验板的孔中,每孔加入 100 μL。覆盖平板,室温放置 2 小时。使用 PBS 洗四遍,拍干。将二抗 (1:4000 稀释) 加入 96 孔 ELISA 实验板的孔中,每孔加入 100 μL。覆盖平板,室温放置 1 至 2 小时。使用 PBS 洗四遍,拍干。每孔加入 100 μL TMB 底物溶液 (PIERCE#34028)。3 ~ 10 分钟后,加入 2M 硫酸溶液,混匀后用酶标仪读数 (波长选择为 450nm)。

[0051] 相对甲基化程度计算:提取人非小细胞肺癌细胞系 A549 的基因组 DNA,MseI 酶切处理、纯化后测定 DNA 浓度,稀释为 5、10、20、40ng/μL 标准品,再按上述步骤进行后续实验。ELISA 实验读数后,将标准品和样本吸光度 (OD) 数据减去不合任何 DNA 样品的实验孔数据 (即去本底),利用标准品去本底数据作出标准曲线 (DNA 含量为横坐标,去本底 OD 值为纵坐标),将样本的去本底数据代入标准曲线的线性拟合公式中,计算出每个样本中相对 DNA 甲基化程度。对于组织样本,还需将该数值除以加样 DNA 含量,计算出每 ng 组织 DNA 中的相对甲基化程度。

[0052] 实验数据：

[0053] 1. 选取多个不同的组织样本,测定其 DNA 浓度,之后测定等体积样本的相对甲基化程度,Pearson 相关性系数 r 为 0.1853, P 值为 $0.6084 > 0.05$,说明不同样本 DNA 的相对甲基化程度与其 DNA 浓度 / 含量无显著相关性 (见图 1)。

[0054] 2. 使用 $1 \mu\text{M}$ 甲基化酶抑制剂 5-氮杂 (aza)-2'-脱氧胞苷 (DAC) 或等体积溶剂二甲亚砜 (DMSO) 处理 A549 细胞 2 天后,提取细胞 DNA 测定 DNA 相对甲基化程度 /ng。DAC 处理后细胞相对于 DMSO 处理后细胞的相对甲基化程度显著降低 ($P = 0.0206$) (见图 2)。

[0055] 3. 将 A549 细胞基因组 DNA 稀释为不同浓度,加入实验体系中,使最终含量分别为 0、4、8、16、32、64、80、120、160、200ng,将 DNA 含量作为横坐标,测得的相对甲基化程度作为纵坐标作图显示:曲线在 100ng 前后呈现饱和,而低至 4ng 依然可以检测出 (见图 3)。

[0056] 4. 将 A549 细胞基因组 DNA 稀释为不同浓度,加入实验体系中,使最终含量分别为 0、4、8、16、32、64、80ng,将 DNA 含量作为横坐标,测得的相对甲基化程度作为纵坐标,作直线拟合,得到标准曲线。 $R^2 = 0.9929$,表明拟合直线的线性关系良好 (见图 4)。

[0057] 5. 检测 46 例肺癌组织样本和 46 例癌旁正常组织样本 DNA 的相对甲基化程度 /ng,非成对数据检验结果显示癌组织相对于癌旁正常组织 DNA 相对甲基化程度显著下降 ($P = 0.0263$) (见图 5)。

[0058] 6. 检测 46 例肺癌组织样本和各自对应的癌旁正常组织样本 DNA 的相对甲基化程度 /ng,成对数据检验结果显示癌组织相对于癌旁正常组织 DNA 相对甲基化程度显著下降 ($P = 0.0013$) (见图 6)。

[0059] 7. 肺癌患者癌组织相对甲基化程度与年龄无显著相关性 ($P = 0.629$);在低年龄组 (60 岁以下) 与中年年龄组 (60 ~ 74 岁) 之间无显著性差异 ($P = 0.1082 > 0.05$),在中年年龄组与高年龄组 (74 岁以上) 之间有显著性差异 ($P = 0.0271$) (见图 7)。

[0060] 8. 肺癌患者癌组织相对甲基化程度在吸烟患者中相对于不吸烟患者无显著性差异,但有下降趋势,其中男性中 $P = 0.0581$,女性中 $P = 0.4329$ (见图 8)。

[0061] 9. I 期肺癌患者癌组织相对甲基化程度相对正常肺组织无显著性差异 ($P = 0.4033$);II、III、IV 期肺癌患者癌组织相对甲基化程度相对正常肺组织显著降低 ($P = 0.0162$);III、IV 期肺癌患者癌组织相对甲基化程度相对正常肺组织显著降低 ($P = 0.0316$) (见图 9)。

[0062] 10. 由于 I 期肺癌患者癌组织相对于正常肺组织的相对甲基化程度无显著差异,因此分析了非 I 期 (II、III、IV 期) 肺癌患者癌组织相对于正常肺组织的相对甲基化程度的受试者作业特征曲线 (ROC),曲线下面积 (AUC) 为 0.7093, $P = 0.0323$,在临界值下,灵敏度和特异性度可分别达到 58.7% 和 80%,表明通过肺组织的相对甲基化程度区分非 I 期癌症患者和正常的诊断效力较高 (见图 10)。

[0063] 11. 按照相对甲基化程度数值分为甲基化程度低 (小于 1.31)、高 (大于或等于 1.31) 两组,在接受化疗的肺癌患者中,甲基化程度高和低两组总体生存率存在显著性差异 ($P = 0.0403 < 0.05$),且在同一时间点,甲基化程度低的患者组相对于甲基化程度高的患者组,其总体生存率较高 (见图 11)。

[0064] 12. 按照相对甲基化程度数值分为甲基化程度低 (小于 1.31)、高 (大于或等于 1.31) 两组,在甲基化程度高的肺癌患者中,接受和不接受化疗两组总体生存率存在显著性

差异 ($P = 0.0377 < 0.05$), 且在同一时间点, 未接受化疗患者组相对于接受化疗患者组, 其总体生存率较高 (见图 12)。

[0065] 13. 检测 103 例癌症患者、89 例健康对照的血清中 ($200 \mu\text{L}$) DNA 相对甲基化程度, 癌症患者相对于健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度显著升高 ($P < 0.0001$) (见图 13)。

[0066] 14. 癌症患者血清中 ($200 \mu\text{L}$) DNA 相对甲基化程度在低年龄组 (60 岁以下) 与高年龄组 (60 岁以上) 之间无显著性差异 ($P = 0.1443$), 而不论低年龄组还是高年龄组, 癌症患者相对于健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度均显著升高, P 分别为 0.0002 和 0.0003 (见图 14)。

[0067] 15. 癌症患者血清中 ($200 \mu\text{L}$) DNA 相对甲基化程度在男性与女性之间无显著性差异 ($P = 0.0564$), 而不论男性还是女性, 癌症患者相对于健康对照的血清中 DNA 相对甲基化程度均显著升高, P 分别为 < 0.0001 和 0.0023 (见图 15)。

