

· 基础医学 ·

文章编号: 1002 - 0217( 2018) 01 - 0001 - 03

## 人源 DNMT1 基因启动子荧光素酶报告基因载体的构建及其活性检测

黄滔<sup>1</sup>, 曹玉祥<sup>2</sup>, 张志坚<sup>3</sup>, 周兴路<sup>4</sup>, 魏慧君<sup>5</sup>, 吴志浩<sup>6</sup>

(1. 皖南医学院 临床医学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 3. 天津医科大学 总医院 肺癌研究所, 天津 300052; 4. 皖南医学院 检验学院, 安徽 芜湖 241002; 5. 皖南医学院 活性生物大分子重点实验室, 安徽 芜湖 241002; 6. 皖南医学院 基础医学院, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】目的:** 利用 PCR 扩增人源 DNA 甲基转移酶 1( DNMT1) 基因启动子, 构建其荧光素酶报告基因载体并对其活性进行检测。**方法:** 运用 PCR 技术以人非小细胞肺癌细胞 A549 基因组 DNA 为模版扩增出目的片段, 将 PCR 产物用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后连接到荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 上, 然后进行转化、菌落 PCR 及测序验证等。将构建成功的 pGL3-proDNMT1-luc 重组质粒和内参质粒 pRL-CMV-luc 共转入 H1299 细胞中检测 DNMT1 启动子活性。**结果:** 成功扩增出长度为 1634 bp 的目的片段, 并成功构建出 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因载体, 启动子具有活性。**结论:** DNMT1 启动子的成功克隆为进一步研究其分子调控机制和生物学意义奠定了基础。

**【关键词】**DNMT1; 启动子; 荧光素酶报告基因

**【中图分类号】**R 346 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2018. 01. 001

## Construction and determination of the activity of luciferase reporter vector of human DNMT1 gene promoter

HUANG Tao, CAO Yuxiang, ZHANG Zhijian, ZHOU Xinglu, WEI Huijun, WU Zhihao

School of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To construct and determine the activity of luciferase reporter vector of human DNMT1 gene promoter. **Methods:** The target fragment was amplified with PCR by using genomic DNA of human non-small cell lung cancer cell line A549 as template. The PCR products were digested by *Kpn* I and *Xho* I double enzymes and ligated to luciferase reporter vector pGL3-Basic, and then transformed into *E coli* to construct pGL3-proDNMT1-luc reporter vector that was verified by sequencing. The recombinant plasmid pGL3-proDNMT1-luc reporter vector and plasmid pRL-CMV-luc were transferred to H1299 cell and the DNMT1 promoter activity was determined by double luciferase reporter gene detection system. **Results:** The target fragment with length of 1634bp was amplified, and the luciferase reporter gene vector of pGL3-proDNMT1-luc was successfully constructed. The promoter was verified active. **Conclusion:** Successful cloning of pGL3-proDNMT1-luc vector may lay a solid foundation for following research of its molecular mechanism and biological implications.

**【Key words】** DNMT1; promoter; luciferase report gene

DNA 甲基化是哺乳动物基因组中最常见的表观遗传修饰, 主要由 DNA 甲基转移酶的催化来实现<sup>[1]</sup>。DNA 甲基转移酶 1( DNA methyltransferase 1, DNMT1) 是人体内存在的最重要的甲基转移酶, 起着维持甲基化的作用<sup>[2]</sup>。DNMT1 是 DNMTs 的一个重要亚型, 编码 1495 个氨基酸, 其羧基端是保守的

催化甲基化反应结合域。DNMT1 在多种肿瘤细胞中高表达, 如白血病<sup>[3]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>、子宫内膜癌<sup>[5]</sup>等, 与肿瘤的发生、发展、耐药和预后有着紧密联系, 可被选作肿瘤去甲基化治疗的靶点<sup>[6]</sup>。目前关于调控 DNMT1 的分子机制和生物学意义的研究较少, 因此克隆 DNMT1 基因启动子荧光素酶报告

基金项目: 安徽省自然科学基金项目( 1708085MH203); 国家级大学生创新创业训练计划项目( 201710368008)

收稿日期: 2017-06-29

作者简介: 黄滔( 1997-), 男, 2016 级临床医学本科生, ( 电话) 18805698698, ( 电子信箱) 1321255982@qq. com;

吴志浩, 男, 研究员, ( 电子信箱) zwu2ster@163. com, 通信作者。

基因载体为深入研究其调控机制和生物学意义奠定了基础。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 DMEM 培养基 (HyClone 公司); pGL3-Basic 质粒、质粒小量提取试剂盒 (Promega 公司); Polyjet (恩博生物公司); 限制性核酸内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I (NEW ENGLAND BioLabs 公司); T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司); 细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN 公司); *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells (TaKaRa 公司); PCR 产物纯化试剂盒(天根公司产品), A549 细胞和 H1299 细胞为实验室冻存。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞基因组 DNA 的提取 由实验室冻存的 A549 细胞复苏后,利用细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取 A549 基因组 DNA,利用分光光度计检测器检测提取 DNA 的浓度,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和完整度。

