

人类性染色体研究进展

张红国 刘睿智 段晓刚

【摘要】 最近研究表明:一对性染色体可能是由一对远古常染色体进化而来。Y 染色体是人类最小的染色体,是男性特有的染色体,包含 SRY 等多个男性特有基因。Y 染色体上的男性特有序列(MSY)是一个包含不同染色质序列的嵌合体,MSY 包含多个回文序列。回文序列上经常发生臂间基因转换,使 Y 染色体具有自我保护能力。女性失活 X 染色体上有 15% 的基因逃离失活进行表达,可能在男女性别不同和女性个体间差异中起决定作用。

【关键词】 性染色体; 回文序列; 自体性行为; 逃离失活

Advance of Study in Sex Chromosomes in Human ZHANG Hong-guo¹, LIU Rui-zhi², DUAN Xiao-gang¹.

(¹ Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021; ² Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, P. R. China)

Corresponding author: LIU Rui-zhi. E-mail: lrz420@126.com

【Abstract】 Recently, some researches indicate that modern X and Y chromosomes evolved from ancient autosomes. Y chromosome, the smallest chromosome of human, is male-specific chromosome. There are many male-specific genes including SRY gene. The male-specific region of the Y chromosome(MSY) is a mosaic of discrete sequence classes. Eight palindromes comprise one-quarter of the euchromatic DNA of MSY. There are abundant gene conversion between arms of palindromes in Y chromosomes of human which caused powers of self-preservation. Women still express many genes from their inactive X chromosomes and 15% of the genes on the inactive X chromosome are active. This phenomenon may eventually explain some of the behavioural and biological differences between individual women, and perhaps, between women and men.

【Key words】 Y chromosome; Palindromic sequence; Sex with itself; Escaping inactivation

近几年来,随着基因组计划研究的深入,人类染色体基因测序工作有了极大的进展,人类性染色体的研究也不断有新的发现。人类性染色体包括 Y 染色体和 X 染色体。

1 Y 染色体

男性的性染色体构成是:一条 Y 染色体和一条 X 染色体,其中 Y 染色体是男性特有的染色体,从结构上看,它比 X 染色体小得多。

1.1 Y 染色体的早期研究:1921 年,Painter^[1]报道了利用光学显微镜发现了人类细胞存在男性特有的染色体:Y 染色体。1959 年,Jacobs 对 Klinefelter (XXY)性染色体构成的男性研究和 Ford 对 Turner (XO)性染色体构成的女性研究均说明了 Y 染色体

可能携带性别决定的关键基因^[2]。长时间以来,因为只有男性有 Y 染色体,人们一直认为 Y 染色体的惟一作用就是性别决定。

人的初级性别取决于 Y 染色体,起决定作用,睾丸分化的关键在于 Y 染色体的性别决定基因在足细胞系中表达,由此启动了一系列事件的发生,最后生成睾丸。最初推测 Y 染色体上一定存在与性别相关的基因。后来,人们证实了 Y 染色体短臂上有睾丸决定因子(testis-determining factor, TDF)。

然而,1976 年,Tiepolo 等^[3]研究发现 Y 染色体的长臂上存在与精子发生相关的基因,从而改变了人们传统观念上对 Y 染色体功能单一的认识,并开创了 Y 染色体功能研究的新领域。

1990 年,Sinclair 等^[4]从人类 Y 染色体上分离出了性别决定基因 SRY (sex-determining region Y)。另外,大量研究表明 SRY 是 TDF 的候选基因。当然, Y 染色体 SRY 对于男人的发育只是必要条件,并非充分条件,还需要一些睾丸促进因子、生精相关基因等。只有它们相互作用,最后才能刺激雄性生殖器

基金项目:吉林省科技厅资助项目(No. 20030433)

作者单位:130021 长春,吉林大学基础医学院细胞生物学研究室,吉林省生殖医学研究所(张红国、刘睿智);130024 长春,东北师范大学遗传与细胞研究所(张红国、段晓刚)