[0068] 16. 多种癌症患者相对于健康对照的血清中 ($200 \mu\text{L}$) DNA 相对甲基化程度显著升高, 例如乳腺癌 ($P = 0.0465$)、食道癌 ($P = 0.0002$)、肝癌 ($P < 0.0001$)、肺癌 ($P < 0.0001$)、胃癌 ($P = 0.0002$)、消化系统癌症 ($P < 0.0001$) 等 (见图 16)。

[0069] 17. I、II 期癌症患者相对健康对照的血清中 ($200 \mu\text{L}$) 相对甲基化程度显著升高 ($P = 0.0197$); III 期癌症患者相对健康对照的血清中 ($200 \mu\text{L}$) 相对甲基化程度显著升高 ($P = 0.0006$); IV 期癌症患者相对健康对照的血清中 ($200 \mu\text{L}$) 相对甲基化程度显著升高 ($P < 0.0001$) (见图 17)。

[0070] 18. 图 18 曲线下面积 (AUC) 为 0.7224, $P < 0.0001$, 在临界值下, 灵敏度和特异性度可分别达到 70.9% 和 65.2%, 表明通过血清中 DNA 相对甲基化程度区分癌症和正常的诊断效力较高。

[0071] 19. 图 19 曲线下面积 (AUC) 为 0.7740, $P < 0.0001$, 在临界值下, 灵敏度和特异性度可分别达到 79.2% 和 67.5%, 表明通过血清中 DNA 相对甲基化程度在男性中区分癌症和正常的诊断效力较高。

[0072] 20. 图 20 曲线下面积 (AUC) 为 0.6766, $P = 0.0022$, 在临界值下, 灵敏度和特异性度可分别达到 63.5% 和 65.3%, 表明通过血清中 DNA 相对甲基化程度在女性中区分癌症和正常的诊断效力较高。

[0073] 参考文献

[0074] [1] Robertson K. D. (2005), DNA 甲基化和人类疾病, *Nat Rev Genet* 6, 597-610。

[0075] [2] McCabe M. T., Brandes J. C. 和 Vertino P. M. (2009), 癌症 DNA 甲基化: 分子机理和临床意义, *Clin Cancer Res* 15, 3927-3937。

[0076] [3] Bestor T. H. (2000), 哺乳动物的 DNA 甲基转移酶, *Hum Mol Genet* 9, 2395-2402。

[0077] [4] Okano M., Bell D. W., Haber D. A. 和 Li E. (1999), DNA 甲基转移酶 Dnmt3a and Dnmt3b 对于重新 (de novo) 甲基化和哺乳动物发育是必需的, *Cell* 99, 247-257。

[0078] [5] Kanai Y. (2009), 癌症前期和癌症中的基因组宽度 DNA 甲基化图谱, *Cancer Sci.*。

[0079] [6] Suzuki M. M. 和 Bird A. (2008), DNA 甲基化图景: 由表观基因组学引发的见解, *Nat Rev Genet* 9, 465-476。

- [0080] [7]Feinberg A.P. 和 Tycko B. (2004), 癌症渐成说的历史, *Nat Rev Cancer*4, 143-153。
- [0081] [8]Jones PA 和 Baylin SB(2007), 癌症的表观基因组学, *Cell*128, 683-692。
- [0082] [9]Laird PW(2003), DNA 甲基化标记物的能力和前景, *Nat Rev Cancer*3, 253-266。
- [0083] [10]Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A. 和 Gehrke C. (1982), 来自不同类型组织的细胞的人类 DNA 中 5- 甲基胞嘧啶的数量和分布, *Nucleic Acids Res*10, 2709-2721。
- [0084] [11]Yang A. S., Estecio M. R., Doshi K., Kondo Y., Tajara E. H., 和 Issa J. P. (2004), 一种采用重复性 DNA 单元的亚硫酸氢盐 PCR 来评估全局性 DNA 甲基化的简单方法, *Nucleic Acids Res*32, e38。
- [0085] [12]Weisenberger D. J., Campan M., Long T. I., Kim M., Woods C., Fiala E., Ehrlich M. 和 Laird P. W. (2005), 用 MethyLight 进行重复性 DNA 单元甲基化的分析, *Nucleic Acids Res*33, 6823-6836。