1.2.2 DNMT1 基因启动子克隆 在 UCSC Genome Browser 网站上查找出 DNMT1 基因启动子序列,根据序列利用 Oligo 7 设计出上游和下游引物,加上 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点和保护碱基。上游引物: 5'-GGGGTACCTGCTGTCATATCCAAGAAATCATT-GCC-3'(下划线为 *Kpn* I 酶切位点),下游引物: 5'-TTTCTCGAGGATGTACCAAACGGAGAGGCGAT-AC-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点),PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。启动子 PCR 扩增反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 56 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min,共 30 循环,10 $^{\circ}$ C 保温。

1.2.3 荧光素酶报告基因载体的构建 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 对 PCR 纯化产物和 pGL3-Basic 质粒进行酶切 20 h 和 5 h,酶切完成后用纯化试剂盒进行纯化,分别测出其浓度,按启动子片段:pGL3-Basic 载体为 3: 1 的摩尔比进行连接,用 T4 DNA 连接酶连接 5 h。将 30  $\mu$ L 的连接产物转化到 100  $\mu$ L 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,并经含 Ampicillin 的 LB 固体培养基培养,挑出 10 个单菌落,进行菌落 PCR,筛选出 1 个阳性菌落,再经过含 Ampicillin 的 LB 液体培养基培养过夜,用质粒小提试剂盒进行质粒提取后,酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.4 启动子活性检测 将生长状态良好的 H1299 细胞均匀接种于细胞培养 12 孔板中,当细胞数量达 70% 左右时将 pGL3-proDNMT1-luc 重组质粒和内参质粒 pRL-CMV-luc 进行共转,设立一个

pGL3-Basic 质粒空白对照,转染 48 h 后饥饿过夜收样后利用双荧光检测试剂盒检测萤火虫和海肾荧光素酶活性。每组设立 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.5 统计学分析 采用 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$  说明差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 DNMT1 启动子目的片段的 PCR 扩增 用提取出来的人非小细胞肺癌 A549 基因组 DNA 为模板,用合成的引物进行 PCR 扩增,用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,结果显示与设计的启动子目的片段长度一致,并呈现出一条特异性条带(图 1)。

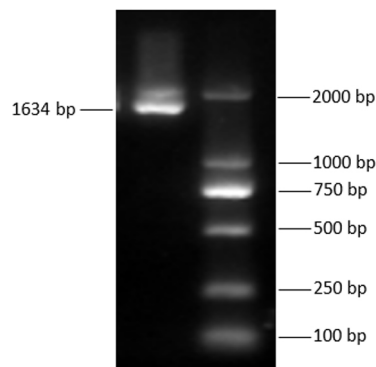


图 1 DNMT1 启动子 PCR 产物琼脂糖电泳图

2.2 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因载体的菌落 PCR 鉴定 将大量扩增出的片段进行纯化,将纯化后的产物和 pGL3-Basic 质粒分别行双酶切、连接、转化。选取单个菌落进行菌落 PCR 扩增出片段长度与设计的长度一致,初步鉴定了 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因重组质粒的构建成功(图 2)。

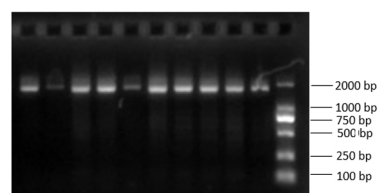


图 2 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因载体的菌落 PCR 鉴定图

2.3 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因载体的双酶切鉴定 将挑出的阳性单个菌落经过液体 LB 培养基培养过夜后提取质粒,用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,用 1% 的琼脂糖凝胶将酶切产物进行电泳。结果显示共出现 2 条带,4818 bp 出现的为载体片段,1643 bp 出现的为目的片段。说明目的片段在载体上插入成功(图 3)。

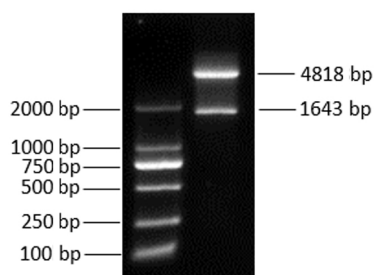


图3 重组质粒酶切后琼脂糖胶电泳图

#### 2.4 DNMT1 启动子荧光素酶报告基因活性检测

在12孔板中接种H1299细胞,以pGL3-Basic质粒作为对照,转染pGL3-proDNMT1-luc重组质粒和内参质粒pRL-CMV-luc,收样后用Promega公司的双荧光素酶报告基因检测系统进行检测。结果显示转染pGL3-proDNMT1-luc的实验组与转染pGL3-Basic-luc的对照组相比荧光量升高,对照组(0.1533 ± 0.00548)和实验组(2.850 ± 0.06481)相比差异有统计学意义( $t = 41.46, P = 0.0006$ ),因此可见构建的DNMT1启动子荧光素酶报告基因载体具有启动子活性(图4)。