通讯作者:刘睿智(E-mail:lrz420@126.com)

官生成。这一过程相当复杂而严密,任何一处出现异常都会导致发育异常,最终出现男性不育。

1.2 Y染色体的结构

1.2.1 Y染色体的结构分带 Y染色体的短臂和长臂各只有一个区,短臂只有一个带,但可分为3个亚带(Yp11.1、Yp11.2、Yp11.3),Yp11.3又可分为2个亚带(Yp11.31和Yp11.32);长臂分为2个带(Yq11和Yq12),1带分为两个亚带(Yq11.1和Yq11.2),2亚带又可分为3个亚亚带(Yq11.21、Yq11.22、Yq11.23)^[5]。

1.2.2 Y染色体的主要基因结构 Y染色体是人类最小的一条染色体,通常认为与X染色体互为同源染色体,但Y染色体上有95%为非重组区域。Y染色体上含约519万kb的DNA,其中60%位于其长臂(Yq)的异染色体区(Yq12),短臂含约113kb的DNA。目前,Y染色体上被克隆出来的基因有200多个,真正被基本确定的基因还不到一半^[5]。

1976年,Tiepolo等^[3]通过细胞遗传学研究发现无精子症患者有Y染色体长臂缺失,推测Y染色体长臂上存在“精子生成基因”,由于他们是对无精子症患者进行研究,因此命名为无精子因子(azoospermia factor, AZF)。近30年来,与男性精子发生相关的基因研究日益深入和广泛。无精子因子AZF位于染色体Yq11,并在睾丸中特异性表达。1992年,Vogt等^[6]发现有许多位点与精子发生相关,其中最主要的是AZF上互不重叠的3个区段,包括:Y染色体近段、中段和远段,分别称为AZFa、AZFb和AZFc。1999年,Kent-First等^[7]报道认为在AZFb和AZFc还应该有一个基因,命名为AZFd。

AZFa位于染色体Yq11区域,大约400~600kb。目前,UPS9Y(ubiquitin-specific protease 9, Y)和DBY(dead box Y-pollible belicase)被认为是AZFa的重要候选基因。AZFb位于染色体Yq11.23的近端区域,RBM(RNA binding motif)被认为是AZFb的主要候选基因。AZFc位于染色体Yq11.23的远端区域,DAZ(deleted in azoospermia)被认为是AZFc的重要候选基因。还没有发现AZFd的候选基因。

SRY作为睾丸决定因子TDF的候选基因于1990年被Goodfellow定位在Y染色体短臂上^[8]。在性腺中,SRY若发生突变,不能产生睾丸决定因子,导致未分化性腺的中胚层发育成卵巢,使胎儿雌性化,刺激生成雌性生殖器官,发育成表形女性。

1.3 Y染色体的最新研究:随着人类基因组计划测序的进展,Y染色体序列也已经基本完成。2003年,Skaletsky等^[2]和Rozen等^[9]报道了Y染色体的最

新研究。

1.3.1 Y染色体上男性特有序列(male-specific region of the Y chromosome, MSY)基因组研究揭示了Y染色体有一个区域,由其长度的95%组成,没有X-Y交叉。这个区域曾经被认为是非重组区域(non-recombining region, NRY)。而Skaletsky等^[2]研究发现这个区域也发生大量的重组,因此,把它更名为MSY。MSY两侧被拟常染色体(pseudoautosomal)区域包围,在这些拟常染色体区域中X-Y交叉是在减数分裂中正常的频繁发生。

MSY包含Y染色体序列的95%的长度,全长23Mb,短臂(Yp)的8Mb和长臂(Yq)的14.5Mb。在MSY中,包含一个着丝粒异染色质区(约1Mb)和一个跨度约400kb的异染色质区。