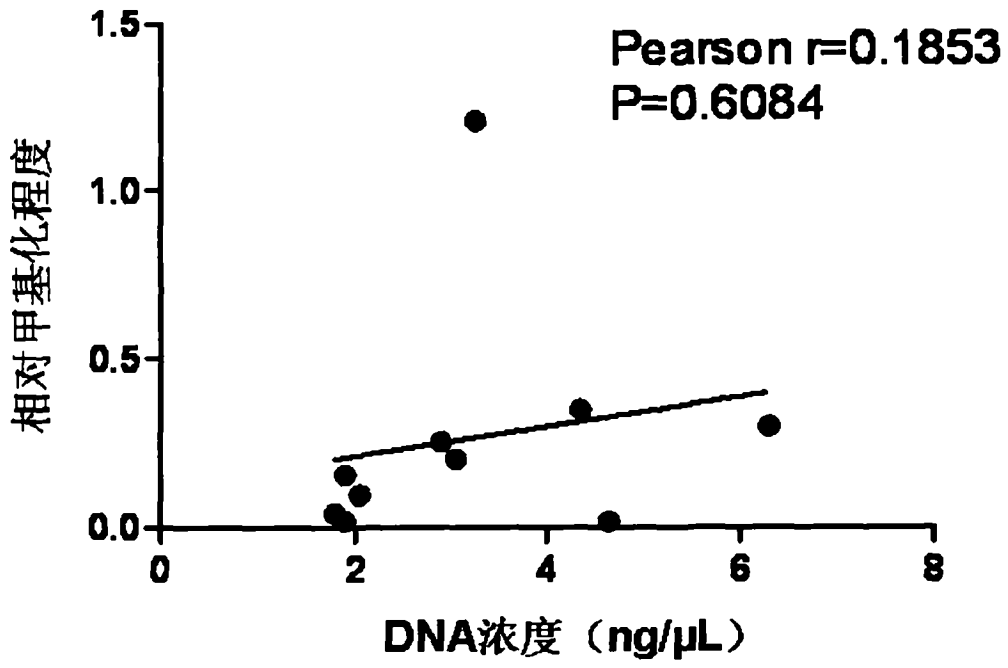


图 1

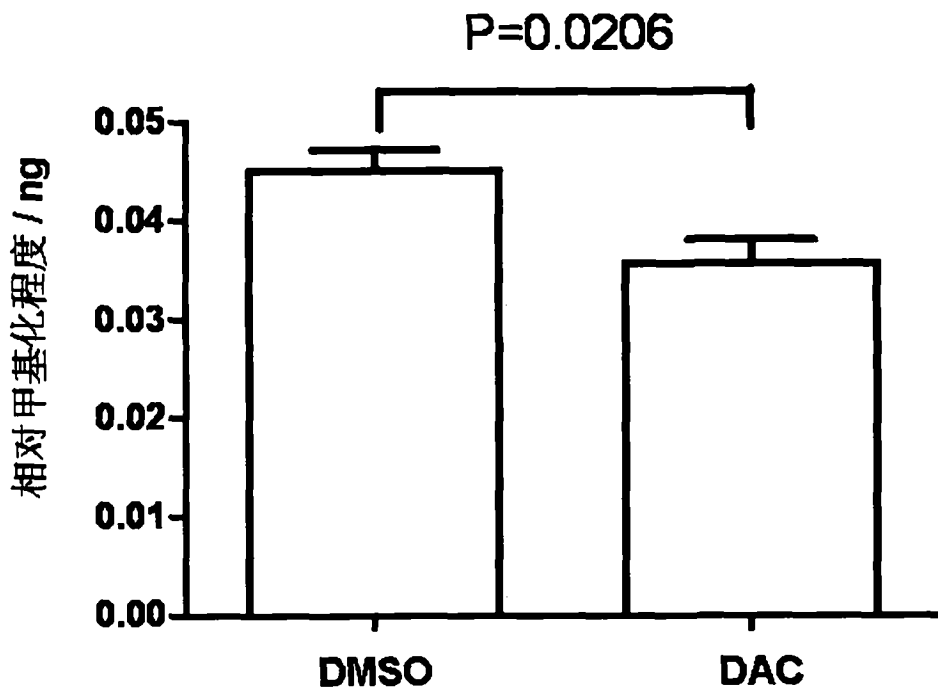


图 2

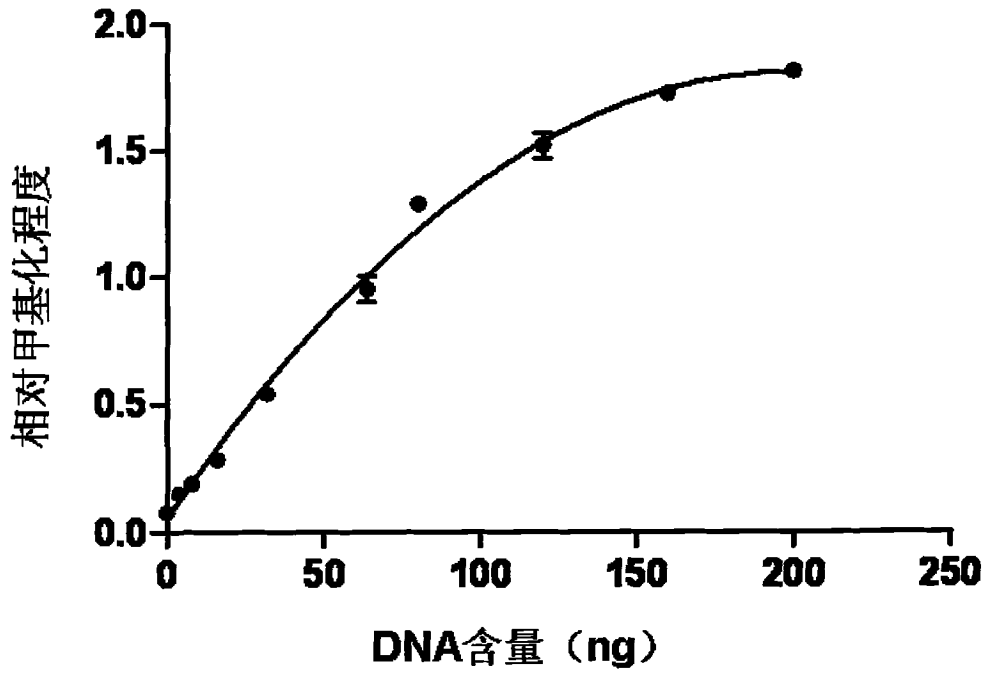


图 3

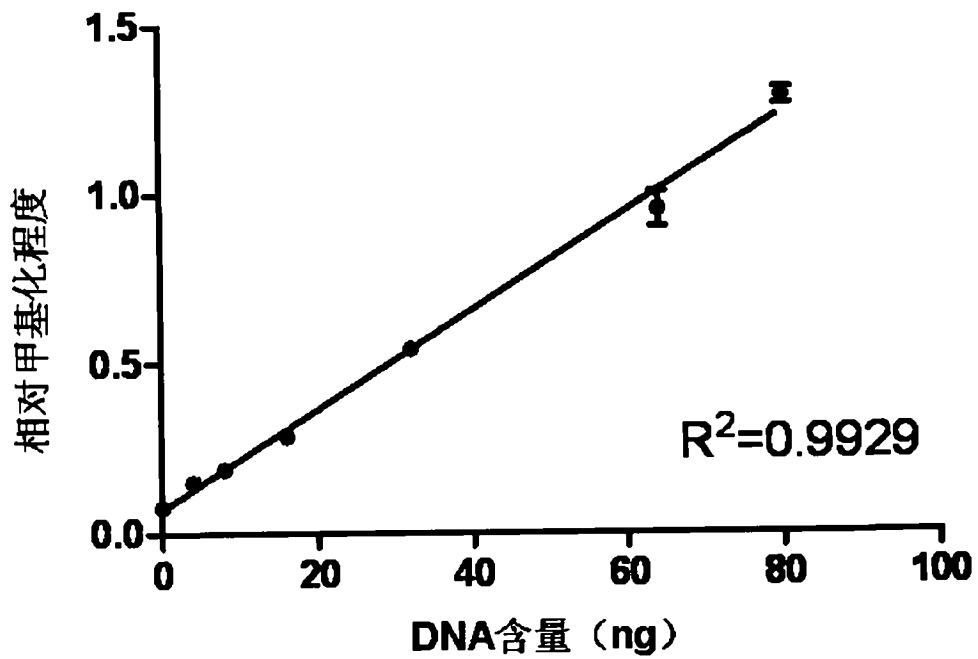


图 4

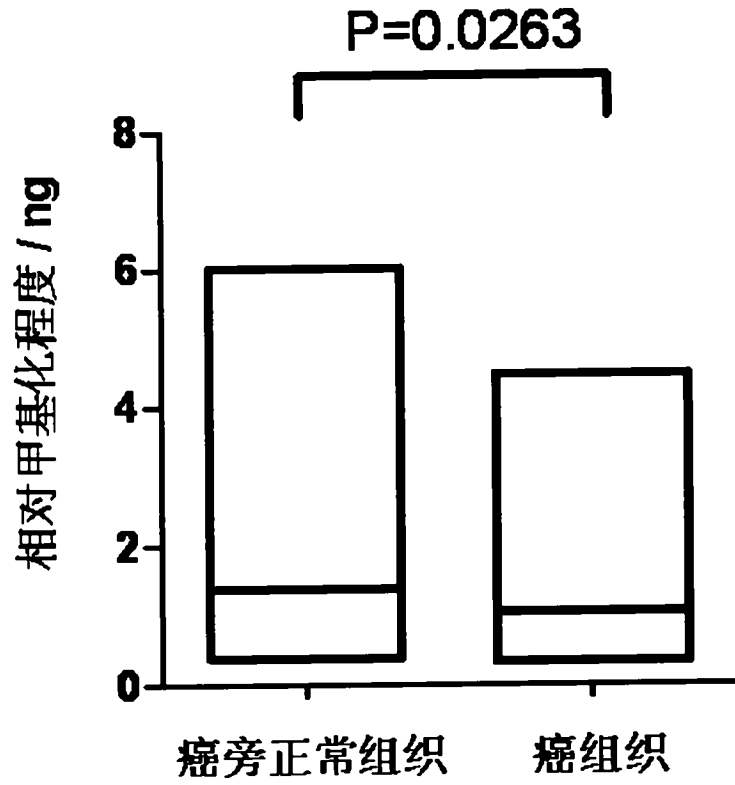


图 5

