



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

EWAS 研究方案

2016 年 3 月 30 日



目 录

目 录	2
一、 项目概述	3
二、 技术平台介绍	3
二、 850K 甲基化芯片样本要求	5
三、 数据分析	7
1. ILLUMINA 850K 甲基化芯片 EWAS 分析技术路线	7
2. 分析步骤	8
3. 数据的验证	10
4. 分析结果展示	11
四、 上海伯豪生物介绍	23

一、项目概述

全表观基因组关联研究 (epigenome-wide association studies, EWAS) 与 GWAS (Genome-wide association study) 类似, 都是在全基因组水平上寻找与疾病或某些性状相关联的位点, 两者的差别在于 GWAS 关注于 SNP 的差异而 EWAS 关注于表观修饰的差异。EWAS 研究的基础在于复杂疾病或某些复杂性状可能受到表观遗传机制的调控, 而这些表观遗传修饰的差异, 可通过关联分析筛选得到。EWAS 是一项热门的研究手段, 越来越多的文章应用此方法寻找到了很多与复杂疾病、衰老及肥胖等相关的位点。目前 EWAS 研究领域应用最广泛的是基于甲基化修饰的关联分析, 因为甲基化修饰在基因表达调控中的重要性、及甲基化修饰化学的稳定性, 以及目前的甲基化检测的技术的经济可靠, 使得 Illumina450K, 850K 甲基化芯片成为甲基化的表观基因组关联研究的最合适的技术。

在本项目中拟采用 Illumina Infinium EPIC 芯片 (850K 芯片) 对复杂性疾病进行 EWAS 分析, 在疾病组与正常对照间筛选与疾病所关联的表观遗传学标记。通过找到的标记进一步定位与疾病相关的致病基因, 为研究其分子机制提供线索。

二、技术平台介绍

全基因组甲基化检测方法 (Illumina 850K)

Illumina 在原 450K 芯片巨大成功的基础上, 推出了新一代的 DNA 甲基化芯片 Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip 芯片 (下文中以 850K 芯片代称), 为研究者提供了一个可靠且经济高效的甲基化分析平台。850K 芯片不但保持了对 CpG 岛, 基因启动子区的全面覆盖, 还特别加强了增强子区 (新增了 333,265 个探针覆盖来自 ENCODE 及 FANTOM5 计划的增强子) 以及基因编码区的探针覆盖。广泛应用于干细胞研究、肿瘤和其他复杂疾病研究, 是目前最适合表观基因组全关联分析研究的全基因组 DNA 甲基化芯片。

1) 850K 芯片的技术特点

- ◆ 覆盖全面: 检测 853,307 个 CpG 位点; 全面覆盖 CpG 岛、启动子、编码区及增强子。
- ◆ 无需“甲基化 DNA 免疫共沉淀”, 亚硫酸氢盐处理基因组 DNA 即可进行芯片实验; Infinium 探针设计, 直接识别甲基化位点。
- ◆ 技术重复重现率 > 98%。
- ◆ 操作简单, 无须 PCR 扩增; 模板量可低至 250ng。
- ◆ 适用于 FFPE 样品。

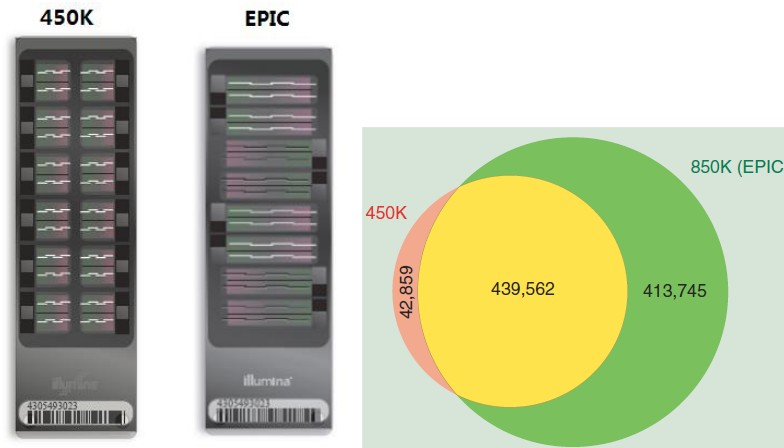


图 1 Infinium 850K 芯片与 450K 甲基化芯片的格式及探针数目的差异。

850K 芯片对基因组的功能元件实现了空前全面覆盖,下图及表格统计展示了 850K 芯片对于不同染色体、基因组功能元件的覆盖及分布。以上的设计不但可从泛-增强子及编码区域角度分析甲基化组,还在全基因组表观遗传关联研究 (EWAS) 中发挥重要作用。850K 芯片中包含的一系列有价值的位点:

- CpG 岛以外的 CpG 位点
- 人类肝细胞中的非 CpG 甲基化位点 (CHH 位点)
- 肿瘤 (多种类型的癌症) VS 正常样本中的不同甲基化位点, 可以检测多种样本类型
- FANTOM5 增强子
- ENCODE 开放染色质和增强子
- 脱氧核糖核酸酶超敏位点
- miRNA 启动子区域
- 涵盖 Infinium Methylation 450 BeadChip 芯片中的 > 90% 的内容

DNA 甲基化的研究,最大的难点是数据的可靠性及可重复性,利用 Illumina Infinium 甲基化芯片以全面独特位点组合、由领域专家选择的覆盖范围、样本通量高以及经济的成本价格等优势,使它成为目前表观基因组学(EWAS)的理想解决方案。

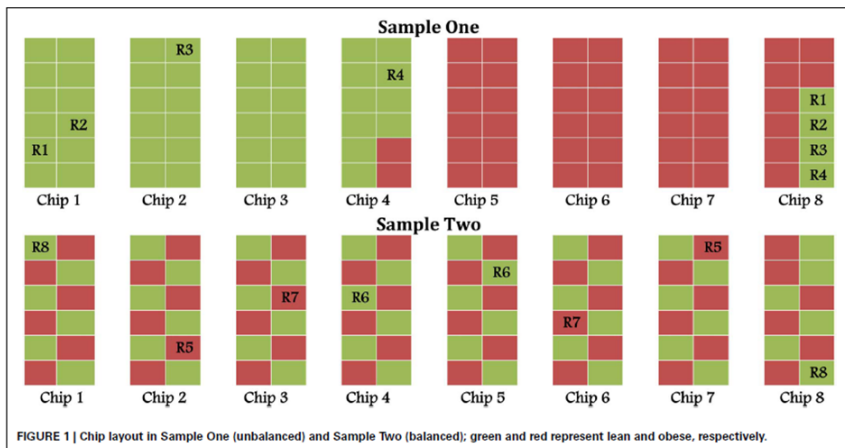
a) 如何解决 Illumina 甲基化芯片在实验过程产生的批间误差?

答: 随着该芯片在疾病人群研究中的广泛应用,目前已经探索开出发针对 Illumina 450K 甲基化芯片的片间归一化和校正策略(Liu, Aryee et al. 2013; Buhule, Minster et al. 2014; Fortin, Labbe et al. 2014)将批间误差降到最低。

由于本次项目包含的样本数量较多,不可能在同一批次将所有样本完成。因此在实验设计方面,建议参照近期发表的类似实验成功案例设计(Byrne, Carrillo-Roa et al. 2013; Dempster, Wong et al. 2014; Nilsson, Jansson et al. 2014; Tan, Frost et al. 2014; Lemire, Zaidi et al. 2015):

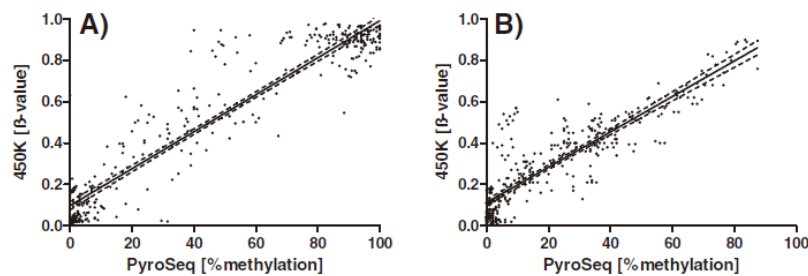
- ✓ 建议同一张芯片均匀地分布散发 Case 与 control 的 DNA 样本;

✓ 如果有双胞胎样本，则建议杂交在同一芯片的两个相邻点阵。(如下图中 Sample two)



h) 焦磷酸测序(pyrosequencing)与 illumina 甲基化芯片结果的一致性评估。

答：焦磷酸测序技术是 CpG 甲基化定量的金标准。焦磷酸测序可以针对连续多个 CpG 位点生成每个位点的准确且具有高度可重复性的甲基化频率数据。内置的亚硫酸氢盐转化对照可在无人工添加外置对照的情况下监测转化的情况，避免因不完全转化带来的假阳性甲基化结果，确保实验结果的可靠性。使用 Illumine 450k methylation array 对全基因组范围内的甲基化异常进行检测，用 Pyrosequencing 对单个甲基化区域进行定量和验证。交互验证的结果表明两种方法间有很好的 consistency (Roessler, Ammerpohl et al. 2012)。



二、850K 甲基化芯片样本要求

1. 样品纯度：OD 260/280 值应在 1.7 ~ 2.0 之间；RNA 应该去除干净；不得有其它个体或其它物种的 DNA 污染。
2. 样品浓度：浓度不低于 50ng/μl；
3. 样品总量：每个样品总量不少于 2μg 。
4. 样品溶剂：溶解在 TE 中。
5. 样品运输：DNA 低温运输 (-20°C)；在运输过程中请用 parafilm 将管口密封好，以防出现污染。