MSY包含所有已知的156个转录单元,其中包括78个编码蛋白质的基因,约60个属于9个不同的MSY特殊基因家族成员,另外18个是单拷贝基因。它们编码至少27个已经清楚的蛋白质。在这已知的27个编码蛋白质的基因中,有11个是睾丸组织专一性表达,12个是广泛表达。此外,MSY还含有78个转录单位,不编码蛋白质。其中65个属于15个MSY特殊基因家族成员,另外13个是单拷贝基因。

Skaletsky等^[2]报道MSY是一个包含不同染色质序列的嵌合体。它包含三种类型的常染色质序列:X-转座(X-transposed)、X-退化(X-degenerate)和扩增单元(ampliconic)。

X-转座序列长约3.4 Mb,表现出与X染色体(Xq21)99%的一致性。X-退化序列是有单拷贝的或27个X连锁基因相应的假基因零散分布在MSY上的。这些序列60%~90%是与X染色体相应序列相同的,可能是远古常染色体(ancient autosomes)的遗迹。现代X和Y染色体就是由这些远古常染色体进化而来的。X-退化序列能编码MSY中已清楚编码蛋白质的16个,12个广泛表达的基因都在这个区域,而11个组织特异性表达的基因只有一个在这个区域表达,即SRY。这个扩增单元(ampliconic)包含一个大的区域(大约占MSY常染色质的30%),总长度10.2Mb,这些序列表明了99.9%以上都相同,通过频繁的基因转换(非互惠转移)来维持。

1.3.2 MSY中的回文序列(palindrome) Rozen等^[9]报道了MSY中扩增单元最突出的结构特征是有8个大的回文序列。这些回文序列被命名为P1~P8,它们的臂长从9 kb(P7)到1.45Mb(P1)不等。每一个回文序列的双臂都由2~170kb的非复制间隔隔

开。8个回文序列总长为5.7Mb,占人类Y染色体男性特殊区域(MSY)的常染色质序列DNA的四分之一。它们包含多个睾丸特有基因(至少包含6个睾丸基因)和表现出典型的臂与臂之间99.97%的序列相同。已知的DAZ包含4个拷贝,2个在P1上,2个在P2上。

用人与猿比较, Rozen等^[9]证明了这些MSY回文序列至少6个在人和黑猩猩的血统中提早发生了分歧,而发生在5百万年前。这些回文序列的双臂随后参与基因转换,控制一对双臂使之进化一致。有研究表明,基因转换有时包括同一染色体重复序列间的基因转移,成为染色体的自体性行为(sex with itself)。事实上,存在于人类种群中的MSY回文序列变异的分析提供了在种群中臂与臂基因再发生转换的证据。Rozen等^[9]得出结论:在新的进化中,每一个新生男婴都要遭受平均大约600个核苷的Y-Y交换,这在MSY中多拷贝的睾丸基因家族的进化中起一个重要的作用。

1.4 Y染色体最新研究的意义:

1.4.1 发现Y染色体具有自我保护能力 曾经有报道称Y染色体终将死亡,男性最终将消失,看来这些报道夸大了事实。Y染色体测序的完成揭示了从前低估了Y染色体的自我保护能力。Y染色体有它独特的方法来保护它的基因,使之拥有决定性别的能力。

Willard^[10]认为没有注意到在人类基因中可能有这样的基因交换水平,即Y染色体内部回文序列的双臂间的交换,它给此研究提供了了解Y染色体如何保护自己的线索。

1.4.2 能够促进对男性不育的研究 当DNA分离时,回文序列的镜象结构也使DNA臂间发生交换。基因被打乱并且有害的基因被清除了。有益的基因和有害的基因一样会在转换中丢失,这是男性不育的主要原因。在回文序列内,大多数是控制睾丸发育的基因。因此,在几千个男性中就有一个不育者,是因为关键的基因丢失^[11]。

这个决定男性的Y染色体以前被认为是基因走向死亡的不毛之地。然而,Y染色体的作用是一把双刃剑,虽然臂间交换能够保护它的基因,却有时会引起不育,测序完成将帮助我们诊断和治疗这些遗传疾病。