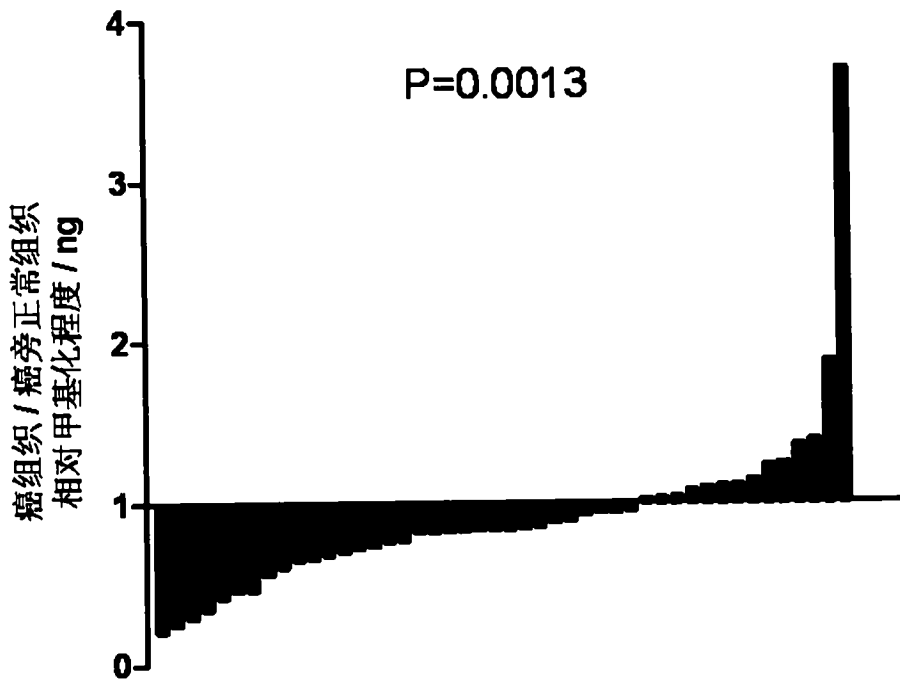


图 6

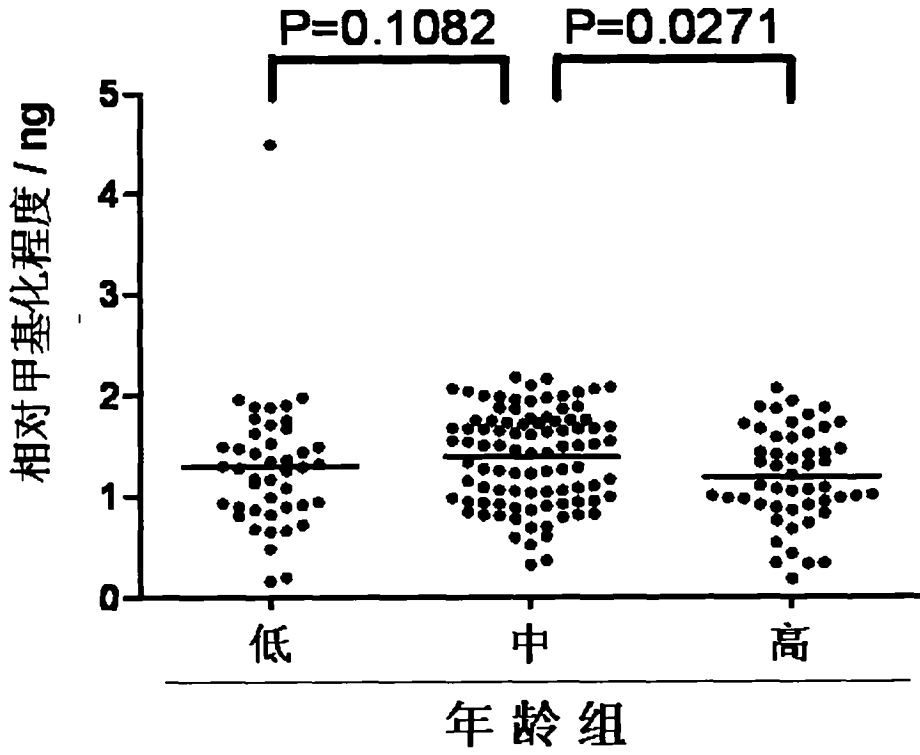


图 7

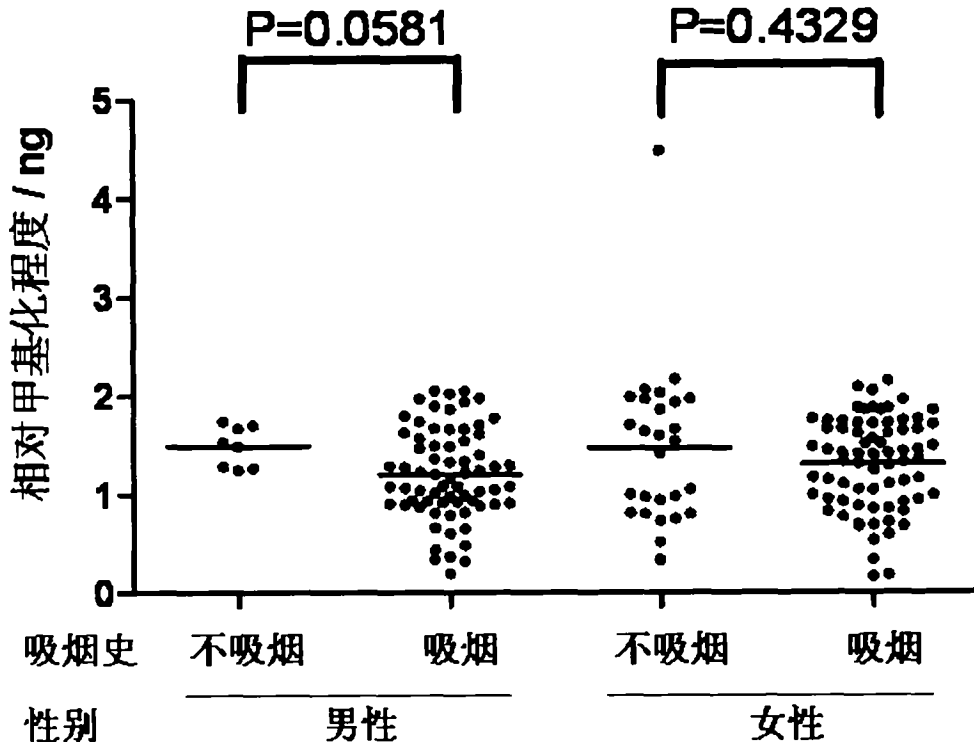


图 8

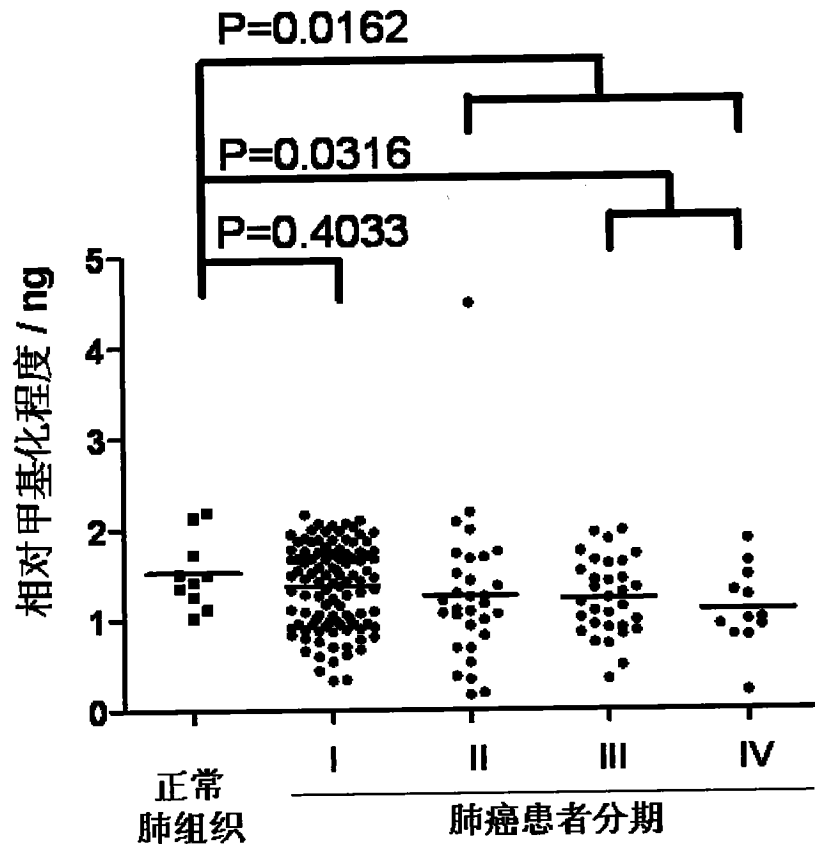


图 9

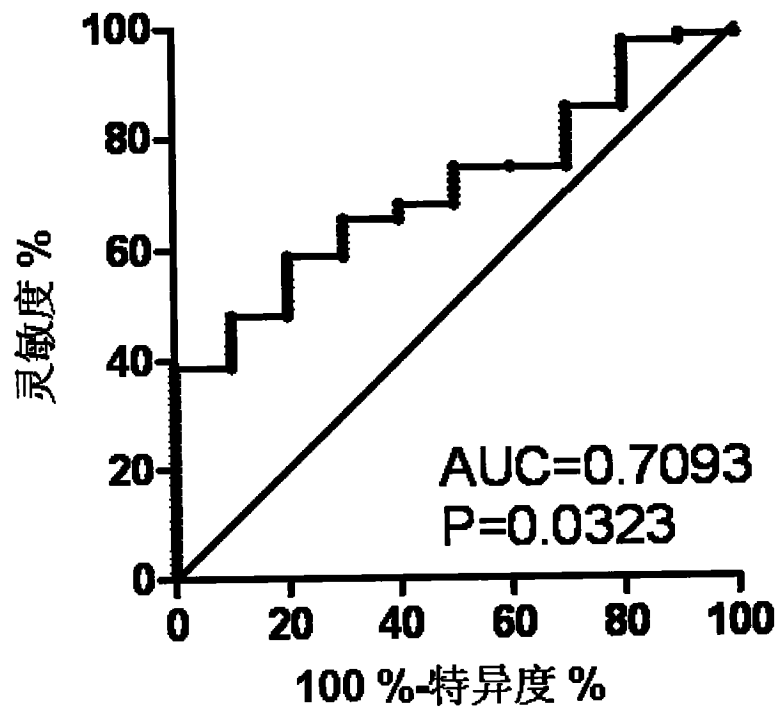


图 10

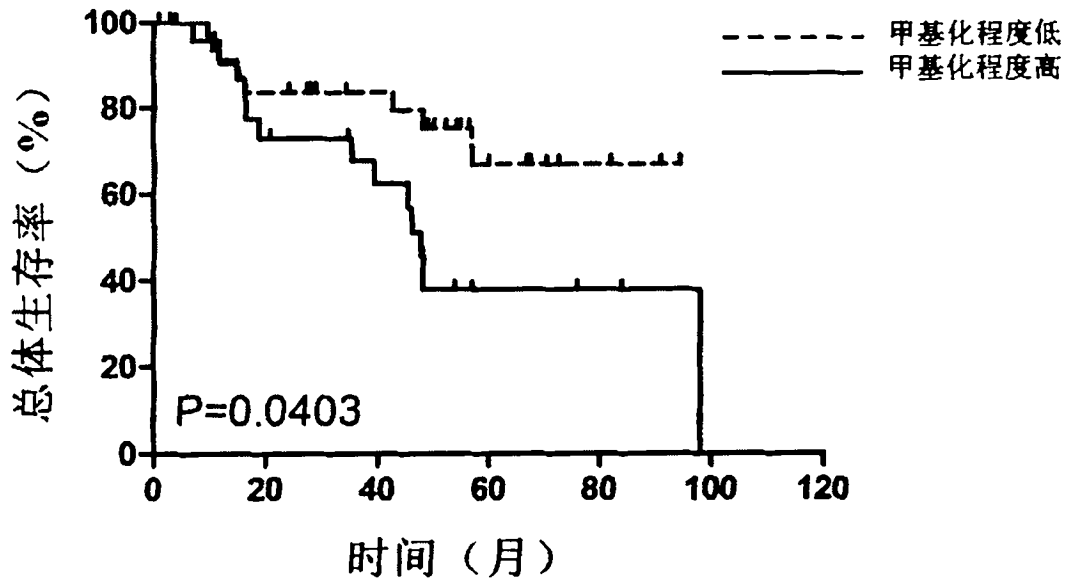


