

P16(INK4A), P18(INK4C) 和 RB1 基因失活与基因甲基化的关系,发现肝硬化组织以单基因甲基化为主,而癌组织甲基化涉及基因则 ≥ 3 个。免疫组化证实,癌组织中 P15、P16 基因甲基化伴随相应蛋白表达完全缺失,而在肝硬化组织中仅部分相应蛋白失表达。由此推断从肝硬化到肝癌,基因的甲基化起了很重要的作用。Ishida 等^[8]也报道了 P14^{ARF}在口腔鳞癌中的甲基化现象,其甲基化比率为 20.4%,并且与淋巴结转移有很大关系,提示其在口腔鳞癌的发生中其重要作用。Watanabe 等^[9]研究膀胱癌发现 P14 甲基化在侵袭性膀胱癌和表浅型膀胱癌中的表达有统计学差异,侵袭性膀胱癌甲基化阳性率明显高于表浅型膀胱癌。值得一提的是本研究发现 P14^{ARF}启动子的甲基化程度和蛋白表达呈显著负相关,说明在甲状腺乳头状癌发生中该基因的甲基化其重要作用,但是我们也检测到部分甲基化阳性的病例中也检测到了非甲基化产物的扩增,一种可能是两个等位基因半甲基化状态,一种可能是癌组织混杂了非甲基化的炎症细胞。有报道称只有 CpG 岛甲基化达到 60% 才足以完全抑制基因的表达。

综上所述,我们研究了 P14^{ARF}启动子的甲基化和 P14^{ARF}在甲状腺乳头状癌中 mRNA 和蛋白的表达情况,探讨其在甲状腺乳头状癌发生发展中的作用机制。甲状腺癌表观遗传学研究在国内外报道相对其他恶性肿瘤的研究较少,在这方面进行更为深入的探讨,为甲状腺肿瘤的预防、术前诊断与鉴别诊断、基因靶向治疗及预后的评判提供先进、准确的指标和方法。DNA 甲基化在甲状腺肿瘤的诊疗中至少可在两方面得到应用:作为临床诊断、病程监控的分子标志

物;逆转基因甲基化作为肿瘤治疗的新方向。人们通过对 DNA 甲基化的抑制来阻止肿瘤的发生;在临床试验中,采用胞嘧啶类似物来治疗癌前病变,利用甲基化转移酶的反义寡核苷酸来减少癌的发生,人们利用表遗传失活基因的再激活来治疗肿瘤。

参考文献

- 1 Nix P, Nicolaides A, Coatesworth AP. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer [J]. *Int J Clin Pract*, 2005, 59 (11): 1340 - 1344
- 2 Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, *et al.* Alternative reading frame of the INK4a tumor suppressor gene encodes two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest [J]. *Cell*, 1995, 83 (6): 993 - 1000
- 3 Xing EP, Nie Y, Song Y, *et al.* Mechanisms of inactivation of P14, P15 and P16 gene in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5 (10): 2704 - 2713
- 4 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349 (21): 2042 - 2054
- 5 Uehijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5 (3): 223 - 231
- 6 乔建兵. 胶质瘤中 p14ARF 甲基化分析及其与 p53 表达的相关性研究 [J]. *肿瘤*, 2010, 30 (5): 410 - 413
- 7 Tannapfel A, Busse C, Weinans L, *et al.* INK4a—ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (48): 7104 - 7109
- 8 Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, *et al.* Promoter hypermethylation of p14 is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2005, 41 (6): 614 - 622
- 9 Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, *et al.* Aberrant hypermethylation of P14ARF and O6-methylguanine DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression [J]. *Brain Pathol*, 2007, 17 (1): 5 - 10

(收稿: 2012-05-22)

(修回: 2012-06-18)

甲基化转移酶 Suv39h1 基因慢病毒表达载体构建及鉴定

张帆 卢韬 孙荷 吕娟 杨明峰 董学君

摘要 目的 构建小鼠 H3K9 甲基转移酶 Suv39h1 基因慢病毒表达载体。**方法** 设计并合成带有 KpnI 和 XmaI 酶切位点的引物,以携带 Suv39h1 cDNA 的 PCMV-SPORT6 载体为模板扩增目的基因,将其与 Lenti-eGFP-Neo 载体双酶切, T4 连接酶

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2090337)

作者单位:325035 温州医学院检验医学院、生命科学学院(张帆、卢韬、董学君);312000 浙江省绍兴市人民医院(孙荷、吕娟、杨明峰、董学君)