6. 样本类型的选择:

对于样本类型的选择, 一般建议选择与研究的疾病或性状最具有相关性的组织, 如果复杂疾病难以确定组织或难以取得材料, 可以考虑用全血或淋巴细胞。

(附: 一些研究采用的材料, 详见原文) (Castillo-Fernandez, Spector et al. 2014)

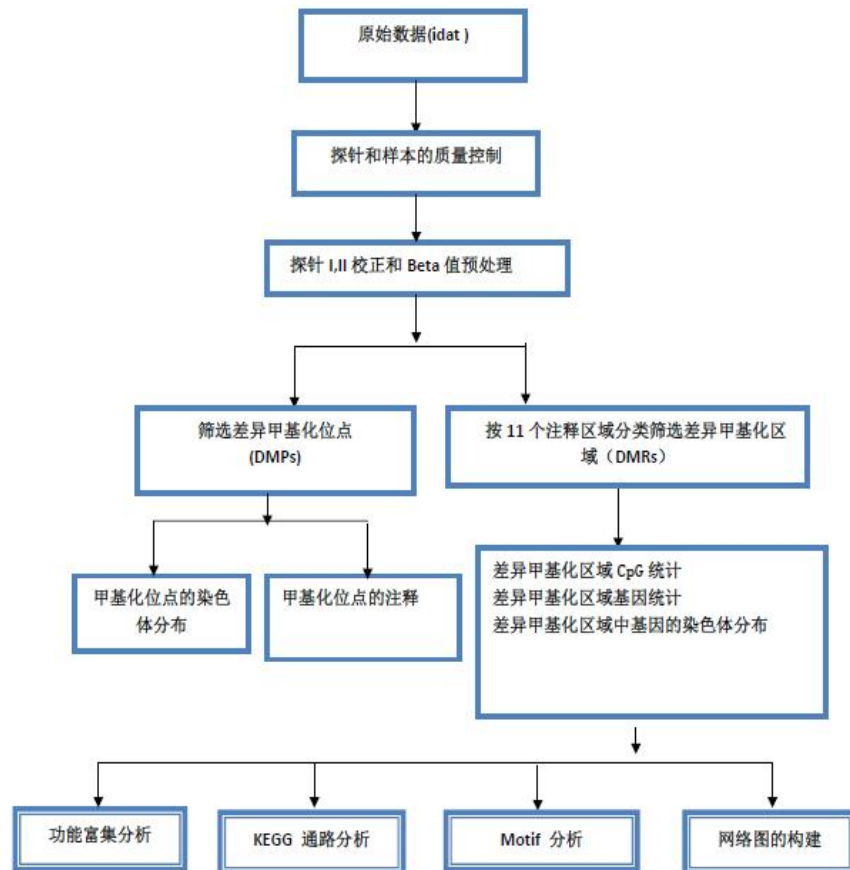
Table 1 Epigenetic studies using discordant MZ twins*

Phenotype	Assay	Tissue (cell heterogeneity correction) [†]	Major findings	Identification cohort	Validation/replication
Adolescent depression	Illumina 450 K	Buccal cells (no correction)	Two differentially methylated positions reproducible in brain	18 discordant pairs of MZ twins	Validation: bisulfite pyrosequencing
Alzheimer's disease	Immunohistochemistry for 5-methylcytosine	Temporal neocortex (no correction)	Significantly reduced levels of DNA methylation	1 discordant MZ twin pair	
Autism spectrum disorders	Custom array [§]	Lymphoblastoid cells (no correction)	73 differentially methylated CpG islands	3 pairs of male discordant MZ twin pairs	Validation: bisulfite sequencing and methylation-specific PCR
Autism spectrum disorders	Illumina 27 K	Whole blood (no correction)	Differentially methylated regions in genes already mentioned in the literature	34 discordant and 5 concordant MZ twin pairs for ASD or a related trait	Validation: bisulfite pyrosequencing
Bipolar disorder	Illumina 27 K	Whole blood (no correction)	Hypomethylation in the upstream region of <i>GPR24</i>	11 discordant MZ twin pairs	
Bipolar disorder	MS-RDA	Lymphoblastoid cells (no correction)	Hypomethylation of <i>PPIEL</i>	1 discordant MZ twin pair, 23 unrelated cases, and 18 unrelated controls	Validation: bisulfite pyrosequencing
Birth weight	Illumina 450 K	Saliva (correction for buccal epithelium and leukocyte subtypes)	45 differentially methylated CpG sites	17 discordant monozygotic MZ female twin pairs	Validation: bisulfite sequencing
Breast cancer	Illumina 450 K	Whole blood (no correction)	<i>DOK7</i> as a candidate for blood-based cancer diagnosis	15 discordant MZ twin pairs	Validation: bisulfite pyrosequencing of 21 discordant MZ twin pairs

三、数据分析

1. Illumina 850K 甲基化芯片 EWAS 分析技术路线

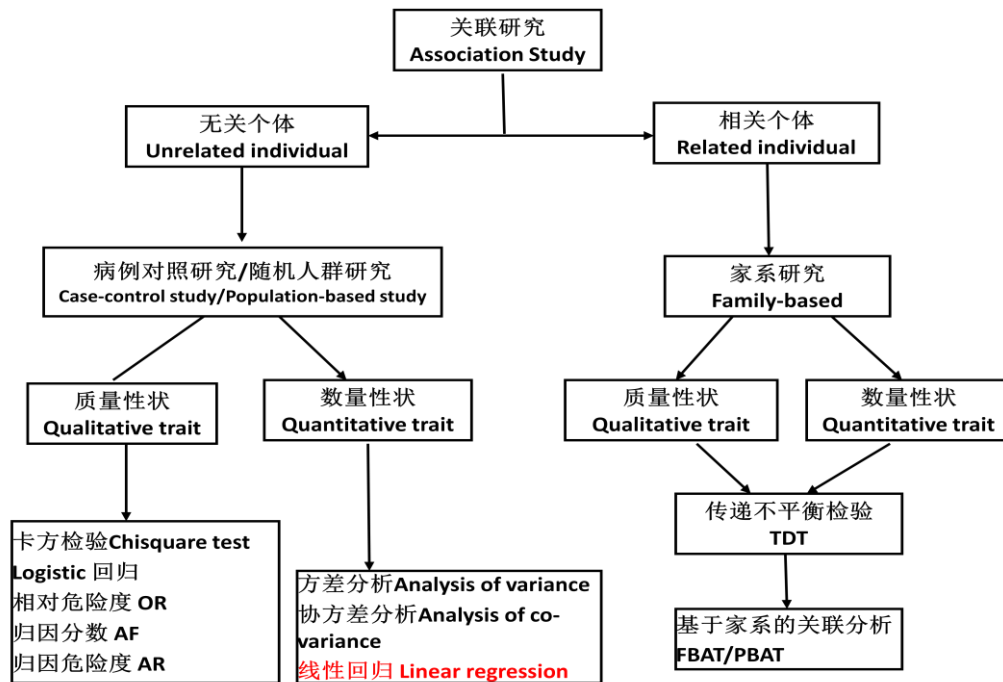
◆ 基础数据分析技术路线



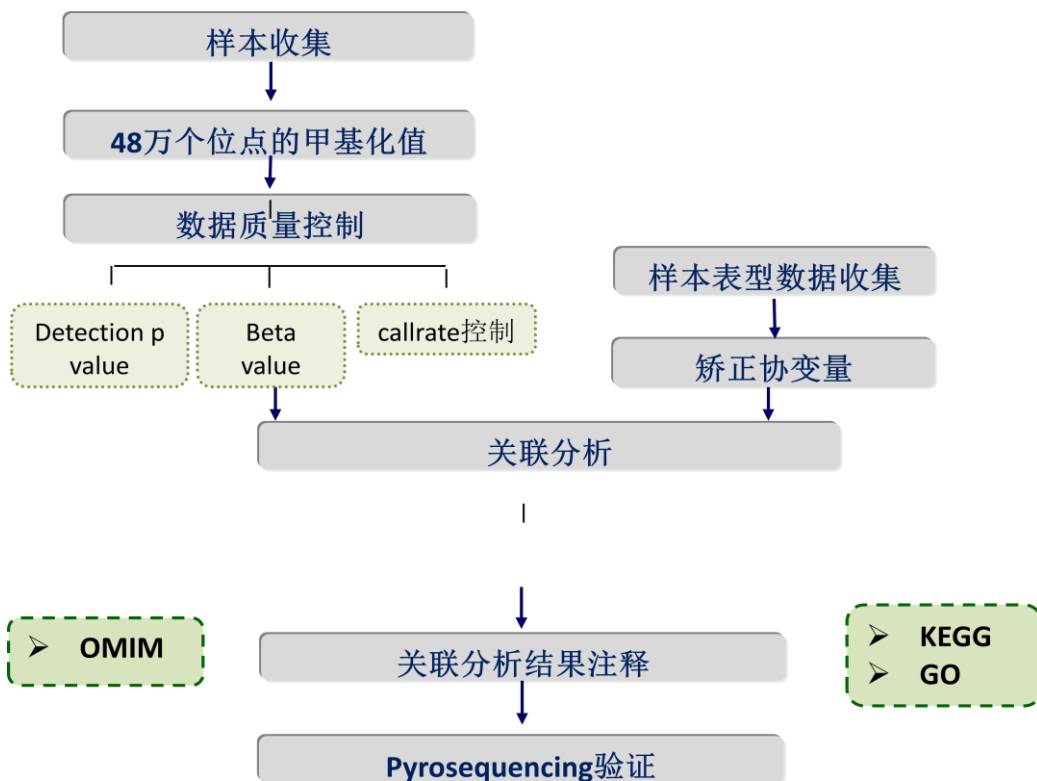
数据分析内容:

基础分析	高级分析
1. 原始数据预处理	1. 特定基因在不同基因区段的甲基化水平
2. 样本的 beta 值密度曲线	2. 甲基化与表达谱的关联分析, 网络图的
3. 数据归一化 (甲基化位点总表, 含注释信息)	3. 差异甲基化基因中邻近启动子区域
4. 差异甲基化位点 (含注释信息)	4. 特定样本的高甲基化和低甲基化位点的
5. 差异甲基化位点的染色体分布	5. 其它高级分析内容。(需要定制)
6. 按基因注释分类得到差异甲基化区域(6 类)	
7. 按 CpG 注释分类得到差异甲基化区域(5 类)	
7. 差异甲基化区域基因统计图表	

◆ EWAS 关联分析的统计方法:



◆ EWAS 关联分析技术路线:



2. 分析步骤

1) 数据的标准化:

◆ 芯片数据的标准化

DNA 甲基化修饰的个体差异很大,且 DNA 甲基化的修饰是 0-100%的比例数值,并不像 SNP 一样只有三种分型,简单而稳定。所以在 EWAS 研究中,实验数据受到的影响因素较多,数据的标准化尤其重要。对于甲基化芯片的数据分析,我们目前采用的是 SWAN 方法进行数据的标准化。SWAN 也是目前比较常用的一种甲基化芯片数据标准化的方法 (Maksimovic, Gordon et al. 2012),同时也是去年“DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis”一文中所用的标准化方法。如果有特别要求的话,我们也可以更换数据的标准化方法(Dick, Nelson et al. 2014)。

此外,样本的杂交排列方式也可以影响实验结果,我们建议采用平均分布 Case 与 control 组的杂交方法。(详见前文所述)

◆ 表型数据的标准化

此外,样本的表型或病理信息的数据分布,一般不是呈正态分布的,所以在计算之前还要把表型数据通过取对数等方法进行标准化,以使其正态化。

2) 数据的过滤

◆ 去除低质量位点 (探针):

与 GWAS 数据分析类似,EWAS 的数据分析过程中也要去除低质量的探针。芯片中以下的探针应该过滤掉后再进行 EWAS 分析: 去除 detection p value>0.05 的探针; 去除在 5%样本中都出现相同的“detection p value>0.05”的探针; 去除位点附近有 SNP 的探针; 去除在“Infinium HD Methylation SNP List”存在着 MAF>1%位点的探针。去除受到不同血细胞的甲基化修饰组成相影响的探针位点。

◆ 去除样本:

去除 PCA 分析(MethylPCA)中偏离度较大的样本(此为 GWAS 方法中常用,在 EWAS 分析中也可以进行相应的分析,根据实验结果确定是否去除偏离过大的样本); 去除 Call Rate<95%的样本。

3) 数据的分析方法:

◆ 相关性分析:

筛选与目的性状皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 较高的位点 (e.g >0.8)

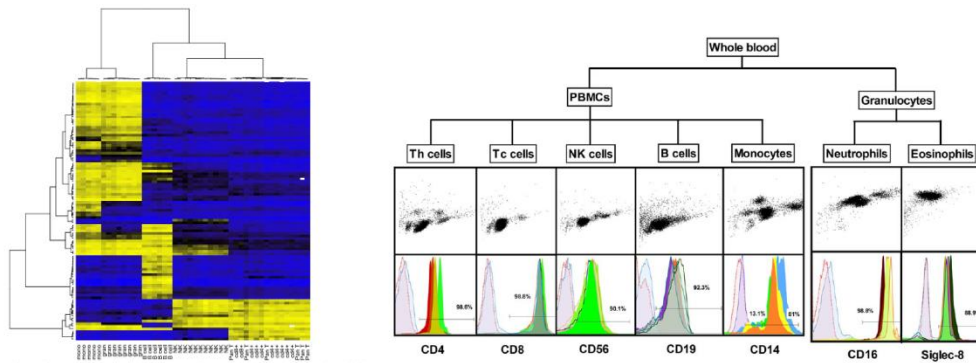
◆ 回归分析:

经过对芯片探针以及样本的数据质控后,过滤掉质量不好的探针以及样本后,对探针的甲基化水平与疾病进行相关性分析。根据 Illumina 甲基化芯片数据特点,并非 SNP 芯片的三种

分型，而是连续的变量，以及复杂的病理因素对甲基化的影响，采用回归分析算出回归系数，并对回归系数进行检验，筛选标准为 FDR q 值 < 0.05 。另可将年龄，性别，芯片分析批次等因素作为协变量加入分析中，此时选择混合模型 (Mixed Models, 例如 GLMM: generalized linear mixed models)。

◆ **对全血样本中不同细胞类型比例的估算：**

在整个 EWAS 项目中，数据的分析受到研究疾病的复杂性、样本异质性的影响，以及大量样本数据的复杂性和生物个体差异带来的影响。特别是全血样本中含有不同类型的血细胞，不同个体以及不同组之间血细胞成分的差异也会对数据分析带来很多假阳性。此时可以用 minfi 软件自带的算法估算样本中不同细胞的比例 (如: granulocytes, monocytes, B cells, CD4+, CD8+ 和 NK cells)。这些细胞组分的数据也可以作为协变量加入分析中，用以校正数据。(Houseman, Accomando et al. 2012; Liu, Aryee et al. 2013)



◆ **对筛选出来的探针 (基因) 进行相应图形绘制**

如 QQ-plot, Manhattan plot.

◆ **方差分析(不同分组):**

如果存在着样本的不同分组，可利用方差分析对不同的实验分组的甲基化位点的数据进行差异分析。

3. 数据的验证

Illumina 甲基化芯片的结果稳定、可靠且重复性高，但得到的数据还是要进行不同平台的验证以及放大样本量的验证。由于 Illumina 甲基化芯片找到的甲基化修饰的差异可能会在 10% 以下，所以需要有一个误差较小的平台进行验证，焦磷酸测序平台就是一个很理想的验证平台。焦磷酸测序平台的误差或重复性可在 5% 以下，且价格便宜，是对单个或多个 CG 位点的甲基化修饰的理想方法。

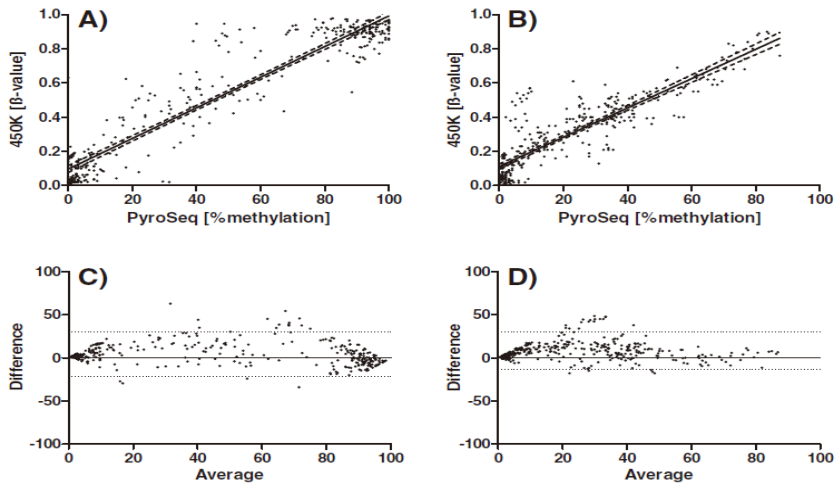


图 2 450K 芯片与焦磷酸测序数据的相关性图。

在本公司的平台中,对 450K 芯片的数据验证中,焦磷酸测序的验证结果展示了很好的一致性,虽然平台间存在着系统的区别,但 450K 芯片中筛选到的差异,在焦磷酸平台中体现出很好的一致性。

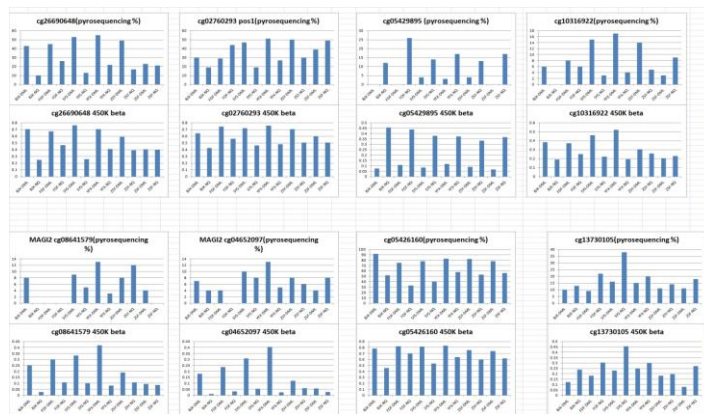


图 3 真实的 450K 芯片数据的焦磷酸验证结果。

4. 分析结果展示

1) EWAS 分析结果:

◆ 火山图展示对血细胞的不同组成对相关位点的过滤

不同个体间的血细胞组成会有差异,不同的分组间的血细胞组成也可能会有差异,而不同的细胞的甲基化谱也会有差异。通过对不同细胞类型的甲基化谱以及不同样本的细胞成分进行校正后,能够有效地减少由于血细胞组成不同而出现的关联位点。(Houseman, Accomando et al. 2012; Liu, Aryee et al. 2013)

	Estimated Proportion (% of Leucocytes)			Observed Proportion From FACS (% of Leucocytes)		
	Control	Case	Diff	Control	Case	Diff
T cells	26.67	18.33	-8.33	23.60	17.01	-6.59
NK cells	3.18	0.76	-2.42	4.40	2.47	-1.93
B cells	5.27	4.16	-1.11	3.34	2.21	-1.13
Monocytes	10.40	12.01	1.61	7.10	6.79	-0.31
Granulocytes	53.86	64.61	10.75	58.15	69.00	10.85

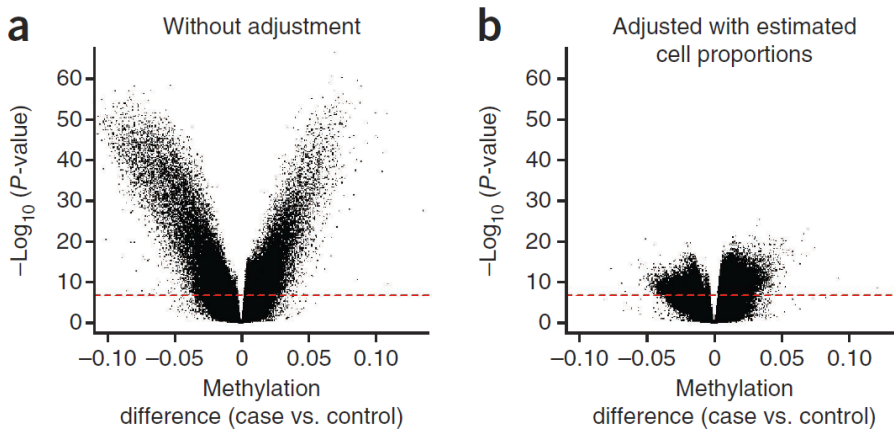


图 4 经过不同血细胞组成的甲基化修饰水平校正后, 关联的探针数目显著地减少。

◆ 对不同因素分析的 QQ-plot

对于疾病因素或加上年龄、性别等协变量因素进行关联分析, 得到对于不同因素的 QQ-plot。

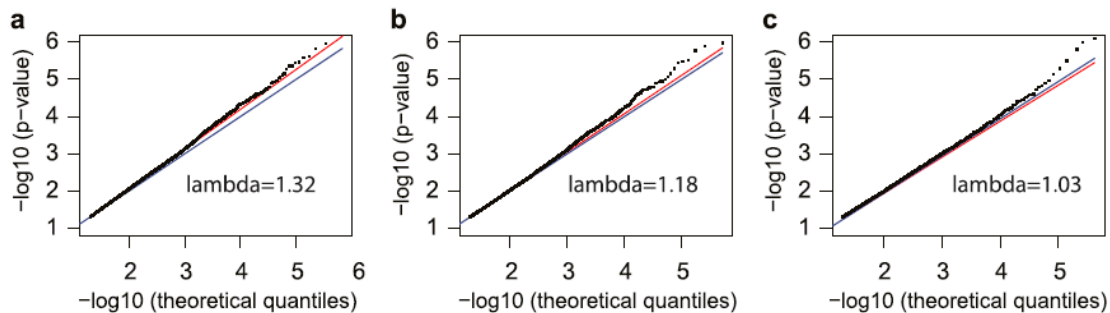


图 5 QQ-plot, 展示在不同因素下, 研究的 CpG 位点的甲基化修饰与疾病的关联紧密度。通过对所有位点的 P 值的观测值与期待值进行排序后的展示,

◆ Manhattan plot

对于所有位点的 P 值取对数后绘制 Manhattan plot, 横坐标是每个探针的染色体的位置, 纵坐标是每个探针的 p 值取以 10 为底的对数后的相反数。与普通的 GWAS 类似, 关联性很强的位点可能会出现在 MHC 区域处, 在后续的分析中, 可以把 MHC 区域内的位点单独进行分析。

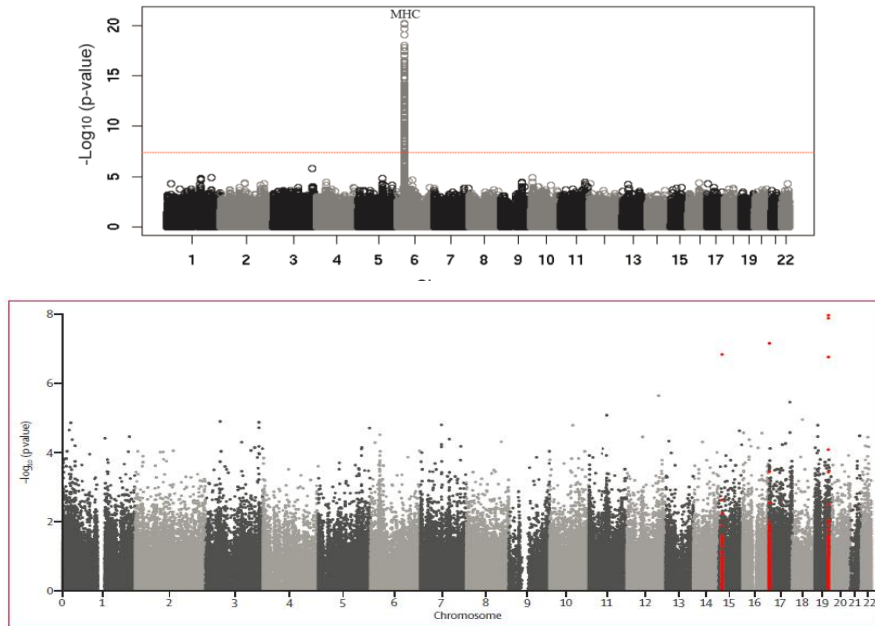


图 6 Manhattan plot 图，可以用来观测各个染色体中显著差异甲基化探针的数据分布。基因组坐标沿 X-轴显示，显示在 Y-轴为每个基因甲基化水平的关联 P-值的负对数。

◆ 散点图

对于连续的表型变量，可以通过散点图展示筛选得到的位点的甲基化水平及其与病理表型的关联程度。同时，如果有位点对应基因的表达水平的话，也可以将此位点的甲基化水平与表达水平结合起来绘制散点图。

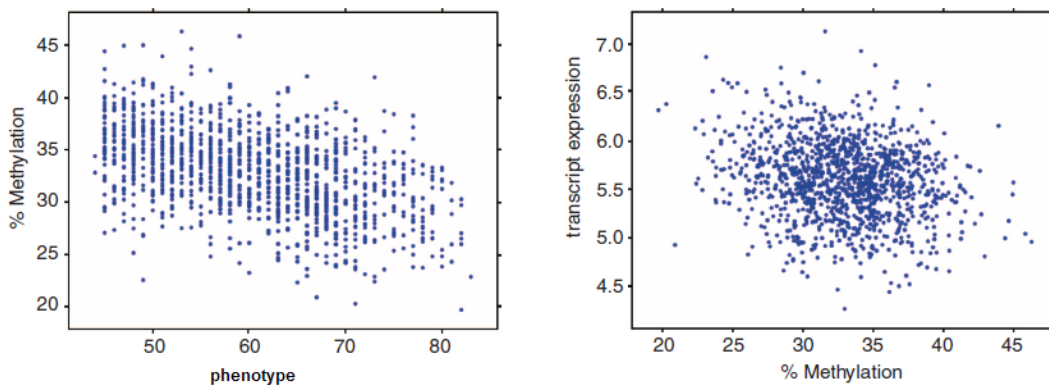


图 7 利用散点图展示筛选得到的位点与表型的相关性，也可加入目的位点的甲基化修饰程度与基因的表达的散点图。

◆ 箱线图

如果病理表型不是连续变量，可以通过箱线图展示位点的甲基化水平与表型的关联程度。

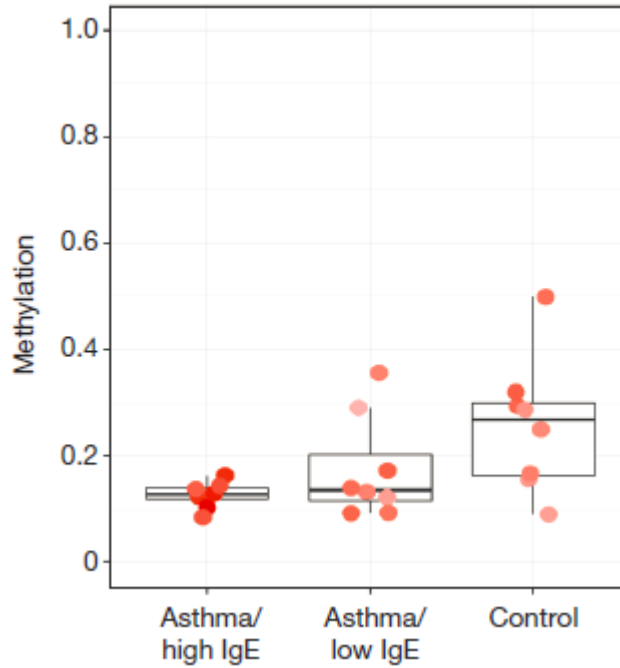


图 8 通过箱线图展示位置的甲基化修饰水平与病理表型间的相关性。

2) 基础分析结果:

以上的结果为 EWAS 分析的主要结果。

此外，对于一般的 Illumina 甲基化芯片的数据分析，还有以下的结果：

◆ 样本的 beta 值密度曲线图

每一个样本的未甲基化的密度峰值小于 0.2，甲基化的密度峰值大于 0.8。每个样本的只有两个密度峰值(未甲基化的密度峰值，甲基化的密度峰值)。样本的 Beta 值密度曲线趋于一致。

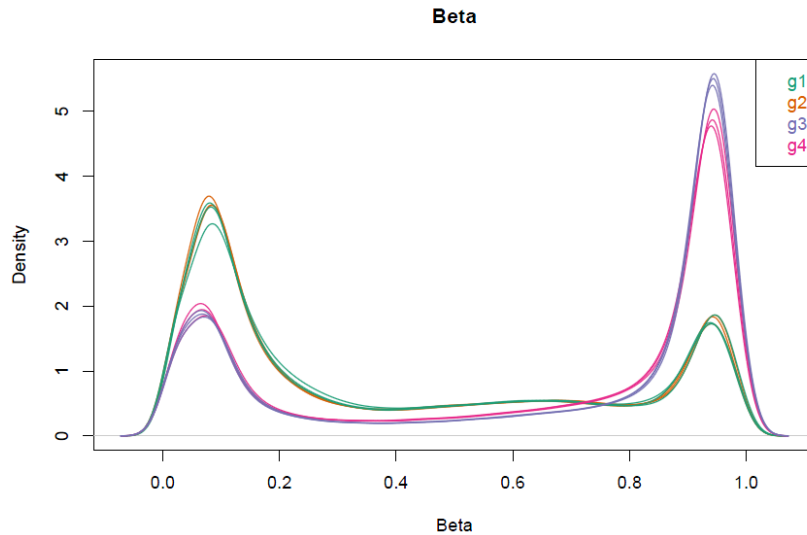


图 9 样本的 beta 值密度曲线图，展示每个样本 beta 值密度曲线，以判断样本间是否出现了整体的甲基化修饰差异。

◆ 样本的聚类图

聚类分析后相似的样本出现在同一个簇（cluster）中，聚在同一个簇的基因可能具有类似的生物学功能。通过聚类分析可以证实样本分组是否符合实验设计需求。

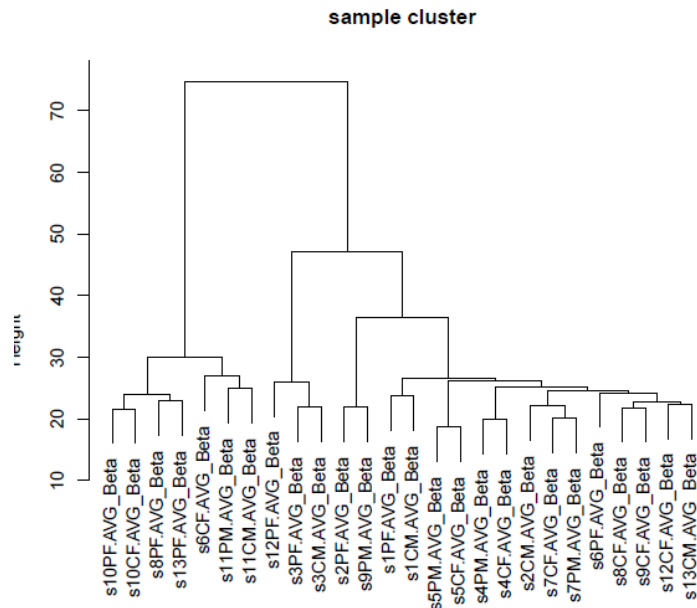


图 10 样本聚类图，对样本的甲基化修饰信号采取非监督聚类，根据样本与样本间的相似度，将甲基化谱相近的样本聚在一起。

◆ MDS 图

MDS 图是采用多维尺度分析（MultiDimensional Scaling）统计方法计算样本

之间的距离的多维空间图，图中的点（对象）的距离反应了它们的相似性或差异性（不相似性）。

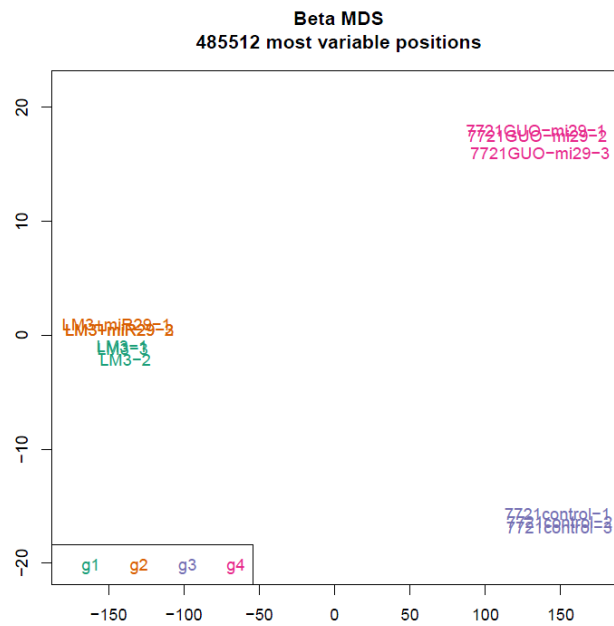


图 11 MDS 图，类似于 PCA 图，在二维平面中将类似的样本放在相近的位置。帮助了解实验设计中的分组情况。

◆ 差异的甲基化位点在染色体分布图

为了挖掘高甲基化或低甲基化的基因是否有染色体的偏向性或成簇分布的特点将样本分组间差异甲基化位点定位在染色体上。其中红色代表实验组(g1)高甲基化位点，绿色代表实验组 (g1) 低甲基化基因位点，灰色表示甲基化位点在组间没有变化。

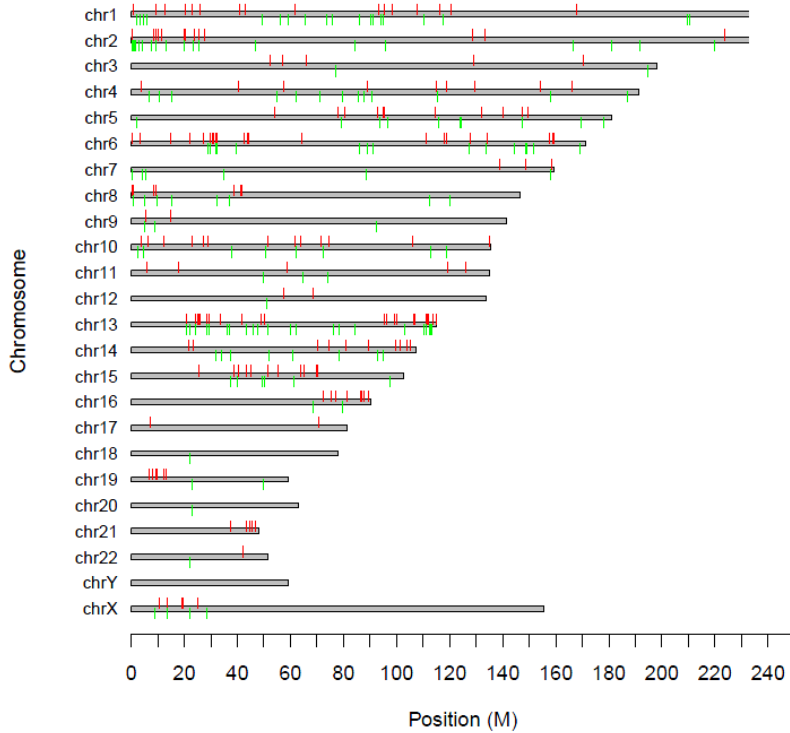


图 12 显著性差异的甲基化位点在全基因组中的展示

◆ 差异的甲基化位点的圈图展示 (Circos plot)

