

# DNA 甲基化分析技術之發展與應用<sup>1</sup>

許育嘉<sup>2</sup> 古新梅<sup>3</sup> 王強生<sup>4,5</sup>

## 摘 要

許育嘉、古新梅、王強生。2005。DNA 甲基化分析技術之發展與應用。台灣農業研究 54:71-82。

基因組中 DNA 甲基化程度與基因表現密切相關，因此，逐漸受到重視。目前有兩類技術運用於 DNA 甲基化程度的研究，包括非重亞硫酸鹽（non-bisulfite）和重亞硫酸鹽（bisulfite）的方法。在不使用重亞硫酸鹽處理之 DNA 甲基化分析，是結合 AFLP 的技術，配合對甲基化敏感的限制酵素之使用，稱甲基敏感擴增多型性方法（MSAP），此方法乃是利用酵素對於不同甲基化程度辨識的差異，判斷特定 DNA 序列之甲基化形式，為完全甲基化或是未甲基化，此方法主要受限於只能研究在同辨識位中所出現的胞嘧啶，不能測定到某些胞嘧啶受甲基化的情形，會導致低估 DNA 甲基化的程度。在使用重亞硫酸鹽分析 DNA 甲基化方面，以甲基特異 PCR 方法（MSP）為最廣泛應用於 CpG 島甲基化的研究，此方法成功的關鍵在於引子的設計，由於此法具有高靈敏度，所以能允許偵測微量樣品 DNA 甲基化的情形，甚至包括由埋蠟或是顯微解剖來的組織均可分析。甲基化敏感的單核苷酸引子延長反應法（Ms-SNuPE）是藉由單一核苷酸引子，在處理過重亞硫酸鹽的 DNA 上進行擴增，可以評估特定 CpG 島甲基化的不同，此法能進行定量分析，不需利用限制酵素，能藉由利用多個引子的策略，在引子擴增反應下，分析多個 CpG 位置，由於需仰賴放射性強度的測定，靈敏度較差為此方法的主要缺點。組合重亞硫酸鹽限制分析法（COBRA），為一個定量技術，它能測定小量基因組 DNA 中，特定基因座 DNA 甲基化的程度，由於此法能針對 DNA 甲基化的情形作準確的定量分析，並可大量分析樣品與應用在埋蠟切片組織的分析，所以在 DNA 甲基化分析的領域已受到重視。

**關鍵詞：**甲基化、CpG 島、重亞硫酸鹽、非重亞硫酸鹽。

## 前 言

DNA 甲基化作用(DNA methylation)是由甲基轉移酶(methyltransferases)媒介的 DNA 化學修飾作用，甲基化形式分兩類，一類為在胞嘧啶(cytosine)環的第五個 C 位置上加入甲基(methyl group, CH<sub>3</sub>)

- 
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2227 號。接受日期：94 年 6 月 30 日。
  2. 中興大學農藝系博士班研究生。臺灣 臺中市。
  3. 中興大學農藝系助理教授。臺灣 臺中市。
  4. 本所農藝組研究員兼組長。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
  5. 通訊作者，電子郵件：cswang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

稱為 5'-甲基胞嘧啶 (methyl-cytosine,  $5^m\text{C}$  or  $m\text{C}$ )，另一類則是由 S-腺核甘甲硫胺酸 (s-adenosylmethionine(SAM))轉移一個甲基到腺嘌呤 (adenine, A)  $\text{N}^6$  的位置。甲基化對於 DNA 而言是一個重要的修飾作用，在原核生物中，DNA 甲基化能對 DNA 進行修補和自我 DNA 的保護；在植物中則可對基因組進行管理及調節基因表現，進而調節植物的生長發育(Finnegan & Kovac 2000)。

對於 DNA 甲基化的檢測，目前有兩類主要研究 DNA 甲基化程度的方法，包括非重亞硫酸鹽 (non-bisulfite) 和重亞硫酸鹽 (bisulfite) 的方法。早期 DNA 甲基化的檢測是仰賴對甲基化敏感的限制酶 (restriction enzymes)，與南方墨點 (Southern blot)分析組合或聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 測定 (圖 1)，雖然這些技術簡單，但受限制於酵素本身之可利用的限制切位資訊，不正確的結果可能是來自不完全切割，而且需要大量的 DNA，造成偵測上的限制 (Eads *et al.* 2000)。這個問題可藉由 DNA 重亞硫酸鹽方法的修改而解決，能對甲基化程度進行比較，並測定對偶基因甲基化的情形。經重亞硫酸鹽修改的 DNA，可藉由所設計的 PCR 引子進行擴增，即所謂甲基特異 PCR (methylation-specific PCR)，可以顯示出甲基化胞嘧啶型式的差異；或是可與甲基化敏感的限制酶結合的方法，即 combined bisulfite restriction analyses，簡稱 COBRA 方法；或直接進行基因組定序，均可進行 DNA 甲基化的檢測 (Fraga & Esteller 2002)。