图 11

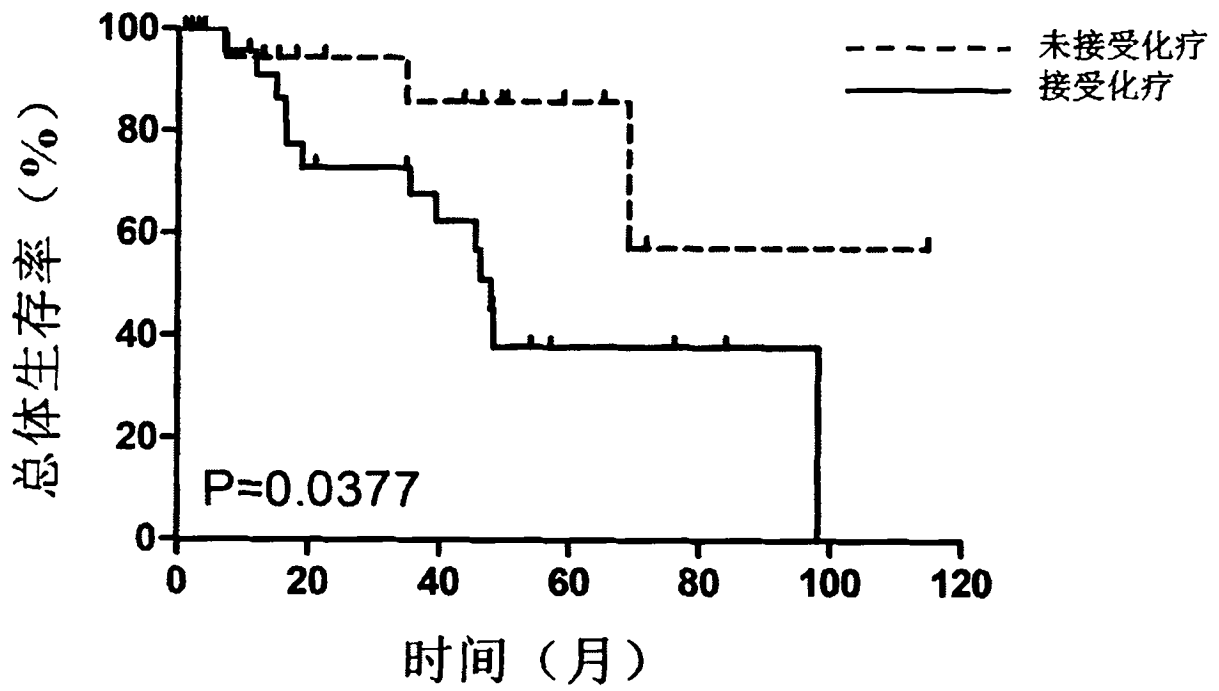


图 12

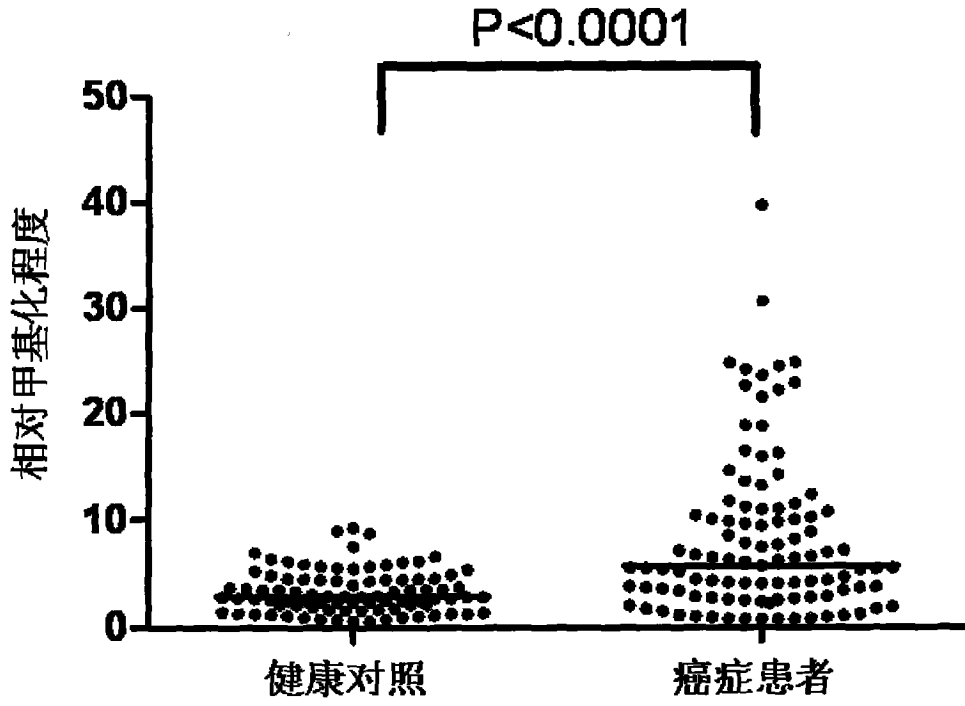


图 13

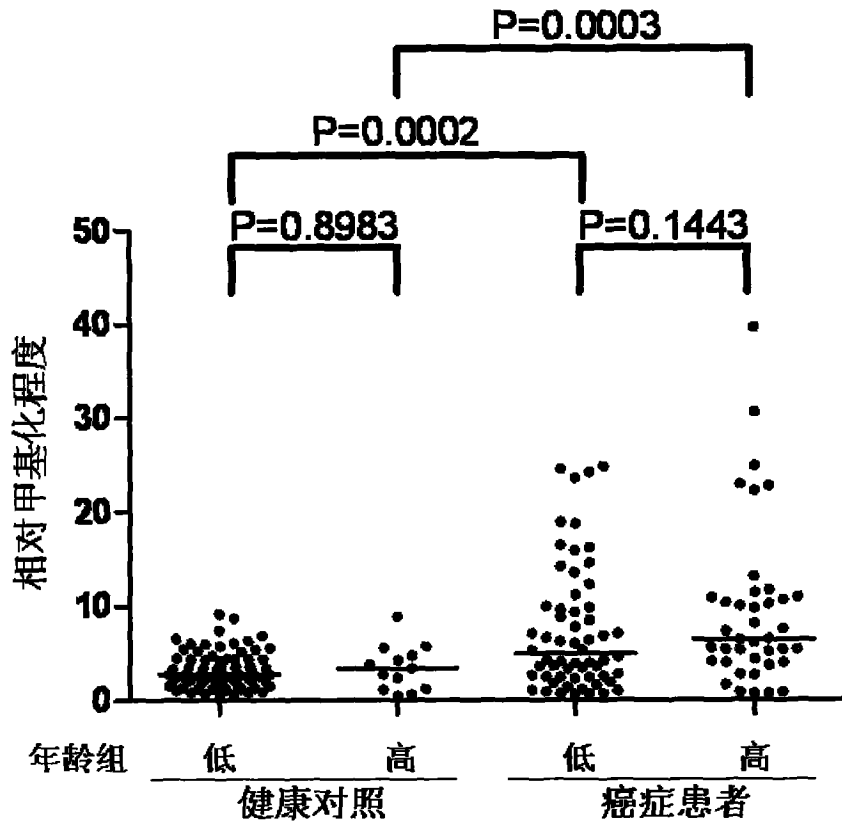


图 14

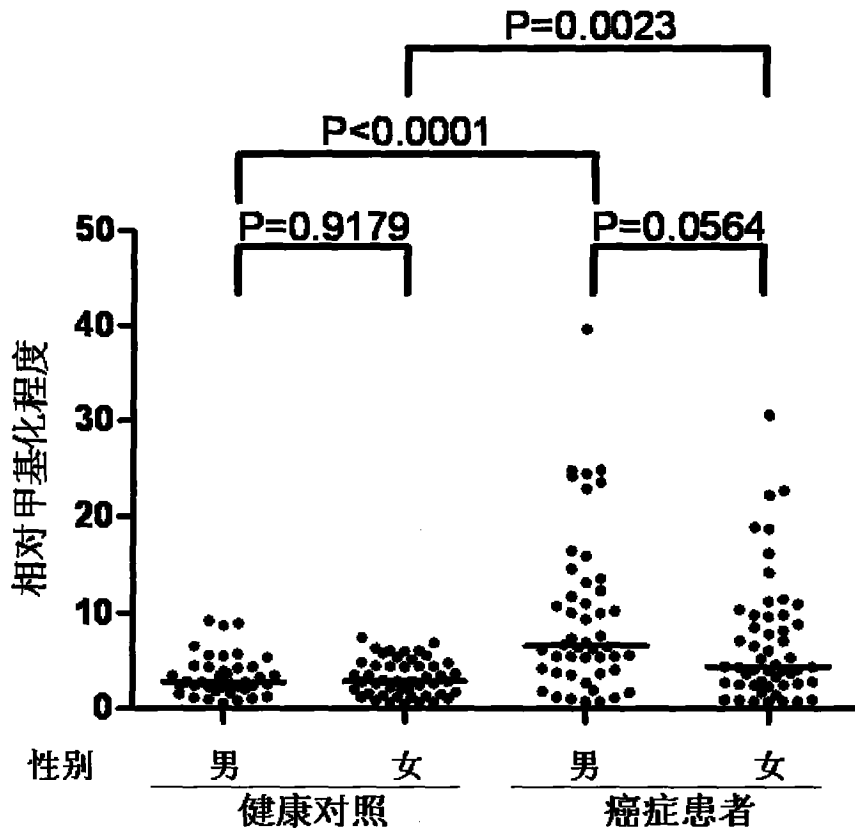


图 15

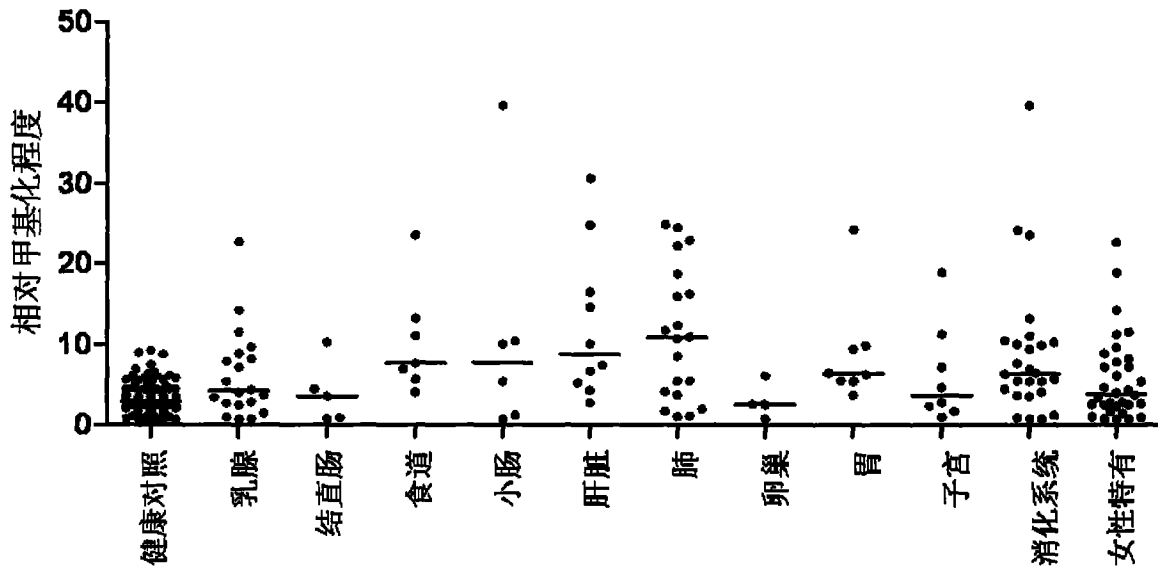