用圈图展示高甲基化与低甲基化的位点 (基因) 在所有染色体上的分布。

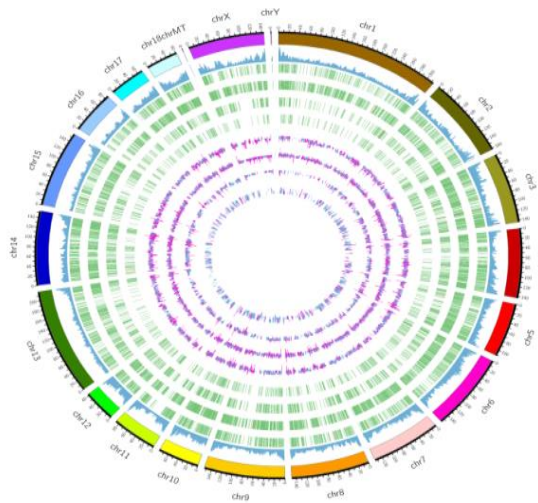


图 13 全基因组甲基化水平。以 1K 的窗口得出基因组的覆盖情况，标示基因组的甲基化水平。图中最外圈为基因组，里面每一个圈标示样本基因组甲基化水平。

◆ 差异的甲基化位点（基因）的热图展示

类似于表达谱芯片的热图，将高甲基化的位点用红色表示，低甲基化的位点用绿色表示，在一张图上展示所有差异甲基化修饰位点在不同样本间的分布。

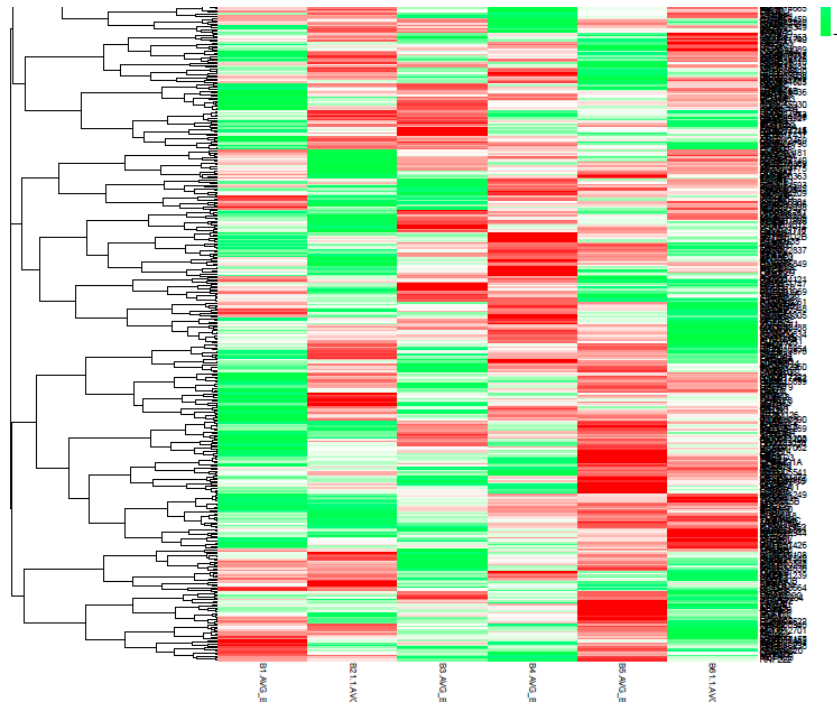


图 14 显著差异的 CpG 甲基化位点在样本间的热图展示。

3) 不同层面间的整合分析

当 DNA 甲基化数据同时还配有其他层面，如转录水平的研究数据时，可以把筛选出差异表达基因、差异 miRNA、差异甲基化区域，对这些差异基因进行整合分析（染色体定位，代谢通路，蛋白质互作网络）等。

◆ 整体展示——圈图展示 (Circos plot)

从整体以圈图，从整体上展示全基因组水平上的甲基化水平及基因表达差异。

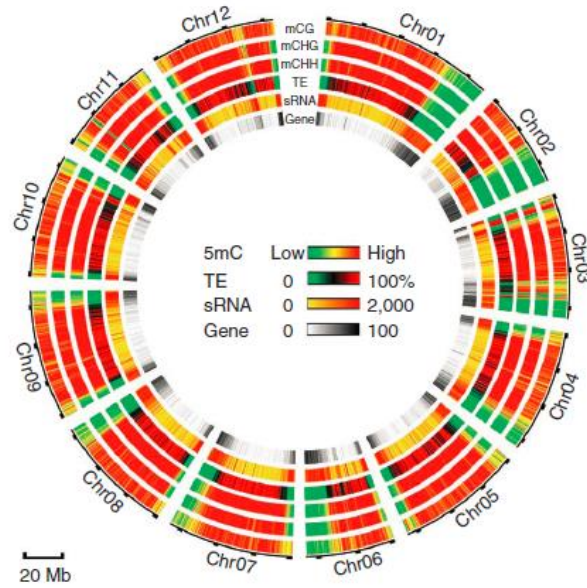


图 15 全基因组水平上展示甲基化修饰、miRNA 以及基因表达水平（圈图展示）。

◆ 整体展示——散点图展示

在二维的平面坐标系中，通过基因的表达以及基因启动子区的甲基化的关联对，以每个点代表一个基因，X 轴与 Y 轴分别代表基因的表达以及基因的甲基化水平。展示甲基化是否对基因的表达起到负调控作用。

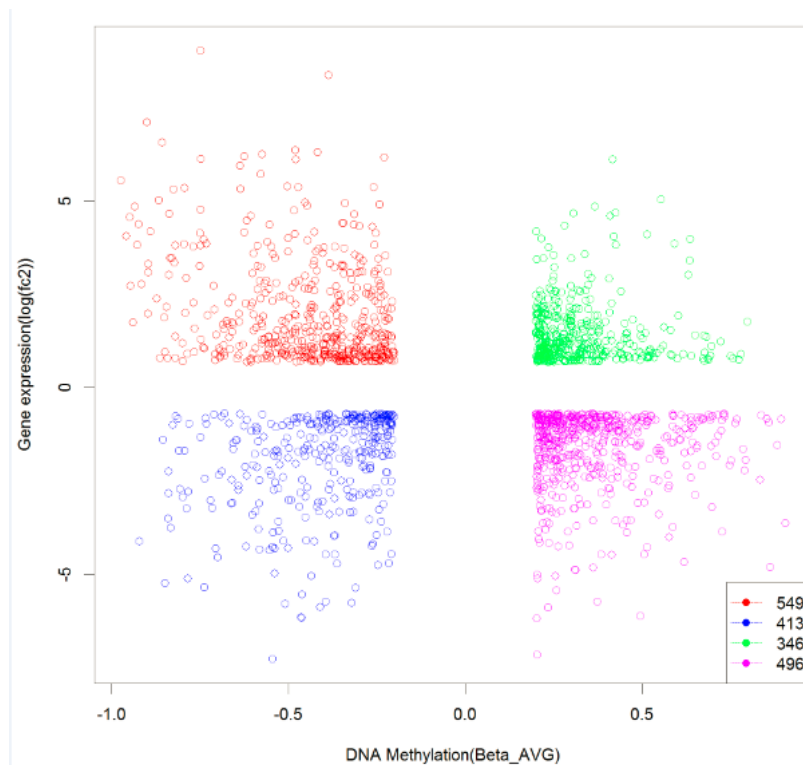


图 16 全基因组水平上展示甲基化修饰、miRNA 以及基因表达水平（散点图展示）。

◆ 整体展示——热图展示

在对甲基化修饰以及基因表达可分别以热图展示, 或将不同水平的变化放在同一张图中展示。

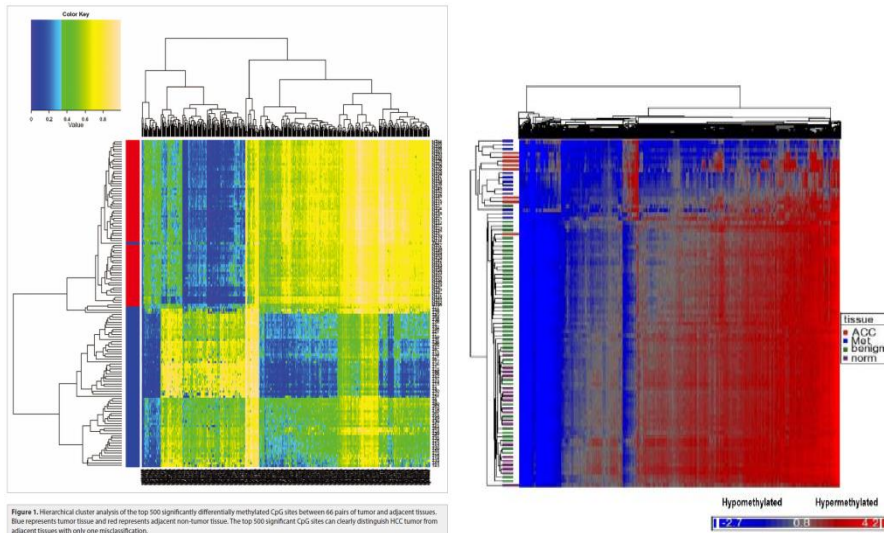


图 17 热图展示全基因组水平上展示甲基化修饰、miRNA 或基因表达水平差异。

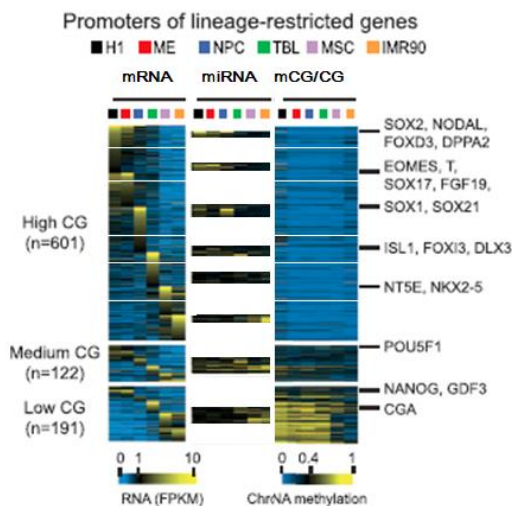


图 18 同一个热图中展示甲基化修饰、miRNA 或基因表达水平差异。

◆ 网络图展示

A. mRNA, miRNA 转录组与甲基化整合分析

将基因的互作网络与甲基化修饰以及基因表达水平的改变综合绘制网络图。用三角形箭头的方向表示甲基化水平的高低; 用红色表示基因的上调, 绿色表示基因的下调; 连线表示基因的互作网络。