通讯作者:董学君,电子邮箱:dxj9666@163.com

连接,构建成 pLenti-eGFP-Suv39h1 重组载体,转化感受态细胞 DH5 α ,PCR 筛选阳性克隆质粒,酶切与测序鉴定正确后,将慢病毒四质粒系统共转染 293T 细胞,包装及效价测定。以感染复数(MOI 值)为 10 和 30 的慢病毒颗粒感染 293T 细胞,RT-PCR 检测 Suv39h1 mRNA 表达。**结果** PCR、酶切及测序结果均显示目的片段插入正确,四质粒共转染 293T 细胞后,镜下可见 95% 的细胞表达绿色荧光;效价测定为 2.11×10^8 TU/ml;RT-PCR 检测显示,MOI 值为 30 的 Suv39h1 表达量是 MOI 值为 10 的 3 倍,两者均可在 293T 细胞中均匀稳定表达。**结论** 成功构建 Suv39h1 基因慢病毒表达载体,为后续 Suv39h1 基因功能研究奠定了基础。

关键词 Suv39h1 组蛋白甲基转移酶 慢病毒载体

Construction and Verification of Lentiviral Vector Targeting Suv39h1 Gene. Zhang Fan, Lu Tao, Sun He, et al. School of Laboratory Medicine and Life Science of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To construct the lentiviral vector recombined mouse H3K9 histone methyltransferase Suv39h1 gene. **Methods** PCR was performed to amplify the mouse Suv39h1 gene based on the PCMV-SPORT6 vector recombined Suv39h1, with the KpnI and XmaI restriction sites primer. The product for amplification was cloned into lentiviral vector pLenti-eGFP-Neo by KpnI and XmaI digestion and T4 ligase ligation. After transforming into competent E. coli cells, the candidate clones were identified by PCR and then were identified according to the results of Suv39h1 PCR, recombined into pLenti-eGFP-Suv39h1 cleaved by restriction enzyme and DNA sequences. The recombined vector was co-transfected into the 293T cells with four-plasmid system, package lentivirus particles, then and the viral titer was determined. Subsequently, the 293T cells were transfected by lentivirus with the values of multiplicity of infection (MOI) 10 and 30 separately, and the expression of Suv39h1 gene was detected by RT-PCR. **Results** Results of the PCR, restricting enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated that four-plasmid system successfully were transfected into 293T cells in which 95% expressed enhanced green fluorescent protein (eGFP), and the functional titer of lentivirus particles was 2.11×10^8 TU/ml. RT-PCR identified Suv39h1 gene expression with MOI 30 as three times as MOI 10 which both could be stably expressed in 293T cells. **Conclusion** Lentivirus expressing Suv39h1 was successfully constructed, which facilitates further investigation of the roles Suv39h1 gene.

Key words Suv39h1 gene; Histone methyltransferase; Lentiviral vector

Suv39h1 (suppressor of variegation 3~9 homolog 1) 是第一个被发现的组蛋白赖氨酸甲基转移酶,主要参与 H3K9 三甲基化(H3K9m₃)。近年的研究发现, Suv39h1 基因表达与体细胞分化密切相关,随分化成熟其表达量逐渐下降^[1-3]。我们在骨髓间充质干细胞(MSC)定向分化肝细胞的研究显示,随肝细胞的分化, Suv39h1 表达也呈下调趋势,由此推测其可能是调节肝细胞分化的重要基因,但这方面的研究未见报道;为证明该现象,本研究拟通过增加 MCS 中 Suv39h1 的表达,观察对肝细胞分化是否具有逆向作用。在各种表达载体中,慢病毒表达载体具有高效整合、高效转录、高效表达及能转染非分裂期细胞和分裂期细胞的特点,是真核细胞基因转染的理想载体^[4-7]。为此,本研究首先构建 Suv39h1 慢病毒表达载体,验证其功能,旨在为后续 MCS 分化肝细胞的研究奠定基础。

材料与方法

1. 材料:慢病毒载体四质粒系统 pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 及 pLenti-eGFP-Neo 购自 Tronolab 公司。293T 包装细胞系、大肠杆菌菌株 DH5 α 均购自中科院上海细胞生物研究所。RPMI1640、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自 Gibco 公司。含小鼠全长 Suv39h1 cDNA 的 PCMV-SPORT6 载体购自 Open Biosystem 公司。限制性内切酶 XmaI 和 KpnI、T4 DNA 连接酶及 1000bp/100bp DNA ladder