图 16

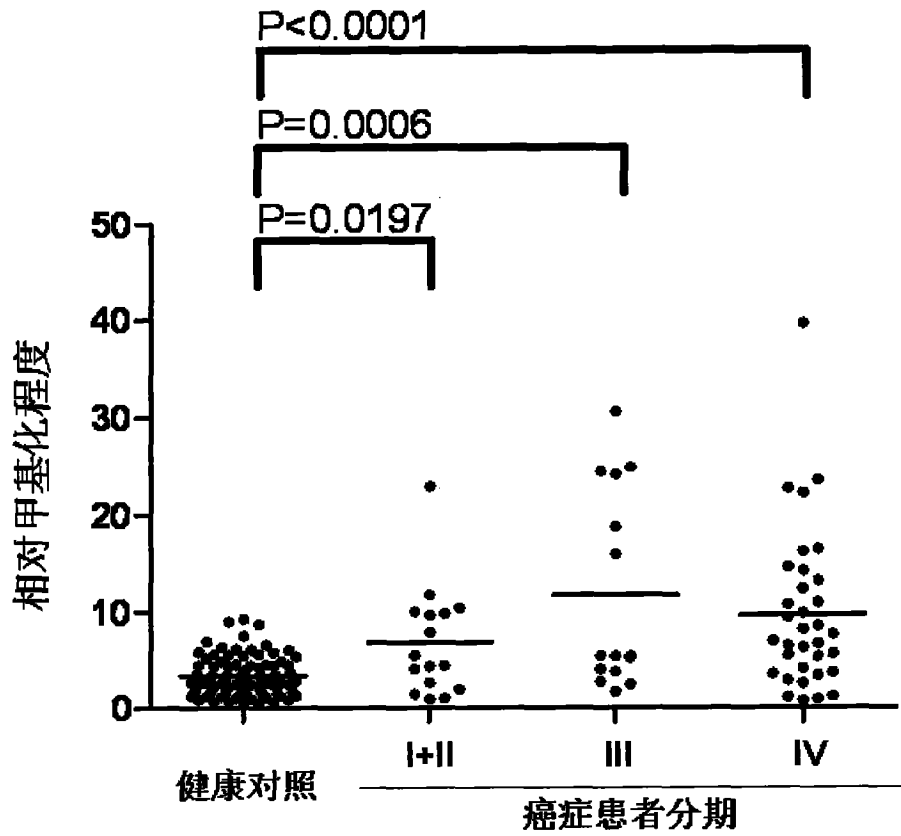


图 17

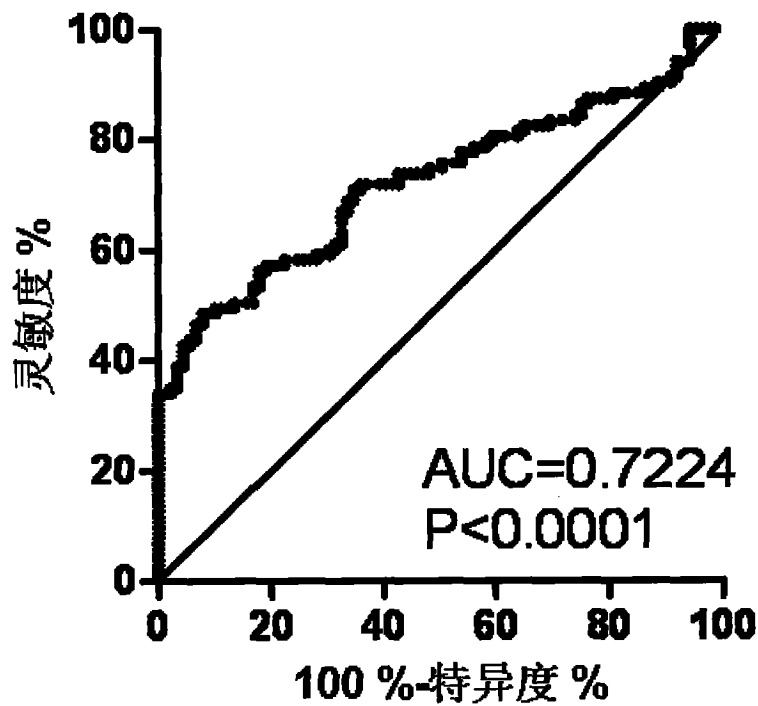


图 18

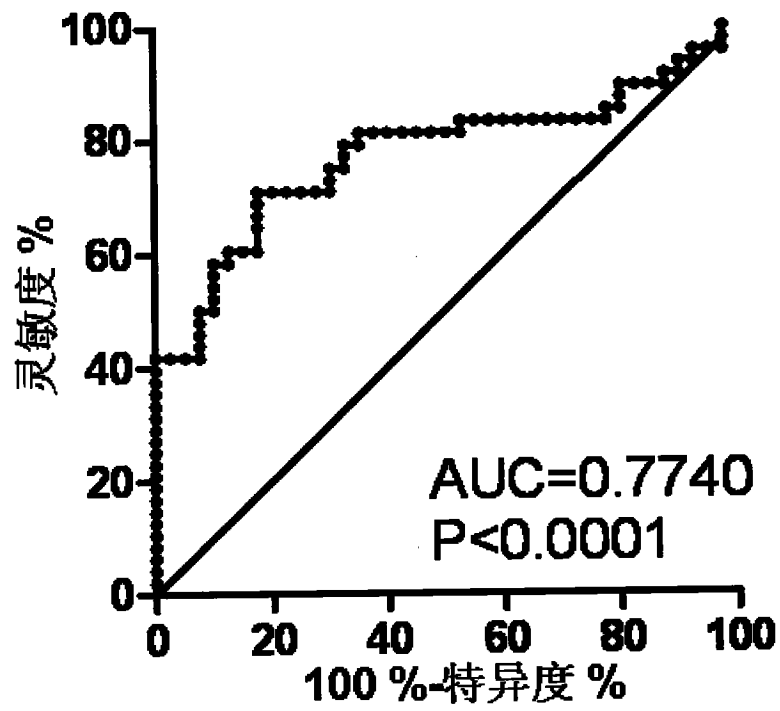


图 19

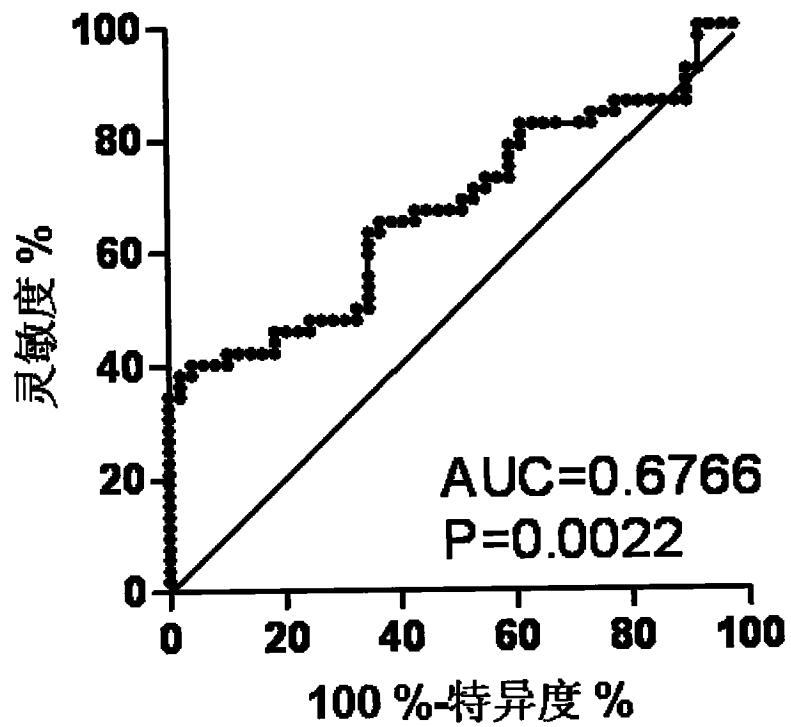


图 20

专利名称(译)	检测DNA甲基化的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN105223346A	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201410265710.7	申请日	2014-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京雅康博生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京雅康博生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京雅康博生物科技有限公司		
[标]发明人	陈钊 莫敏俐 李晖 李隽 丁凤		
发明人	陈钊 莫敏俐 李晖 李隽 丁凤		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测DNA甲基化的方法和试剂盒。具体地说，本发明的方法采用酶联免疫吸附测定(ELISA)，对来源于细胞、组织、血清中DNA的整体甲基化程度进行测定，操作简单，重复性好，DNA用量少(可检测至ng级)，定量计算方便，能够实现高通量检测。