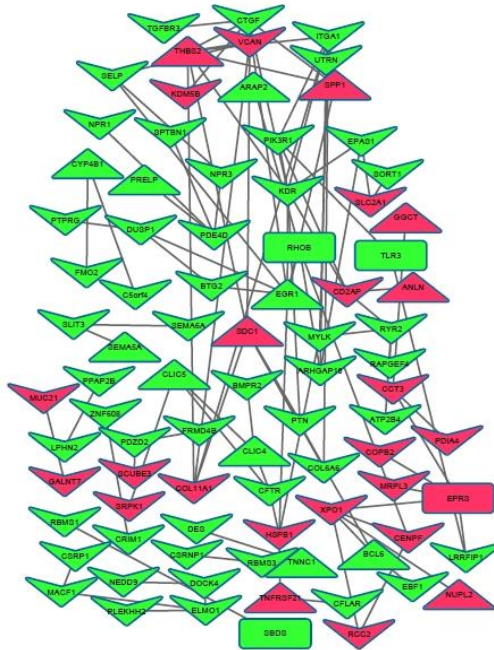


图 19 基因互作网络图展示差异的甲基化修饰、基因表达, 以及基因的相互作用。

◆ mRNA, miRNA 转录组与甲基化整合分析

将 mRNA, lncRNA, circRNA 以及 miRNA 表达, 与基因的启动子区 DNA 甲基化修饰多个层面结合分析, 并绘制网络图, 如下所示: 节点的形状代表上下调: 三角形: 上调; 下箭头: 下调; 节点的颜色代表该基因同甲基化数据之间的相关程度: 绿: 负相关; 红: 正相关; 黄: 不相关。见 color_bar; 节点的面积代表在该网络中这个节点与其他节点之间的作用力度。可以根据客户要求调节。

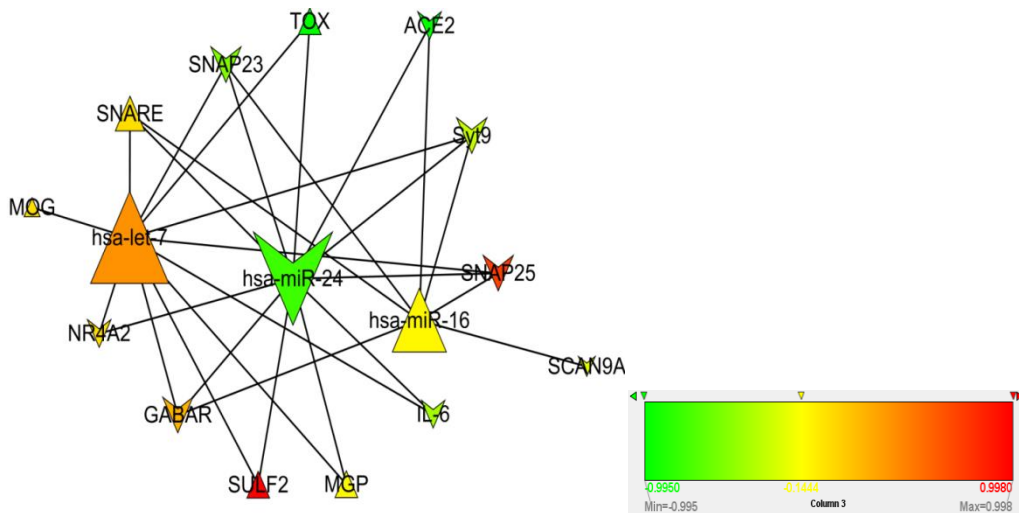


图 20 基因互作网络图展示差异的甲基化修饰、miRNA 及基因表达及互作。

◆ 对于关键少数基因的表达水平、甲基化修饰或基因组水平变异的展示

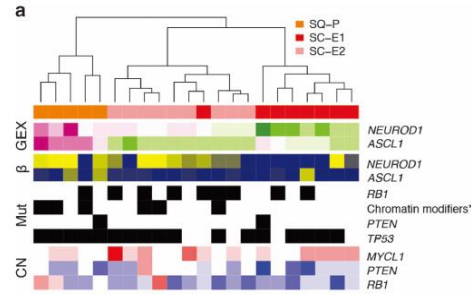


图 21 对于最近筛选出来的关键基因，可以在基因的表达结果、甲基化差异基础上，结果序列变异及拷贝数变异以热图、聚类图进行多层次展示。

四、上海伯豪生物介绍

上海伯豪生物技术有限公司（以下简称“伯豪生物”）2008年12月成立，是一家以科技服务、疾病与健康检测服务、分子检测产品的开发和生产为主营业务的高新技术企业。伯豪生物成立之初依托于上海生物芯片有限公司/生物芯片上海国家工程研究中心，建立了生物芯片、基因测序、生物标志物筛选和验证、分子检测、生物样本分析和生物信息技术平台。公司于2011年12月6日获得高新技术企业认定（2014年通过复审）；2012年3月获批浦东新区企业研发机构。2015年9月，公司完成B轮融资，携手东富龙（证券代码:300171）直击精准医疗领域，共同开启“精准医疗、精准检测、精准服务”新格局。

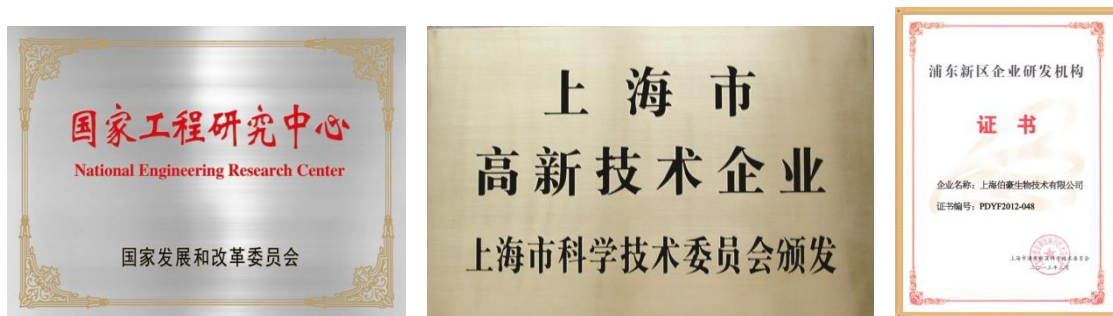


图 1. 国家工程研究中心 / 高新技术企业 / 浦东新区企业研发机构 证书

多年来，伯豪生物凭借高标准的技术平台和多样化的服务等竞争优势，向国内外企业和科研单位提供系统的生物学研究全面解决方案。目前正在向 20 余家跨国制药企业（包括排名前 10 位的跨国制药企业）和超过 5000 家的国内科研机构、医院等，提供基因表达谱、基因分型、比较基因组学、DNA 甲基化、miRNA、生物标志物筛选、生物信息等技术服务。

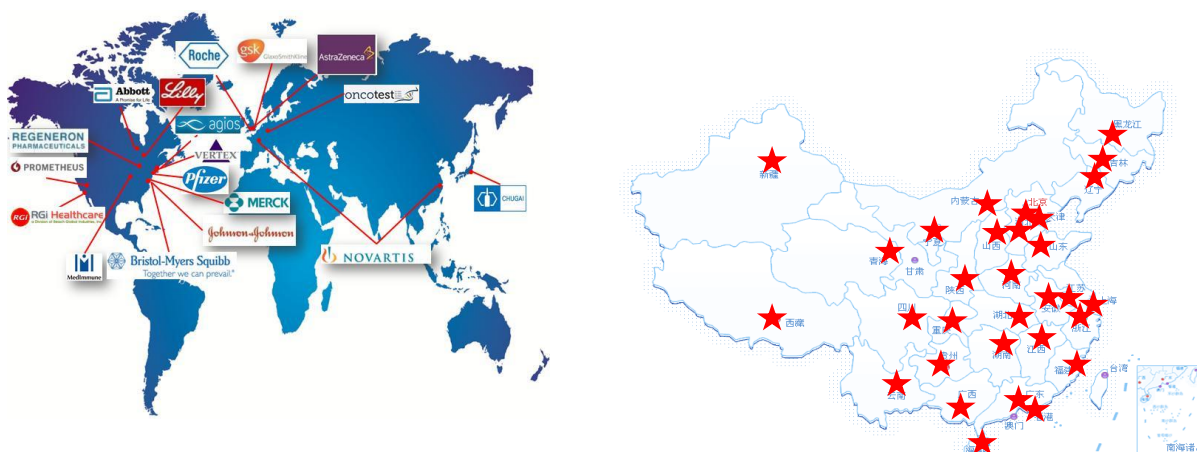


图 2：国际客户分布图

公司拥有一支以上海为基础，辐射全国的强大市场营销队伍和销售网络，已设立华北、华南、华东三个大区十五个办事处，推广公司的主导技术服务、科研产品，快速提升公司品牌的知名度，扩大影响力。多年来，完成各类研发服务项目超过万项，