本文乃針對利用非重亞硫酸鹽和重亞硫酸鹽的 DNA 甲基化檢測技術進行探討，希望所提供的相關資訊，可以幫助研究者去選擇最佳的分析方法，進行 DNA 甲基化的研究。

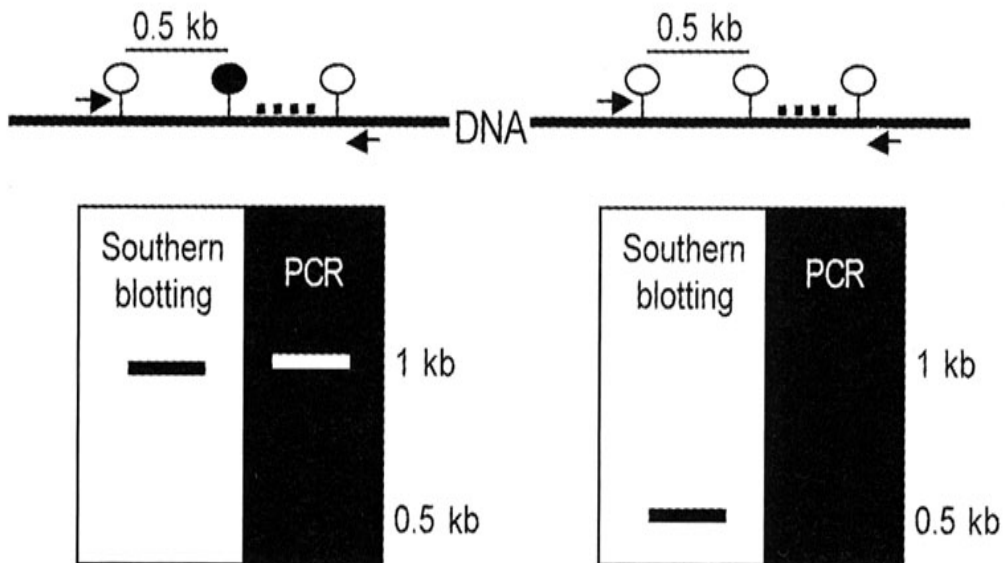


圖 1. 以甲基化和未甲基化的單一 CpG 目標位置為例，藉由南方墨點法和 PCR 方法，研究特定位置 DNA 甲基化的預測結果。黑色圓圈為甲基化胞嘧啶。箭頭的標誌為 PCR 引子。不連續的線為南方墨點法分析使用的探針。

**Fig. 1.** Anticipated results of studying site-specific DNA methylation by Southern blot analysis and PCR in the case of methylation and unmethylation for a single CpG target. Black circles indicate cytosine methylation. Arrows symbolize PCR primers. The discontinuous lines illustrate probes for Southern blot analysis.

(Fraga & Esteller 2002)

## 非重亞硫酸鹽分析 DNA 甲基化

在不使用重亞硫酸鹽處理之 DNA 甲基化分析方面，Portis *et al.* (2004) 結合擴增片段長度多型性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技術配合甲基化敏感的限制酵素之使用，創立甲基敏感擴增多型性方法 (methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)。他們是利用同切位酵素 *Hpa* II 和 *Msp* I 對 DNA 片段進行切割，*Hpa* II 和 *Msp* I 都會切割 CCGG，但 *Hpa* II 不會切  $C^{5m}CGG$ ，只會切半甲基化 (hemi-methylation) (只在一股有甲基化) 的  $^{5m}CCGG$ ，而 *Msp* I 會辨識  $C^{5m}CGG$ ，無論半甲基化與完全甲基化(兩股均有甲基化)的 DNA 片段均會被切割，但不會切割  $^{5m}CCGG$  (圖 2)，將切割後的 DNA 片段加上接頭(adapter)再利用所設計的引子對進行 PCR 擴增。利用像 *Eco* RI 與 *Hpa* II 或 *Eco* RI 與 *Msp* I 之組合，根據它們的辨識位的不同，可以判斷一特定 DNA 序列之甲基化形式為完全甲基化或是未甲基化(圖 2)；另外，根據甲基化的類型，可以更進一步的去區分屬於內部胞嘧啶完全甲基化，或是外部胞嘧啶半甲基化的形態(圖 3)。此一方法主要受到二個限制：一是只能去研究在同辨識位(isoschizomer)中所出現的胞嘧啶，其次，此技術不能測定一些胞嘧啶受甲基化的情形，導致低估 DNA 甲基化的程度，例如：兩個胞嘧啶或是外部胞嘧啶為完全甲基化，此兩者均無法被辨認切割。儘管有這樣的限制，學者還是認為此技術能對大範圍，並以極高效率的方式測定胞嘧啶甲基化情形。

## 重亞硫酸鹽分析 DNA 甲基化

### 甲基特異 PCR (methylation-specific PCR, MSP)

利用重亞硫酸鹽處理分析 DNA 甲基化之方法如圖 4 所示，DNA 經重亞硫酸鹽處理後，胞嘧啶(C)會被轉變為尿嘧啶(U)再變為胸腺嘧啶(T)；但若為甲基化胞嘧啶( $mC$ )，經重亞硫酸鹽處理後其鹼基形態並不會受到改變，仍為胞嘧啶，所以經重亞硫酸鹽處理後，可以利用 PCR 配合酵素剪切的方式來分析 DNA 甲基化的情形。在許多使用重亞硫酸鹽的方法中，以甲基特異 PCR 方法(MSP)為最廣泛被應用於研究 CpG 島甲基化的技術(Herman *et al.* 1996)。通常在正常組織中，CpG 島的胞嘧啶是未甲基化的，當它們在基因啟動子之序列若被甲基化，則會與不正常細胞形成的過程有關，而利用 MSP 方法來研究這些區域之甲基化特性，是最有效的選擇(Fraga & Esteller 2002)。