购自 NEB 公司。质粒小量抽提试剂盒购自 Axygen 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。PCR、RT-PCR 试剂及所需引物盒均购自上海生工生物工程公司。阳性克隆测序为上海比昂生物医药有限公司。

2. 方法:(1)引物设计与合成:根据 GenBank 的小鼠 Suv39h1 mRNA 序列及慢病毒表达载体 pLenti-GFP-Neo 的 KpnI 和 XmaI 双酶切位点要求,设计 Suv39h1 基因扩增引物,序列如下:上游引物:5'-AAACCCGGGATGGCGGAAATTTAAAGG-3',下游引物:5'-GGGTAGGCTAGAAGAGG-TATTTTCGG-3';产物大小:1239bp。引物的合成及 PAGE 纯化委托上海生工生物工程公司完成。(2) pLenti-eGFP-Suv39h1 慢病毒表达载体的构建与鉴定:以含有 Suv39h1 cDNA 的 PCMV-SPORTS6 质粒为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 3min;94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 1min,36 个循环;68℃ 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,胶回收纯化目的片段(方法参照试剂盒说明书)。回收后的目的片段与慢病毒空载体 Lenti-GFP-Neo 分别进行 XmaI 和 KpnI 双酶切,使其线性化,再次胶回收纯化;配制连接体系:线性化载体(0.1 μ g/ μ l) 1 μ l、酶切后的目的基因 5 μ l、10 $\times$ buffer 1 μ l、ATP 1 μ l、Ligase 0.7 μ l 和 ddH₂O 1.3 μ l 共 10 μ l,16℃ 过夜连接后转化新鲜配制的大肠杆菌 DH5 α ,涂板培养。挑取单克隆菌落,用质粒小量提取试剂盒抽提其质粒并进行 PCR 鉴定。PCR 阳性克隆质粒,委托上海比昂生物医药有限公司测序,测序结果与 GeneBank 数据库进行 Blast 比对和鉴定;同时对阳性克

隆质粒进行 KpnI 和 XmaI 双酶切,通过胶电泳鉴定。PCR 序列及 KpnI 和 XmaI 双酶切鉴定均与预期符合者,为构建成功的 PLenti - eGFP - Suv39h1 慢病毒表达载体。(3)慢病毒包装及病毒效价测定:选择生长状态良好的 293T 细胞,在对数生长期行胰蛋白酶消化,接种于 25ml 的 15cm 细胞培养皿培养,待细胞密度达 60% ~ 70% 时用于转染。将编码慢病毒颗粒的 PLenti - eGFP - Suv39h1、pRsv - REV、pMDlg - pRRE、pMD2G 进行高纯度无内毒素质粒抽提,再制备成慢病毒包装系统 DNA 溶液,质粒用量分别为 20 μ g、10 μ g、15 μ g 和 7.5 μ g,加入无菌水定容至 1800 μ l,再加入 CaCl₂ (2.5mol/L) 溶液 200 μ l,混匀,加入 2 $\times$ PBS 缓冲盐溶液 2000 μ l,室温放置 20 ~ 30min 后,共同转染 293T 细胞。转染后 12h 更换为完全培养液,培养 72h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。将收集的上清液于 4 $^{\circ}$ C,4000r/min 离心 10min;通过 0.45 μ m 滤器过滤;4 $^{\circ}$ C,25000r/min 超速离心 20min;最后以 500 μ l 冰 PBS 重悬病毒沉淀,4 $^{\circ}$ C 溶解过夜。经上述浓缩和纯化后即得到高效价的病毒液。用 293T 细胞逐孔稀释效价测定法来测定效价,稀释浓度从 10⁻² 到 10⁻⁶,同时设置一个空白对照,转染 4 天后,于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,采集图像,统计分析各组细胞照片,病毒效价为每孔表达 eGFP 的细胞数/稀释倍数。(4)RT - PCR 分析 293T 细胞中 Suv39h1 表达:感染复数 (MOI 值) 为 10 和 30 的慢病毒分别转染 293T 细胞,待细胞长满培养板,收集生长状态良好的目的细胞,采用 TRIzol 一步法快速提取总 RNA,直接用 RT - PCR 试剂盒扩增 Suv39h1,反应条件为:42 $^{\circ}$ C 30min;94 $^{\circ}$ C 15s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行分析。