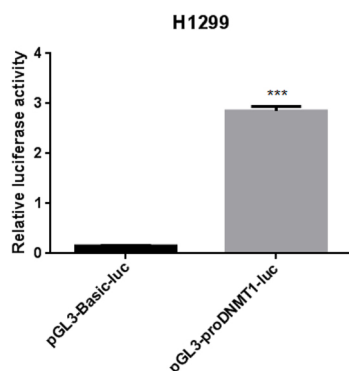


图4 DNMT1 启动子活性检测

### 3 讨论

报告基因是研究基因表达调控和基因工程的重要手段之一,其中双荧光素酶报告基因应用较广泛。荧光素酶的表达量与荧光的强度相关,可作为真核细胞中基因表达量及启动子活性的测定手段,其中常用的报告基因载体为pGL3-Basic载体<sup>[7]</sup>。

哺乳动物的基因组甲基化主要由5个DNA甲基转移酶(DNMT1、DNMT2、DNMT3A/3B和DNMT3L)催化。其中DNMT1甲基化DNA复制后产生的半甲基化位点,使特定的表观遗传标记得以维持。据相关文献报道, DNMT1与细胞的增殖和恶性转化以及肿瘤细胞的存活有着密切关系。DNMT1还具有调节细胞周期和肿瘤抑制基因的能力,以及通过p21和p53的高甲基化引发肺干细胞的增殖<sup>[8-10]</sup>。另外, DNMT1与基因启动子结合后可调节下游途径,如wnt/ $\beta$ -catenin。同时, DNMT1还影响胚胎干

细胞和体细胞中的微卫星的稳定性<sup>[11-12]</sup>。我们通过DNMT1启动子克隆、酶切、连接、转化等步骤构建的荧光素酶报告基因载体,对深入研究DNMT1的分子机制和DNMT1在肿瘤细胞中的作用及其相关机制有着重要作用;同时,对相应的靶向药物的开发和提高临床疗效具有重要的临床意义。

#### 【参考文献】

- [1] BENETATOS L, VARTHOLOMATOS G. On the potential role of DNMT1 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: not another mutated epigenetic driver [J]. *Annals of hematology*, 2016, 95(10): 1571-1582.
- [2] BOLAND MJ, CHRISTMAN JK. Characterization of Dnmt3b: thymine-DNA glycosylase interaction and stimulation of thymine glycosylase-mediated repair by DNA methyltransferase(s) and RNA [J]. *Journal of molecular biology*, 2008, 379(3): 492-504.
- [3] KLISOVIC RB, STOCK W, CATALAND S, et al. A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia [J]. *Clinical cancer research*, 2008, 14(8): 2444-2449.
- [4] XING J, STEWART DJ, GU J, et al. Expression of methylation-related genes is associated with overall survival in patients with non-small cell lung cancer [J]. *British journal of cancer*, 2008, 98(10): 1716-1722.
- [5] LIAO X, SIU MK, CHAN KY, et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis [J]. *International journal of cancer*, 2008, 123(2): 296-302.
- [6] JUNG Y, PARK J, KIM TY, et al. Potential advantages of DNA methyltransferase 1 (DNMT1)-targeted inhibition for cancer therapy [J]. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 2007, 85(10): 1137-1148.
- [7] NASEER S, KHAN S, 林佳, 等. C-3启动子克隆及荧光素酶报告基因载体构建[J]. *高师理科学刊*, 2016(11): 41-44.
- [8] MUDBHARY R, HOSHIDA Y, CHERNYAVSKAYA Y, et al. UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer cell*, 2014, 25(2): 196-209.
- [9] PENG L, YUAN Z, LING H, et al. SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities [J]. *Molecular and cellular biology*, 2011, 31(23): 4720-4734.
- [10] LIU CC, LIN JH, TW HSU, et al. IL-6 enriched lung cancer stem-like cell population by inhibition of cell cycle regulators via DNMT1 upregulation [J]. *International journal of cancer*, 2015, 136(3): 547-559.
- [11] ESPADA J, PEINADO H, LOPEZ-SERRA L. Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context [J]. *Nucleic acids research*, 2011, 39(21): 9194-9205.
- [12] HA K, LEE GE, PALII SS, et al. Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery [J]. *Human molecular genetics*, 2011, 20(1): 126-140.