遗传检测已经被用于男性不育的诊断。更全面的理解Y染色体的构成将会帮助改善这些测试实验,并且医生对夫妇的建议也会更合理。对不同的患者,基因变异不同,可以在分子水平上深入了解,

当然有针对性治疗就会更合理。

1.4.3 为研究性染色体的起源和进化拓展了空间 Y染色体的最新研究,不单单是了解Y染色体自身的保护措施,一些研究者也发现了它在进化上的价值。

Willard^[10]认为,在性别决定的进化过程中,人类的性染色体X和Y起源于3亿年前远古常染色体,它们在后来的世代期间序列上发生了分歧。Skaltsky等^[2]报道了支持人类X和Y染色体是由一对普通的常染色体进化而来的。认为Y染色体是退化的X染色体。现已知在Y染色体的任何一端都有相关短的区域与X染色体的相应区域是相同的,反映了DNA分子在精子发生过程中这些区域经常发生交换。

Rozen等^[9]报道了回文序列中发生大量的基因转换。这些回文序列包含许多基因,并且在每一个回文序列末端都有一个拷贝。基因转换结果会出现变异。Page等已经计算了Y染色体在每一代中回文序列产生的近于精确的交换。他们估计每一位男性的Y包含600个DNA碱基不同于它的父本,这比正常的突变率要高出上千倍^[11]。

因此,部分学者认同,X和Y染色体起源于远古的一对常染色体,Y染色体在进化中退化,但发展了它自身特有的保护机制。

2 X染色体

男性和女性的性染色体中都有X染色体存在,而男性只含一条X染色体,女性含两条染色体。Check^[12]分析认为:虽然男女表现出不同的特征,但是很长时间以来,科学家们都相信,涉及到它们的DNA时,它们没有真正的不同。但是,最新的研究发现,当涉及到一个至关重要的染色体时,却比原来想象的要不同得多。

一般认为,女性的两条X染色体在每一个细胞中只有一条有活性,而另一条失活。不过,最新的研究发现,女性失活的X染色体有部分基因仍然有活性。

2.1 X染色体的最新研究:Gunter^[13]分析说:X染色体最初命名为“未知”,已经使遗传学家迷惑了多个世纪。现在认为X染色体仍然是一个奇异的东西。

目前,Ross等^[14]报道了X染色体全长大约155Mb,共有1098个基因(7.1个基因/Mb)。这些基因分为4类:已知编码蛋白质的基因699个,新的编码基因132个,公认的转录基因101个,新的转录基因166个。全部的1098个基因的外显子占X染色

体序列的 1.7%。

在 X 染色体上基因密度较低,同时基因长度也较短。如 X 染色体上平均基因长度是 49kb,与 13 号染色体上平均基因长度 57kb 相比要短。但是 X 染色体上包含人类基因组中已知的最长的基因:营养不良蛋白(dystrophin)基因 *DMD*,该基因位于 Xp21.2,全长 2 220 223bp。

研究还发现 X 染色体上存在 *ncRNA*(non-coding RNA)基因,预测可能含约 173 个 *ncRNA* 基因。其中最主要的 *ncRNA* 基因是 *XIST*(X(inactive)-specific transcript),该基因位于染色体 Xq13,全长 32 103bp,对 X 染色体失活(X-chromosome inactive, XCI)是非常重要的。

Gunter^[13]报道了在早期的雌性发育过程中,细胞随机选择父本或母本的一条 X 染色体成为有活性的 X 染色体,而另一条则由于该染色体中部的基因 *XIST* 转录大量的 RNA。这条染色体由于被这些 *XIST* 的 RNA 包被,改变了它的 DNA 和相关的蛋白质而失活。

Ross 等^[14]研究确定了 X 染色体上 99.3% 的常染色质的顺序。并且还分析说明了哺乳动物性染色体的常染色体起源,这个渐进的过程导致了 X 和 Y 染色体之间再结合时的缺失,随后的 Y 染色体退化程度也在扩大。