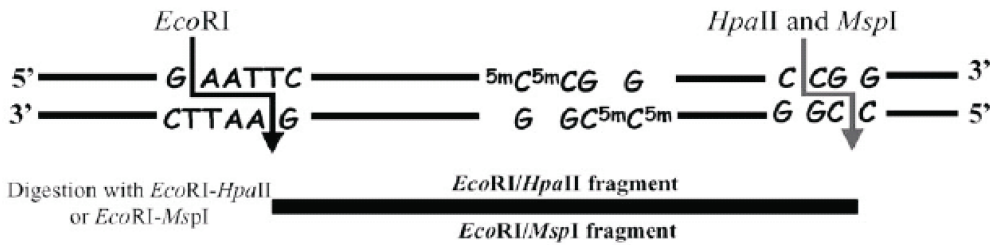
利用 MSP 分析甲基化和未甲基化對偶基因間的差異，在 DNA 變性後進行重亞硫酸鈉(sodium bisulfite)處理，將特定基因擴增產物進行定序，並設計尋找 DNA 甲基化的引子對，此方法對於含豐富 CpG 序列的 CpG 島之研究特別有用，而以 MSP 方法分析，成功的關鍵在於引子的設計，所有序列甲基化形式可以在電泳分離後，由膠體條帶之影像來分析判斷(圖 5)。進行 MSP 分析時，引子對之設計必須考慮：(1)兩個引子黏合溫度必須要相似，而且也要在 55 °C 和 65 °C 之間；(2)PCR 產物應該在 80-175 bp 之間；(3)每個引子應該包含至少兩個 CpG 對；(4)正義股引子應該包含一個 CpG 對在它的 3'-end；此外更要(5)避免不正確的對照 (未甲基化的擴增及未改變的 DNA)，引子應該含有非 CpG 的胞嘧啶。MSP 法因為具有高靈敏度，所以能允許偵測微量樣品 DNA 甲基化的情形，甚至包括由埋蠟或是顯微解剖來的組織都可進行分析(Fraga & Esteller 2002)。

**甲基化敏感的單核苷酸引子延長反應 (methylation-sensitive single nucleotide primer extension, Ms-SNuPE)**

Gonzalzo & Jones (1997)發展了一套能快速定量 DNA 甲基化的方法，稱為 Ms-SNuPE 法，此方法是藉由單核苷酸引子，在處理過重亞硫酸鹽的 DNA 上進行擴增，可以評估特定 CpG 位甲基化的差異。SNuPE 法是將基因組 DNA 先利用重亞硫酸鹽處理，利用特定的引子進行 PCR 擴增，隨後在電泳膠片

上將 PCR 產物分離，再利用 Ms-SNuPE 引子、Taq 聚合酶和 <sup>32</sup>P-dCTP 或 <sup>32</sup>P-dTTP，藉由聚丙烯醯胺（polyacrylamide）膠進行電泳和磷屏影像分析，而相對的另一股，可由設計的 Ms-SNuPE 引子所接上的是 <sup>32</sup>P- dATP 或 <sup>32</sup>P-dGTP 來評估甲基化的情形(圖 6)。若樣品 DNA 中的胞嘧啶有被甲基化，則在 C lane 所出現的條帶強度，會與甲基化胞嘧啶呈現比例關係，而 T lane 所出現的條帶強度，則與未甲基化胞嘧啶呈現比率關係(圖 5)。

**A) Full methylation of both cytosines**



**B) No methylation**

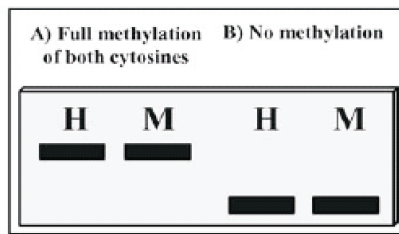
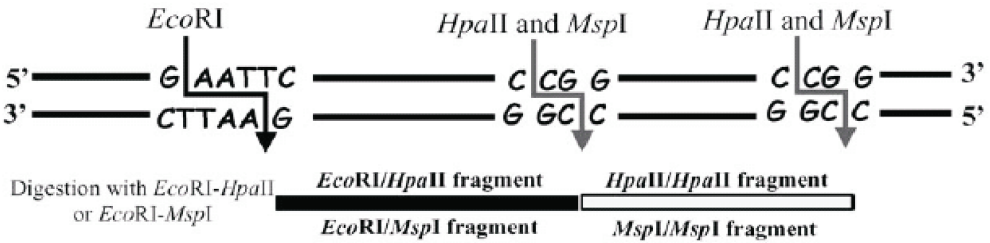
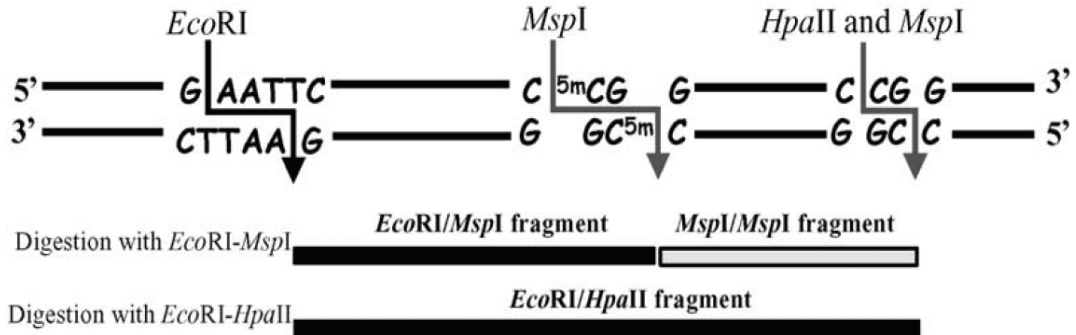