协助用户发表 SCI 论文 800 余篇，影响因子总计超过 3500 分，全面推动了中国基因组学服务产业的发展。

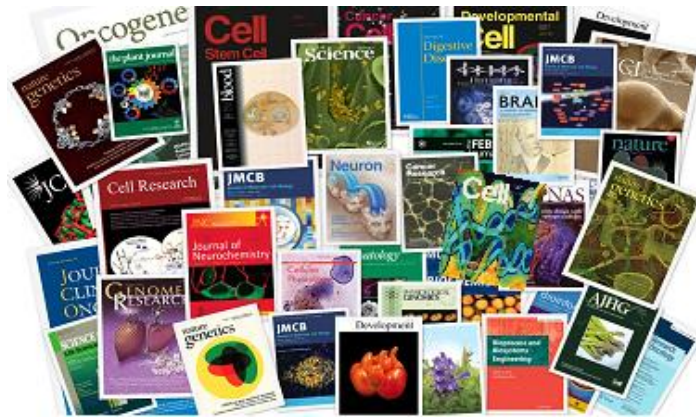


图 4：部分利用公司服务发表 SCI 论文封面展示

公司的系统化技术平台和高品质的服务体系得到了广大客户青睐和合作伙伴的度评价和认可。公司通过了 ISO 9001:2008 质量体系认证，采用 SOP 规范操作文件来控制样本品质、检测品质和数据结果品质，目前已建立了 SOP 管理文件 128 个。公司于 2012 年获得诺华优秀服务供应商奖，公司是 Affymetrix 公司在中国第一家认证的服务提供商，Agilent 公司在中国的第一家认证的技术服务供应商，是 Illumina NGS 认证服务供应商，并先后被授予“Agilent 公司亚太区最佳服务供应商”、“Affymetrix 公司优秀服务商”称号。2014 年，公司高通量技术服务品牌“eBioService[®]”获“上海名牌明日之星”荣誉称号。

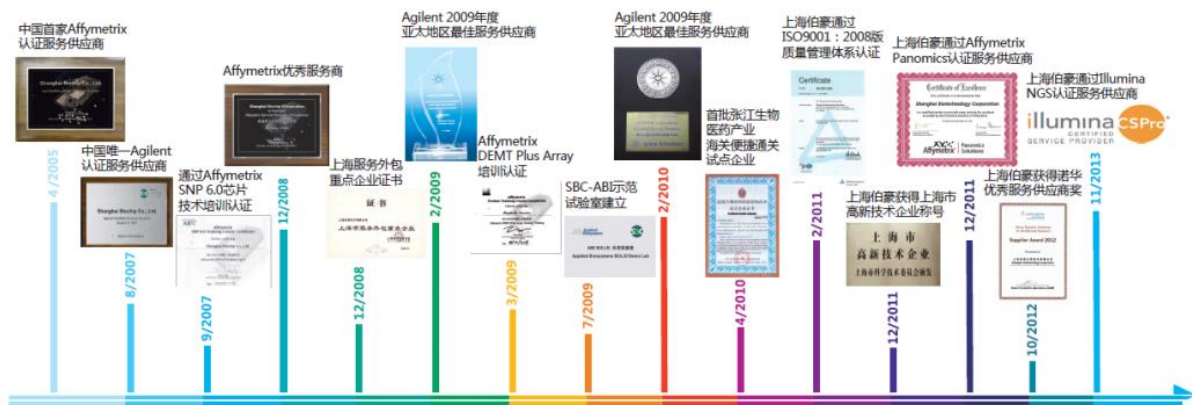


图 5：公司各类认证展示

伯豪生物目前还在着力加大在临床检测、产品研发、医疗器械经营销售等方面的投入力度。控参股公司—上海伯豪医学检验所有限公司，上海伯豪医药生物技术有限公司分别拥有医疗机构执业许可证和医疗器械经营许可证，专业从事分子医学临床检

测服务和医疗器械销售经营业务。



图 6：伯豪医学检验所医疗机构执业许可证



图 7：伯豪医药医疗器械经营许可证

伯豪生物将持之以恒地利用高端的现代化仪器设备、多项成熟完善的技术平台、高素质的技术团队、国际水平的商业化服务流程、积极进取的经营理念，为广大客户提供持续稳定、高效和高质量的技术支持和服务。

长按二维码，关注伯豪生物



微信号：SBC51320288



技术服务热线：800-820-5086

地址：上海市张江园区李冰路 151 号

电话：021-51320288

网址：www.shanghaibiotech.com

邮箱：market@shbiochip.com

Reference

- Buhule, O. D., R. L. Minster, et al. (2014). "Stratified randomization controls better for batch effects in 450K methylation analysis: a cautionary tale." *Front Genet* **5**: 354.
- Byrne, E. M., T. Carrillo-Roa, et al. (2013). "Monozygotic twins affected with major depressive disorder have greater variance in methylation than their unaffected co-twin." *Transl Psychiatry* **3**: e269.
- Clark, C., P. Palta, et al. (2012). "A comparison of the whole genome approach of MeDIP-seq to the targeted approach of the Infinium HumanMethylation450 BeadChip((R)) for methylome profiling." *PLoS One* **7**(11): e50233.
- Dempster, E. L., C. C. Wong, et al. (2014). "Genome-wide methylomic analysis of monozygotic twins discordant for adolescent depression." *Biol Psychiatry* **76**(12): 977-83.
- Dick, K. J., C. P. Nelson, et al. (2014). "DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis." *Lancet* **383**(9933): 1990-8.
- Fortin, J. P., A. Labbe, et al. (2014). "Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies." *Genome Biol* **15**(12): 503.
- Houseman, E. A., W. P. Accomando, et al. (2012). "DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution." *BMC Bioinformatics* **13**: 86.
- Laird, P. W. (2010). "Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis." *Nat Rev Genet* **11**(3): 191-203.
- Lemire, M., S. H. Zaidi, et al. (2015). "Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci." *Nat Commun* **6**: 6326.
- Li, Y., J. Zhu, et al. (2010). "The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells." *PLoS Biol* **8**(11): e1000533.
- Liu, Y., M. J. Aryee, et al. (2013). "Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis." *Nat Biotechnol* **31**(2): 142-7.
- Maksimovic, J., L. Gordon, et al. (2012). "SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips." *Genome Biol* **13**(6): R44.
- Nair, S. S., M. W. Coolen, et al. (2011). "Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias." *Epigenetics* **6**(1): 34-44.
- Nilsson, E., P. A. Jansson, et al. (2014). "Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes." *Diabetes* **63**(9): 2962-76.
- Roessler, J., O. Ammerpohl, et al. (2012). "Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc." *BMC Res Notes* **5**: 210.
- Sun, Z., H. S. Chai, et al. (2011). "Batch effect correction for genome-wide methylation data with Illumina Infinium platform." *BMC Med Genomics* **4**: 84.
- Tan, Q., M. Frost, et al. (2014). "Epigenetic signature of birth weight discordance in adult twins." *BMC Genomics* **15**: 1062.



伯豪生物 SHBIO

地址: 上海张江高科技园区李冰路 151 号 (201203)

技术服务热线: 800-820-5086 / 400-880-5086

技术服务网站: <http://www.ebioservice.com>

技术支持邮箱: customersupport@shbiochip.com Buhule, O. D., R. L. Minster, et al. (2014). "Stratified randomization controls better for batch effects in 450K methylation analysis: a cautionary tale." *Front Genet* **5**: 354.

Byrne, E. M., T. Carrillo-Roa, et al. (2013). "Monozygotic twins affected with major depressive disorder have greater variance in methylation than their unaffected co-twin." *Transl Psychiatry* **3**: e269.

Castillo-Fernandez, J. E., T. D. Spector, et al. (2014). "Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease." *Genome Med* **6**(7): 60.

Clark, C., P. Palta, et al. (2012). "A comparison of the whole genome approach of MeDIP-seq to the targeted approach of the Infinium HumanMethylation450 BeadChip((R)) for

- methylome profiling." *PLoS One* **7**(11): e50233.
- Dempster, E. L., C. C. Wong, et al. (2014). "Genome-wide methylomic analysis of monozygotic twins discordant for adolescent depression." *Biol Psychiatry* **76**(12): 977-83.
- Dick, K. J., C. P. Nelson, et al. (2014). "DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis." *Lancet* **383**(9933): 1990-8.
- Fortin, J. P., A. Labbe, et al. (2014). "Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies." *Genome Biol* **15**(12): 503.
- Houseman, E. A., W. P. Accomando, et al. (2012). "DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution." *BMC Bioinformatics* **13**: 86.
- Laird, P. W. (2010). "Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis." *Nat Rev Genet* **11**(3): 191-203.
- Lemire, M., S. H. Zaidi, et al. (2015). "Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci." *Nat Commun* **6**: 6326.
- Li, Y., J. Zhu, et al. (2010). "The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells." *PLoS Biol* **8**(11): e1000533.
- Liu, Y., M. J. Aryee, et al. (2013). "Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis." *Nat Biotechnol* **31**(2): 142-7.
- Maksimovic, J., L. Gordon, et al. (2012). "SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips." *Genome Biol* **13**(6): R44.
- Nair, S. S., M. W. Coolen, et al. (2011). "Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias." *Epigenetics* **6**(1): 34-44.
- Nilsson, E., P. A. Jansson, et al. (2014). "Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes." *Diabetes* **63**(9): 2962-76.
- Roessler, J., O. Ammerpohl, et al. (2012). "Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc." *BMC Res Notes* **5**: 210.
- Sun, Z., H. S. Chai, et al. (2011). "Batch effect correction for genome-wide methylation data with Illumina Infinium platform." *BMC Med Genomics* **4**: 84.
- Tan, Q., M. Frost, et al. (2014). "Epigenetic signature of birth weight discordance in adult twins." *BMC Genomics* **15**: 1062.