研究还发现,LINEs(long interspersed nuclear elements)重复元件覆盖了 X 染色体的三分之一,这样的分布被认为在 X 染色体失活过程中起作用。在 X 染色体上的 1 098 个基因中,有 98 个编码蛋白质的基因在睾丸和各种肿瘤细胞中表达,属于一个基因家族——睾丸抗原基因(testis-antigen genes)家族。有大量的符合孟德尔遗传的疾病被证明与 X 染色体相关,在这些疾病中,168 种已经通过 113 个 X 连锁基因的突变得到了解释。

Carrel 等^[15]研究发现,在雌性哺乳动物中,大多数一个 X 染色体上的基因由于染色体失活而沉默,但这些基因并不是完全没有活性的。Carrel 等^[15]通过设计标签标记了来自 X 染色体基因的信息,这些标签能使他们查明哪些基因正在逃离失活。结果发现某些基因可以从失活的 X 染色体上逃离,并且在失活和有活性的染色体上都能表达。事实上,在 1997 年,Brown 等^[16]就已经发现了失活染色体上有基因表达的现象。1999 年,Carrel 等^[17]报道了 X 连锁基因 *REP1* 能在失活的(*Xi*)和有活性(*Xa*)的 X 染色体上表达,不过失活的染色体上表达的量要比有活性的染色体上表达的量小。

总的来说,Carrel 等认为大约有 15% 的 X 连锁基因在某种程度上逃离失活的 X 染色体,并且在这条 X 染色体的不同部位基因逃离的比例也明显不同。另外,失活 X 染色体上还有另外 10% 的基因在样本中的个别细胞中也被转变为有活性的基因。但是,这些基因活性是怎样表现出来的,目前还不清楚。

2.2 X 染色体最新研究的意义

2.2.1 有助于了解人的个体差异 逃离失活的 X 染色体的基因,伴随活性 X 染色体上的基因同时都在细胞中表达。Carrel 等^[15]认为,这些基因可能为男女性别不同的特征提供潜在的作用,还可能为具有相同 X 染色体条件的女性之间表现型却不同提供潜在的原因,还可能为携带有异常 X 染色体的患者的临床畸形作出潜在的解释。

一般认为,女性的一条 X 染色体失活,只有另一条有活性。因为两条 X 染色体哪一条失活是随机的,所以不同的女性表达的基因可能是在两条中的任意一条上。目前,发现失活的 X 染色体有逃离的基因表达,并且不同的女性失活 X 染色体上表达的基因也不同,因此,这可能是不同女性之间表现各不相同的原因之一。

另外,由于失活 X 染色体上表达的基因在女性有活性的 X 染色体上也表达,女性得到基因表达产物的剂量比男性更高,因此,这也可能是男女性别不同的原因之一。Carrel^[15]认为:虽然研究没有提供基因解释男女不同的证据,但它提供了一些候选基因。另外,科学家们认为目前研究的只是一种类型的细胞,要得到一个普遍的结论,还需要其他类型细胞的实验结果证实。

2.2.2 为基因治疗提供了新的希望 X 染色体的 10% 的基因属于一个家族(睾丸抗原基因),这些基因与癌症相关。因为它们仅在癌细胞和男性生殖细胞中表达,当肿瘤发生时,其表达产物通常在免疫系统被发现,这些基因对潜在的基因治疗是非常有希望的目标。

2.2.3 促进对性染色体进化的了解 Check^[12]评论认为,来自 X 序列的其他主要发现是它能帮助我们理解染色体怎样进化的,它是怎样传送信号关闭失活的 X 染色体的。另外,在 X 染色体的不同部位基因逃离失活 X 染色体的比例明显不同,反映出性染色体进化的历史^[15]。X 染色体与 Y 染色体作为一对同源染色体,它们起源与远古的一对常染色体,在进化过程中,都会表现出其独特的一面。因此,对 X 染色体深入的研究,可以从分子水平上深入了解性染色体的进化过程。