圖 2. 在 5'-CCGG 位置 DNA 去甲基化的範例。(A) 當所有胞嘧啶完全甲基化時，用 *Msp I* 和 *Hpa II* 同時切割時，會產生大的片段（當只有外部的胞嘧啶完全甲基化時，也會有相同的情況產生）。(B) 當 *Hpa II* / *Msp I* 限制切位未甲基化，則 *Msp I* 和 *Hpa II* 能切割而且會產生小片段（當內部的胞嘧啶產生半甲基化時，也會有相同的情況產生）。

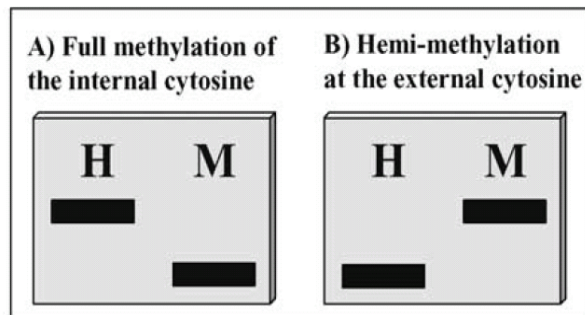
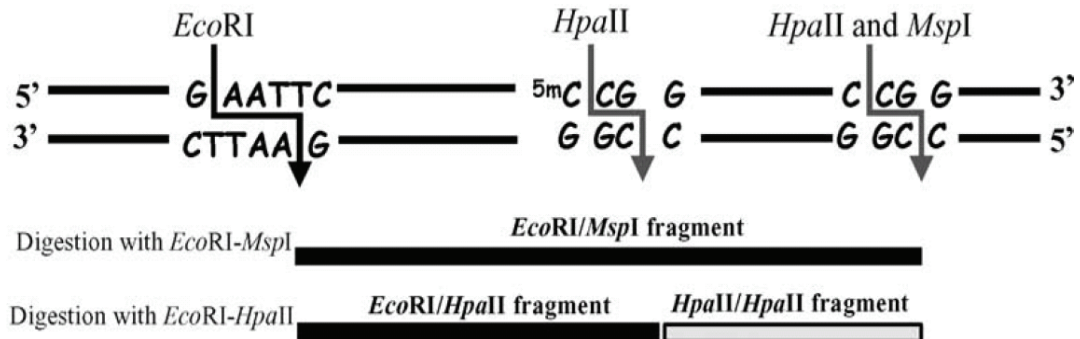
**Fig. 2.** Example of DNA demethylation at the 5'-CCGG site. (A) When full methylation occurs at both external and internal cytosines 'large' fragments are originated with both *Msp I* and *Hpa II* (the same situation occurs when full methylation is present only at the external cytosine). (B) When the *Hpa II* / *Msp I* restriction site is unmethylated, both *Msp I* and *Hpa II* can cut and originate 'short' fragments (the same situation occurs in case of hemi-methylation at the internal cytosine).

(Portis *et al.* 2004)

**A) Full methylation of the internal cytosine**



**B) Hemi-methylation at the external cytosine**



**圖 3.** 當在 5'-CCGG 位置產生不同形式的甲基化，利用 *EcoRI-HpaII* 或 *EcoRI-MspI* 切割的結果。(A) 當內部的胞嘧啶產生完全甲基化，用 *MspI* 能進行切割會產生短的片段，而 *HpaII* 無法切割所以產生長的片段。(B) 當 *HpaII/MspI* 切位的外部胞嘧啶是半甲基化時，*MspI* 不能切割而會產生大的片段，*HpaII* 可以切割而產生短的片段。

**Fig. 3.** Effects of digestions with *EcoRI-HpaII* or *EcoRI-MspI* on different types of methylation occur at the 5'-CCGG site. (A) When full methylation occurs at the internal cytosine, *MspI* cuts originating 'short' fragments while *HpaII* cannot cut and originates 'large' fragments. (B) When the *HpaII/MspI* restriction site is hemi-methylated at the external cytosine, *MspI* cannot cut and originates 'large' fragments while *HpaII* can cut, originating 'short' fragments.

(Portis *et al.* 2004)