结 果

1. 构建慢病毒表达载体 PLenti - Suv39h1 - eGFP 的鉴定:Suv39h1 cDNA 克隆载体的 Suv39h1 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 1239bp 可见一特异条带,片段大小与预期大小一致 (图 1)。Suv39h1 PCR 产物纯化后与载体 Lenti - GFP - Neo 进行酶切、连接,后转化感受态细胞,划线后挑出 7 个单克隆菌落 PCR 鉴定,结果显示其中 6 个克隆 (1 ~ 4 号和 6、7 号) 可扩增出约 1239bp 的目的片段 (图 2)。选取 PCR 阳性克隆抽提质粒,在 XmaI 和 KpnI 双酶切作用后,得到两条片段,大小分别约为 7500bp 和 1239bp;同时以未经酶切的质粒作对照,电泳结果显示出明显的 3 条带 (图 3)。测序序列经 GenBank 比对,与 NM_011514.2 序列一致。电泳和测序结果均证明重组 PLenti - Suv39h1 - eGFP 表达载体构建成功。

2. 慢病毒包装及病毒效价测定:慢病毒包装后 48h,293T 细胞生长状态好,荧光显微镜下显示约 95% 以上表达绿色荧光,荧光强度高,表明慢病毒包

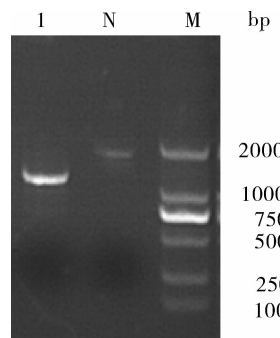


图 1 Suv39h1 编码框序列扩增产物

1. Suv39h1 基因;N. 阴性对照;M. DL2000 标志物

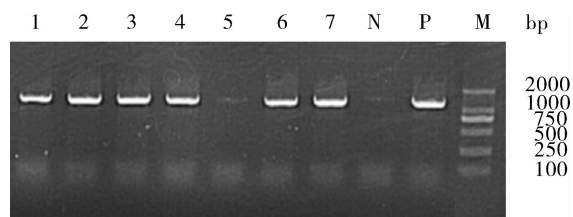


图 2 PLenti - Suv39h1 - eGFP 重组克隆 PCR 鉴定

1 ~ 7. 单克隆菌落;N. 阴性对照;P. 阳性对照;M. 为 LD2000 标志物

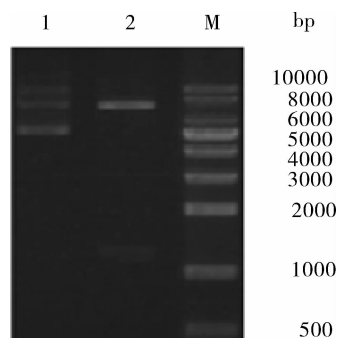


图 3 PLenti - Suv39h1 - eGFP 重组质粒双酶切鉴定结果

1. 未质粒酶切的质粒;2. 双酶切的质粒;M. LD10000 标志物

装成功且转染效率高 (图 4)。等倍稀释后分别感染 293T 细胞,通过观察 eGFP 的表达量,测得浓缩后病毒效价为 2.11 $\times$ 10⁸ TU/ml。

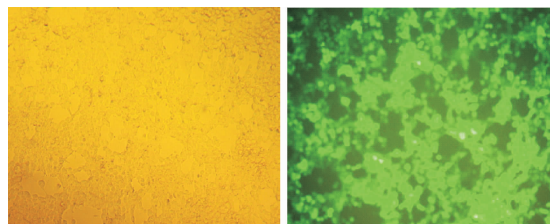


图 4 Suv39h1 表达慢病毒感染 293T 细胞后 eGFP 的表达情况 ($\times$ 100)

左图为正常显微镜下细胞;右图为荧光显微镜下细胞;二者为同一视野

3. Suv39h1 mRNA 表达的 RT-PCR 检测: MOI 为 10 和 30 的病毒液感染 293T 细胞后, Suv39h1 基因 mRNA 表达 RT-PCR 结果显示, MOI 为 30 的细胞其条带明显亮于 MOI 为 10 的条带, 其亮度大约为后者的 3 倍, 提示得到的病毒液不但能感染 293T 细胞, 并且能在细胞中均匀稳定表达 (图 5)。