参 考 文 献

- 1 Painter TS. The Y-chromosome in mammals. *Science*, 1921, 53 :503 – 504.
 - 2 Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003 423 825 – 837.
 - 3 Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*, 1976 34 :119 – 124.
 - 4 Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990 346 :240.
 - 5 Zhou ZM. Genetic character of human chromosome. *National J Anadrol*, 2000 6 :211 – 218.
[周作民. 人类 Y 染色体的遗传特性. *中华男科学* 2000 6 :211 – 218.]
 - 6 Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, *et al.* Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet*, 1992 89 :491 – 496.
 - 7 Kent-First M, Muallem A, Shultz J, *et al.* Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev*, 1999 53 :27 – 41.
 - 8 Du XJ, Fu J, Cai LL, *et al.* Expression Of human SRY gene and the DNA-binding property of its product. *Chin J Med Genet*, 1998 15 :290 – 292.
[杜晓娟, 伏瑾, 蔡玲玲, 等. 人 SRY 基因表达及表达蛋白的结合功能研究. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15 :290 – 292.]
 - 9 Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, *et al.* Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*, 2003 423 873 – 876.
 - 10 Willard HF. Tale of the Y chromosome. *Nature*, 2003 423 810 – 813.
 - 11 Whitfield J. Y chromosome sequence completed. <http://www.nature.com/news/2003/030616/full/030616-16.html>
 - 12 Check E. Genetics : the X factor. *Nature*, 2005 434 :266.
 - 13 Gunter C. She moves in mysterious ways. *Nature*, 2005 434 :279 – 280.
 - 14 Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 2005 434 325 – 337.
 - 15 Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 2005 434 400 – 404.
 - 16 Brown CJ, Carrel L, Willard HF. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet*, 1997 60 :1333 – 1343.
 - 17 Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome : an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999 96 :7364 – 7369.
- (收稿日期 2005-06-22)
(本文编辑 王璐)
-
- (上接 203 页)
- Genome Res, 2002 12 :525 – 526.
 - 4 Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*, 2003 33 :238 – 244.
 - 5 Smiraglia DJ, Plass C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene*, 2002 21 :5414 – 5426
 - 6 Rush LJ, Raval A, Funchain P, *et al.* Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res*, 2004 64 :2424 – 2433.
 - 7 Yan PS, Chen CM, Shi H, *et al.* Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation. *J Nutr*, 2002 132 :2430S – 2434S.
 - 8 van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, *et al.* Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma : promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *J Clin Oncol*, 2005 23 :3886 – 3896
 - 9 Toyota M, Issa JP. Methylated CpG island amplification for methylation analysis and cloning differentially methylated sequences. *Methods Mol Biol*, 2002 200 :101 – 110.
 - 10 Eads CA, Laird PW. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA). *Methods Mol Biol*, 2002 200 :71 – 85.
 - 11 Brena RM, Auer H, Kornacker K, *et al.* Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 :E17.
 - 12 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, *et al.* Methylation specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Acad Sci U S A*, 1996 93 :9821 – 9826
 - 13 Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods*, 2001 25 :456 – 462.
 - 14 Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, *et al.* Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2005 33 :6823 – 6836.
 - 15 Shi H, Maier S, Nimmrich I, *et al.* Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis : principles and applications. *J Cell Biochem*, 2003 88 :138 – 143.
 - 16 Gitan RS, Shi H, Chen CM, *et al.* Methylation-specific oligonucleotide microarray : a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res*, 2002 12 :158 – 164.
 - 17 Gonzalzo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Methods*, 2002 27 :128 – 133.
 - 18 Sievers S, Alemazkour K, Zahn S, *et al.* IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005 44 :256 – 264.
 - 19 Colella S, Shen L, Baggerly KA, *et al.* R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*, 2003 35 :146 – 150.
 - 20 Dupont JM, Tost J, Jammes H, *et al.* De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem*, 2004, 333 :119 – 127.
- (收稿日期 2005-08-26)
(本文编辑 孙岩伟)