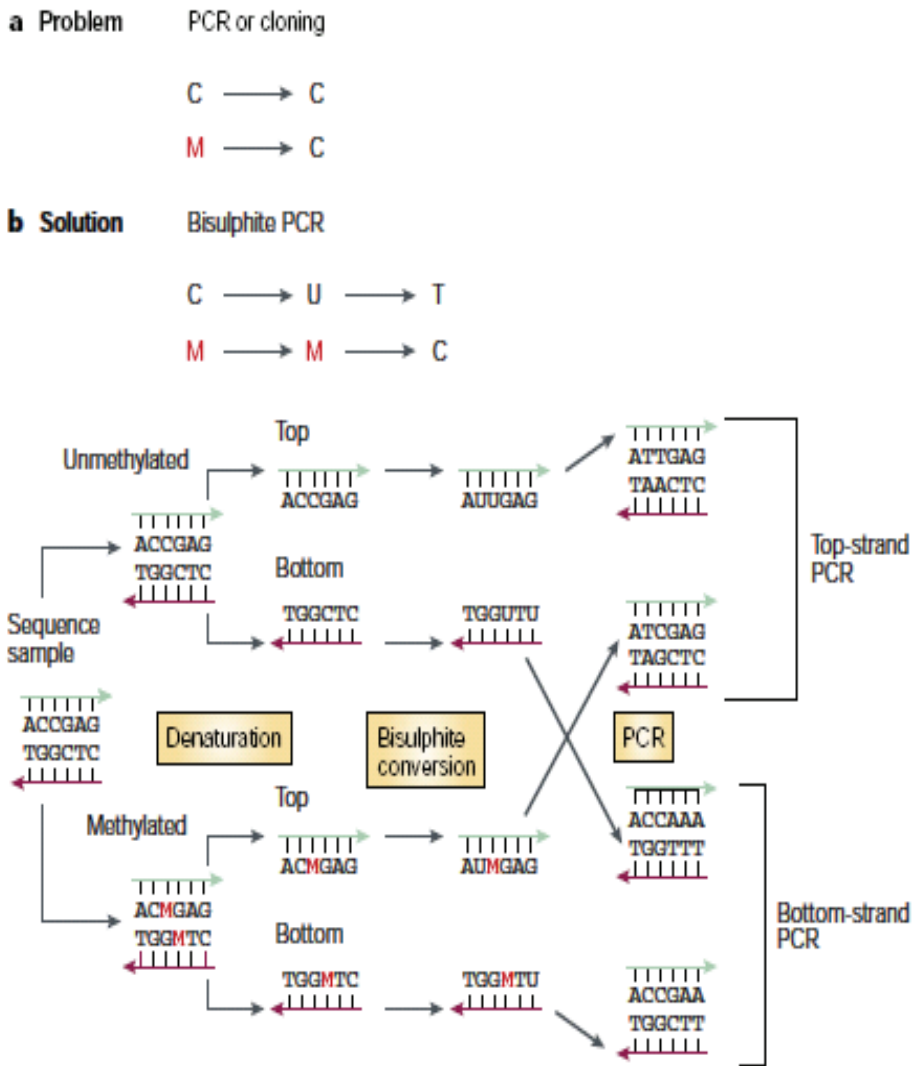


圖 4. 重亞硫酸鈉轉換偵測 DNA 甲基化的原理。以 PCR 及選殖等標準分子生物技術，分析基因座時，會將 DNA 甲基化的訊息遺漏，使得研究者通常會忽略存在於基因組 DNA 的上位遺傳訊息 (圖 a)。5-甲基胞嘧啶以紅色的 M 標示。能藉由甲基化敏感的限制酶去切割，或將基因組 DNA 處理重亞硫酸鈉 (圖 b) 把未甲基化的胞嘧啶 (C) 轉換為尿嘧啶 (U)。MSP 即甲基特異 PCR。

Fig. 4. Principle of sodium bisulfite conversion. Standard molecular biology techniques to analyses gene loci, such as polymerase chain reaction (PCR) and biological cloning, erase DNA mehtylation information, leaving the investigator oblivious to the epigenetic information that was present in the original genomic DNA (panel a). 5-methylcytosine residues are indicated as red Ms. The solution to this problem is to modify the DNA in a mehtylation-dependent way before amplification. This can be achieved either by digestion with a methylation-sensitive restriction enzyme (not show), or by treating the genomic DNA with sodium bisulphate (panel b) which converts unmethylated cytosines to uracil residues. MSP, methylation-specific PCR.

(Laird 2003)

根據 Gonzalgo & Jones (1997)研究指出，以 Ms-SNuPE 法分析甲基化有幾個優點：(1)能進行定量分析；(2)不需利用限制酵素；(3)藉由利用多個引子設計的策略，在引子擴增反應下，能分析多個 CpG 位置；(4)可針對顯微解剖所取得的小量 DNA 進行分析，但是，此方法在 PCR 擴增後的定量上，是仰賴標定的放射性強度來測定，其靈敏度較差，為此方法的主要缺點。

**組合重亞硫酸鹽限制分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)**

Xiong & Laird (1997)發展了一套名為 COBRA 的方法，為一個定量技術，它能測定小量基因組 DNA 中，特定基因座 DNA 甲基化的程度。在重亞硫酸鈉處理 DNA 後，DNA 序列上的胞嘧啶(C)可以被轉換為胸腺嘧啶(T)，而甲基化胞嘧啶(<sup>m</sup>C)則不會受到改變，會保留原來胞嘧啶(C)的型態，可利用限制酵素 *Bst* UI 或 *Taq* I 進行分析(圖 5 和圖 7)，限制酵素 *Bst* UI 可以辨識兩個 CpG 雙核苷酸(dinucleotides)，而 *Taq* I 只能辨認單個 CpG 雙核苷酸，在樣品中利用不同限制酵素之辨識所提供不同 DNA 甲基化程度的訊息，可進一步做校正。根據樣品(樣品 1、2 和 3)不同甲基化的程度(0、50 和 100%)