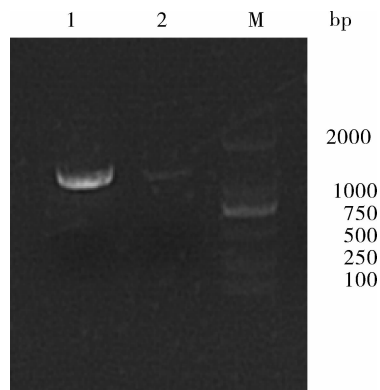


图 5 RT-PCR 检测转染后 293 细胞中 Suv39h1 基因表达

1. MOI 为 30; 2. MOI 为 10; M. DL2000 标志物

讨 论

Suv39h1 是第一个被发现的组蛋白赖氨酸甲基转移酶, 主要参与 H3K9me3, 与基因表达抑制有关。目前研究发现, 随肌细胞分化成熟, Suv39h1 基因表达水平逐渐下降直至不表达, 但若早期完全干扰 Suv39h1 基因表达, 肌细胞早、晚期的分化指标将不表达^[1]; 通过降低 Suv39h1 及 H3K9m3 的表达, 神经细胞可以选择性的增加脑源性神经因子和神经因子调节的突触产物, 从而促进神经细胞的分化和成熟^[2,3]。上述研究提示我们, Suv39h1 及 H3K9m3 在体细胞分化中显著下调, 但适当时间 Suv39h1 及 H3K9m3 基因表达, 可能是控制体细胞分化启动的重要部分。我们前期研究结果显示, 在 MCS 定向分化肝细胞过程中, Suv39h1 逐渐下降, 由此我们推测 Suv39h1 和 H3K9me3 在启动 MCS 定向分化肝细胞中可能发挥重要作用, 但这方面的研尚未见报道。将 Suv39h1 导入肝细胞诱导的 MCS 中是探讨其在肝细胞分化中作用最直接、最有效的方法。

慢病毒载体是在 HIV-1 病毒基础上改造而成的病毒载体系统, 是目前感染效率最高的载体, 与其他原核、真核载体和反转录载体相比, 其优点在于: 既能感染分裂期细胞, 又能感染非分裂期的细胞, 能高效的将目的基因导入动物和人的原代细胞或细胞系, 其介导的基因表达作用持续且稳定, 目的基因能整合到宿主

细胞基因组中, 并随细胞基因组的分裂而分裂, 且免疫反应小, 因此是基因转染的理想载体^[4-6]。本实验采用目前较先进的四质粒系统, 由 pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 和 pLenti-eGFP-Neo 组成, 其中 pRsv-REV、pMDlg-pRRE 和 pMD2G 含有病毒包装所必须的元件, pLenti-eGFP-Neo 编码的绿色荧光蛋白和 Neo 抗性基因有利于转染后细胞的观察及筛选, 更重要的是剔除了致病基因, 使慢病毒具有较高的安全性。

本研究以明确含有小鼠 Suv39h1 基因的 cDNA 克隆载体为模板, 经 PCR 扩增获得 Suv39h1 基因, 进一步构建该基因的慢病毒表达载体。将 PCR 阳性菌落的质粒抽提, 在 XmaI 和 KpnI 双酶作用下, 得到两条片段, 大小分别约为 7500bp 和 1300bp, 其中小片段分子质量大小与 Suv39h1 分子质量大小一致; 阳性菌株 DNA 测序序列的 BLAST 比对结果也证实, 其序列与 Suv39h1 序列相符; 电泳和测序结果均表明 Suv39h1 基因已成功导入 pLenti-eGFP-Neo 慢病毒表达载体。包装后的病毒颗粒等倍稀释后分别感染 293T 细胞, 直接通过荧光显微镜观察 eGFP 的表达量, 测得其效价为 2.11×10^8 TU/ml, 病毒颗粒的效价高; 同时发现, 293T 细胞转染后 72h 约 95% 以上均表达绿色荧光蛋白, 证明所构建慢病毒载体可以高效转染入 293T 细胞, 并稳定表达。本实验成功构建和验证了 Suv39h1 基因慢病毒表达载体, 有助于通过导入 Suv39h1 基因, 为研究 Suv39h1 在 MCS 定向分化肝细胞中的作用以及调控机制奠定基础。

参考文献

- Guasconi SV, Fritsch L, Yahia H, *et al.* A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not cycling cells[J]. *EMBO J*, 2004, 23: 605-615
- Sen N, Snyder SH. Neurotrophin mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(50): 20178-20183
- Rountree MR, Selker EU. DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*[J]. *Heredity*, 2010, 105: 38-44
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, *et al.* Efficient transfer, integration, and sustained longterm expression of the transgene in adult rat brains injected with lentiviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11382-11388
- Lois C, Hong EJ, Pease S, *et al.* Germ-line transmission and tissue specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 868-872
- Dropulic B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research[J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(6): 649-657

(收稿: 2012-04-19)

(修回: 2012-05-29)