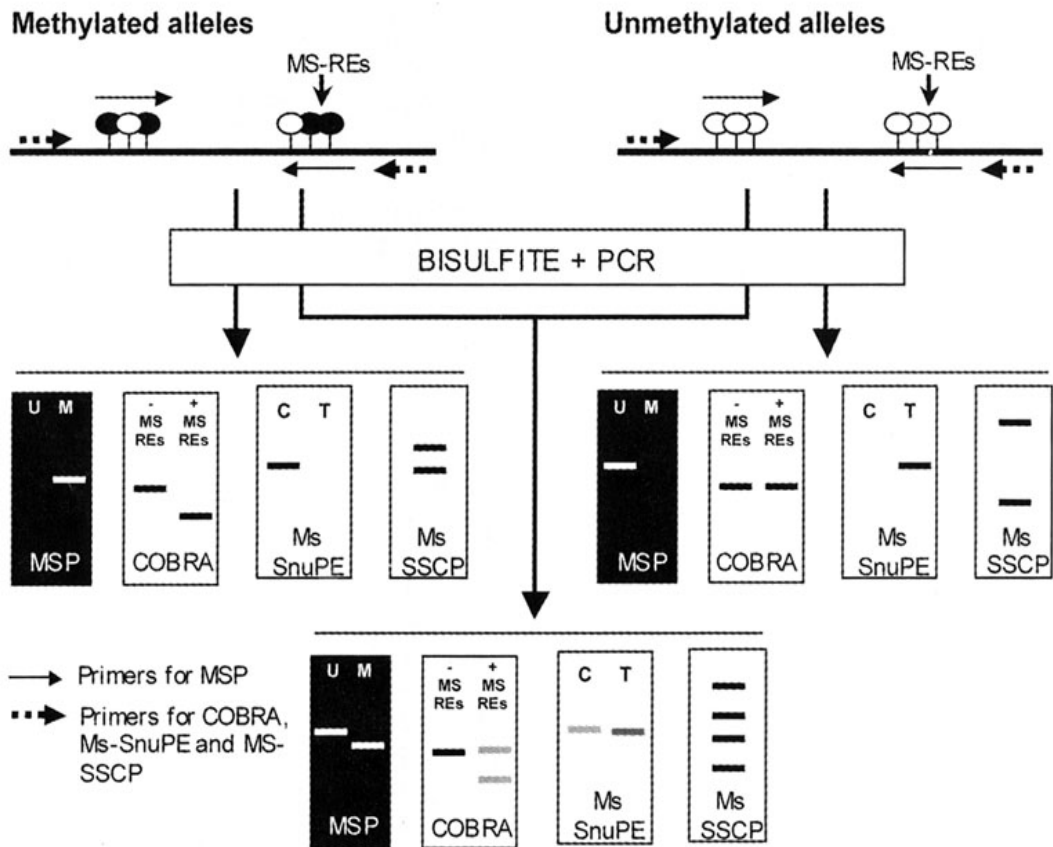
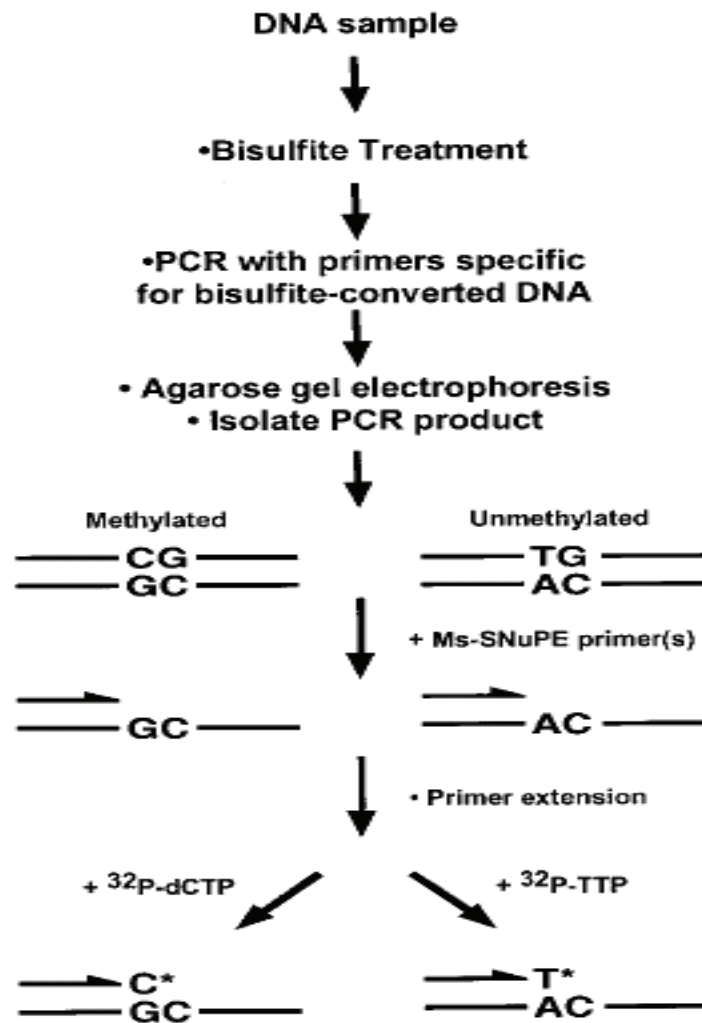


圖 5. 利用重亞硫酸鹽相關方法分析 DNA 甲基化、未甲基化和甲基化/未甲基化混合的三種對偶基因。(說明詳見內文)。  
 Fig. 5. Anticipated results of methylated, unmethylated, and mixtures of methylated/unmethylated alleles obtained by several bisulfite-related methods.

(Fraga & Esteller 2002)



**圖 6.** 以 Ms-SNuPE 方法測定一股特定 DNA 胞嘧啶甲基化狀態概要圖。基因組 DNA 先處理重亞硫酸鈉，隨後目標序列再進行 PCR 以產生模版，去對頂端股進行甲基化分析，底端股甲基化也可以藉由設計適當的引子，以產生底端股的特定模版。PCR 的產物可以進行電泳，而產物可由膠片上分離，隨後利用 Ms-SNuPE 引子、緩衝液、<sup>32</sup>P-dNTP 和 *Taq* 聚合酶進行引子延長反應。在變性情況下，放射性標定的產物在 15% 聚丙烯醯胺凝膠進行電泳後，可以 X-光底片曝光或在磷屏影像定量分析儀下觀察結果。

**Fig. 6.** Outline for the determination of strand-specific methylation status at cytosines by the Ms-SNuPE assay. Genomic DNA is treated with sodium bisulfite followed by PCR of the target sequence to generate the template for top strand methylation analysis. Bottom strand methylation can also be assayed by designing the appropriate primers to generate bottom strand-specific template. PCR products are electrophoresed and isolated from agarose gels followed by incubation with the appropriate Ms-SNuPE primer(s), buffer, [<sup>32</sup>P]dNTPs and *Taq* polymerase for the primer extension reaction. Radiolabeled products are then electrophoresed on 15% polyacrylamide gels under denaturing conditions and visualized by exposure to autoradiographic film or phosphorimage quantitation.

(Gonzalzo & Jones 1997)



## COBRA - Combined Bisulfite Restriction Analysis

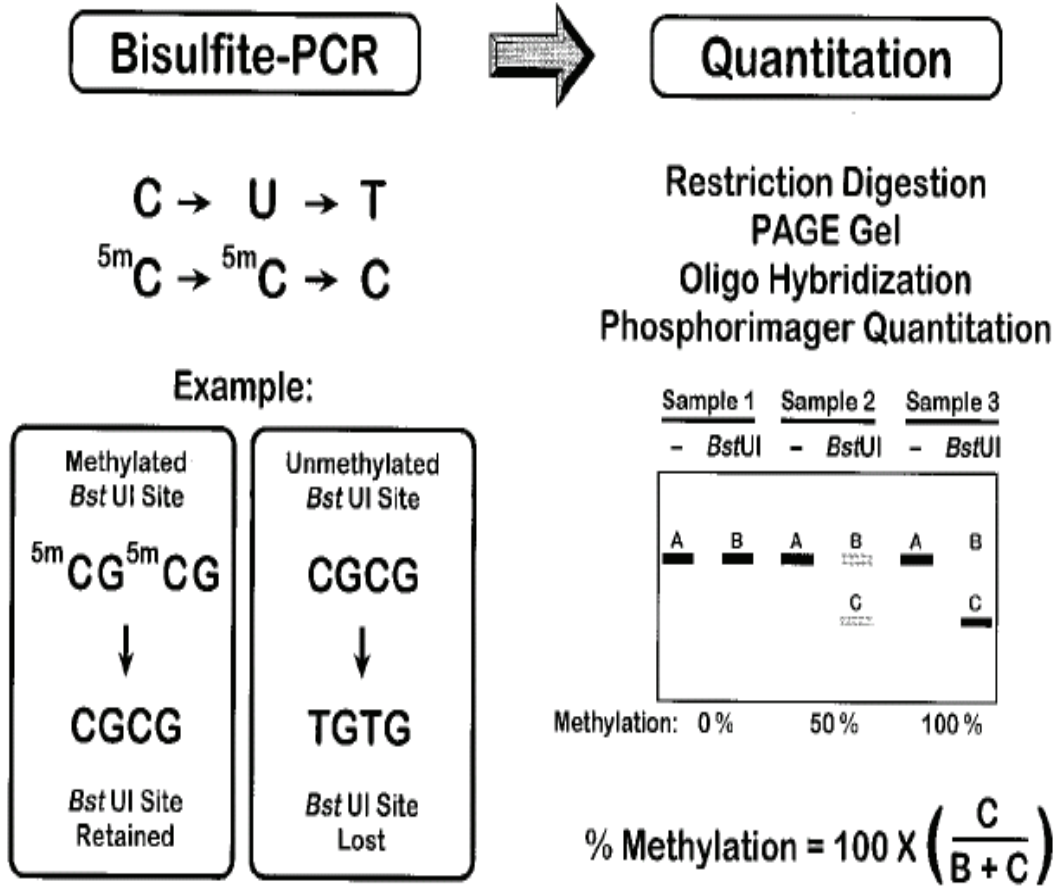


圖 7. COBRA 步驟概要圖。COBRA 的構成是由一個標準重亞硫酸鈉處理 PCR 後，接著進行限制酵素切割和定量。第一個步驟中，未甲基化的胞嘧啶 (C) 能被轉變為胸腺嘧啶 (T)，而甲基化的胞嘧啶 (5mC) 則會維持原來的胞嘧啶 (C)。圖解說明 *Bst*UI 限制切位的結果。經切割的 PCR 產物以變性的 8% 聚丙烯醯胺凝膠分離，藉由電轉印法轉到膜上，用 5' 端標定有放射性的寡核苷酸探針進行雜合反應，隨後可利用磷屏影像分析儀 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 進行定量分析。

Fig. 7. Outline of the COBRA procedure. COBRA consists of a standard sodium bisulfite PCR treatment followed by restriction digestion and quantitation step. During the first step, unmethylated cytosine residues are converted to thymine, whereas methylated cytosine residues are retained as cytosine. The consequences for the restriction site *Bst*UI are illustrated. The digested PCR products are separated on a 8% denaturing polyacrylamide gel and transferred to Zetabind charged membrane (American Bioanalytical) by electroblotting. The membranes are then hybridized with 5'-end-labeled oligonucleotides. Quantitation is performed with a Molecular Dynamics PhosphorImager.

(Xiong & Laird 1997)

，利用限制酵素 *Bst* UI 進行切割後，經電泳分析，發現條帶大小會因甲基化程度不同而異(圖 7)，而根據磷屏影像分析儀 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 可以針對不同樣品 DNA 甲基化的情形作定量分析。

根據 Xiong & Laird (1997)利用 COBRA 法研究人類直腸癌結果指出，用 COBRA 研究樣品 DNA 甲基化的優點為：(1)可以對 DNA 甲基化的情形作準確的定量分析；(2)適合應用在埋蠟切片組織的分析；(3)可應用在大量樣品的分析；由於使用的方法快速簡單，在 DNA 甲基化分析的領域已受到重視。

## 結 論

DNA 甲基化與遺傳突變相比較，顯示在 DNA 序列上的胞嘧啶受甲基化，在不牽涉 DNA 鹼基的改變，就可能會改變基因的表現。為了著手研究特定基因受甲基化的情形，近年來發展的技術在質或量上，針對基因組受甲基化的情形獲取相關的資訊。傳統偵測 DNA 甲基化的技術可提供胞嘧啶在 DNA 序列中，被甲基化的情形進行研究，但是由於可辨識甲基化之限制酵素有限，造成解析度不佳，進而發展結合重亞硫酸鹽的技術，研究 DNA 受甲基化的程度，由於 DNA 經重亞硫酸鹽處理後，會改變 DNA 的鹼基型態(C 變為 T)，可搭配限制酵素(如: COBRA 技術)或 PCR(如: MSP 技術)的使用，針對特定基因或整個基因組之甲基化的差異進行探討。綜合 DNA 甲基化之研究結果，目前所發展的非重亞硫酸鹽或重亞硫酸鹽技術，均可提供做為檢測 DNA 甲基化的基礎，我們可再配合限制酵素、PCR 或定序的原理，獲得定量或半定量的資料，可針對特定基因序列 CpG 受甲基化的密度或分佈進行分析探討，甚至可以利用螢光標定進行定量分析，不需電泳及放射性的操作下，就可探討 CpG 位置受甲基化的總數或異質的基因序列受甲基化的情形。未來 DNA 甲基化的偵測技術若朝向高效能的方法開發未來，將可允許大量樣品被同時分析與篩選，能幫我們對上位遺傳(epigenetics)在基因表現之影響有更深入的了解。

## 引用文獻

- Eads, C. A., K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg, and P. W. Laird. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 28:E32.
- Finnegan, E. J. and K. A. Kovac. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 43:189-201.
- Fraga, M. and M. Esteller. 2002. DNA Methylation: A profile of methods and applications. *Biotechniques* 33:632-649.
- Gonzalzo, M. L. and P. A. Jones. 1997. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylaiton-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin. 1996. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:9821-9826.
- Laird, P. W. 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3:253-266.

- Portis, E., A. Acquadro, C. Comino, and S. Lanteri. 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.* 166:169-178.
- Xiong, Z. and P. W. Laird. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534.

# Progress and Application of DNA Methylation Detection<sup>1</sup>

Yu-Chia Hsu<sup>2</sup>, Hsin-Mei Ku<sup>3</sup> and Chang-Sheng Wang<sup>4,5</sup>

## Summary

Hsu, Y. C., H. M. Ku, and C. S. Wang. 2005. Progress and application of DNA methylation detection. *J. Taiwan Agric. Res.* 54:71-82.

In genome, the DNA methylation levels are closely related with gene expression. Therefore, the analysis of DNA methylation has become an important field in molecular biology. Recently, the non-bisulfite and bisulfite techniques have been developed to detect the methylation of DNA. In the non-bisulfite treatment of DNA methylation analysis called methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) which combines the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique with the application of restriction enzymes that are sensitive to methylation on the recognition sequences. The method is based on the utilization of isoschizomer enzymes that differ in their sensitivities to methylation to determine whether the methylation pattern with is full methylation, hemi-methylation or unmethylation on specific DNA sequences. The MSAP method is mainly limited when the cytosine present on isoschizomer site, because it can not detect a number of cytosine methylation on DNA sequence and results in underestimation of DNA methylation. In the bisulfite treatment of DNA methylation detection, the methylation-specific PCR (MSP) technique is generally applied to study the methylation of CpG island. Primer design is a crucial step to the MSP technique, making this technique very sensitivity, allowing detecting small amounts of DNA methylation in the sample. MSP can also be applied to analyze large numbers of paraffin-embedded and microdissected samples. The methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) technique allows us to detect DNA methylation by using single nucleotide primer applying to the genomic DNA treated with sodium bisulfite to amplify and estimate the difference of methylation on specific CpG sites. With this method, DNA methylation can be quantified without using restriction enzymes, and the methylation at multiple CpG sites can be detected in a single reaction by using a multiplex oligonucleotide strategy. Low sensitivity is the mainly drawback of Ms-SNuPE technique. The recent developed COBRA (combined bisulfite restriction analysis) technique is a quantitative DNA methylation method. It can detect the methylation levels of specific locus in small amounts of genomic DNA, and accurate quantitative analysis on DNA methylation sequence. Furthermore, it can also apply to analyze a large amount of samples and paraffin-embedded tissue samples. Therefore, the application of COBRA technique in DNA methylation analysis has arose great attention.

**Key words:** Methylation, CpG island, Non-bisulfite, Bisulfite.

- 
1. Contribution No.2227 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: June 30, 2005.
  2. Graduate Student, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
  4. Senior Agronomist, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  5. Corresponding author, e-mail: cswang@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302806.