

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.015

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.015>

应用Gibson Assembly法快速构建人组蛋白甲基化转移酶启动子 荧光素酶报告载体

朱进, 单玉喜, 阳东荣

(苏州大学附属第二医院泌尿外科, 江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的: 快速构建人组蛋白甲基转移酶(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)启动子荧光素酶报告载体并验证其活性。方法: 因EZH2启动子富含GC, 故应用Gibson Assembly方法设计分两段扩增, 然后将片段一步法连入pGL3-Basic质粒, 构建荧光素酶报告载体, 进行酶切鉴定。与pRL-TK内参照质粒共转染C4-2细胞, 双荧光素酶分析法检测启动子的活性。结果: 经酶切鉴定证实成功构建了EZH2启动子报告载体, 双荧光素酶报告基因检测结果显示构建的报告载体具有启动子活性。结论: 快速成功构建了具有启动子活性的EZH2启动子荧光素酶报告载体, 为进一步研究前列腺癌中EZH2表达调控机制提供必要的实验材料。

[关键词] Gibson Assembly; 报告载体; 人组蛋白甲基转移酶; 启动子活性

Construction of human enhancer of zeste homolog 2 promoter reporter vector using Gibson Assembly method

ZHU Jin, SHAN Yuxi, YANG Dongrong

(Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu 215004, China)

Abstract **Objective:** To construct a promoter reporter vector of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). **Methods:** Since EZH2 promoter is GC rich, its sequence were divided into two segments to clone. Primers were designed according to the Gibson rule to amplify sequence of the two segments. Polymerase chain reaction was performed. PCR products were then recovered and cloned in to pGL3-Basic vector using Gibson Assembly method. The constructed pGL3-EZH2-promoter vector was then verified by dual luciferase assay in prostate cancer C4-2 cells. **Results:** The EZH2 promoter reporter vector pGL3-EZH2-Promoter was successfully constructed. Dual luciferase reporter assays showed that the reporter vector have promoter activity. **Conclusion:** EZH2 promoter reporter vector was constructed using a quick method.

Keywords Gibson Assembly; reporter vector; enhancer of zeste homolog 2 (EZH2); promoter activity

收稿日期 (Date of reception): 2016-08-24

通信作者 (Corresponding author): 阳东荣, Email: doc_ydr@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81472776), 教育部博士学科点专项科研基金 (20133201110016), 江苏省自然科学基金 (BK20161222), 苏州市科技计划项目 (SYS201629)。This work was supported by the National Natural Science Foundations of China (81472776), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20133201110016), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20161222), and Suzhou Foundation for Development of Science and Technology (SYS201629), P. R. China.

果蝇zeste基因增强子人类同源物(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)是多梳抑制复合物(polycomb repressive complex 2, PRC2)的成员之一。EZH2是组蛋白甲基转移酶,通过使基因启动子区组蛋白H3K27甲基化而抑制基因表达^[1]。有研究^[2-3]表明EZH2过表达在前列腺癌的进展中起到关键作用。去势抵抗前列腺癌中EZH2 mRNA表达上调,因此研究EZH2调控有助于揭示前列腺癌趋势抵抗转化的机制。我们拟构建EZH2启动子报告载体,为进一步研究EZH2在前列腺癌中的作用奠定基础。

传统载体构建方法是基于限制性核酸内切酶酶切、T4 DNA连接酶连接的方法。我们发现EZH2启动子序列中GC比例较高,我们曾尝试PCR一次性扩增未能成功。Gibson Assembly方法^[4]是一种将多个DNA片段一次性有序连接的方法。其要求拟连接的片段要有一小段的重叠序列。在同一个反应体系里,T5核酸外切酶酶切产生黏性末端,使DNA片段得以互补结合,然后Phusion DNA多聚酶修补缺损部分,Taq DNA连接酶将所有片段连接起来。我们设计分两段扩增EZH2启动子序列,然后应用Gibson Assembly方法快速构建EZH2启动子荧光素酶报告载体获得成功。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒pGL3-Basic、pRL-TK、感受态大肠埃希菌DH5 α 由本实验室保存。

1.2 载 体

pGL3-Basic的预处理:既往我们按传统方法构建载体时均常规将pGL3-Basic载体用Mlu I和Hind III双酶切,产生两个黏性末端备用。进一步将酶切好的载体削平黏性末端,切胶回收后,小牛肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIP)处理载体使末端去磷酸化。

1.3 引物设计与目的基因的扩增

EZH2基因启动子区富含GC,设计分两段扩增EZH2启动子。设计引物序列如下:第一段上游(part1F),CTATCGATAGGTACCGAGCTCTTAAGACGGGCGGATCACAAA;第一段下游(part1R),CTACCTCAACCCAGAGGAATTAGAGGGATTCTGC;第二段上游(part2F),TGTATCCTAAGCAGATCCCTCTAATTCCTCTGGGTTGA;第二段下游

(part2R),CTTTACCAACAGTACCGGAATGCCACCCCGCACGCCTACAAAC。其中part1F和part2R引物带下划线部分为与预处理好的pGL3-Basic载体两末端重叠的核苷酸序列;part1R和part2F引物带下划线部分为两段序列重叠的部分(图1)。以基因组DNA为模板,Q5超保真DNA聚合酶(Neb)扩增目的片段。反应条件:98℃预变性30s,然后98℃变性10s,55℃退火30s,72℃延伸90s,共25个循环,末次循环后72℃延伸2min。PCR产物全部在0.8%琼脂糖凝胶电泳,长波紫外线下观察、切胶,胶回收试剂盒纯化回收上述产物。

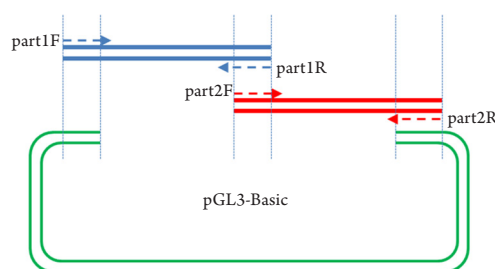


图1 pGL3-EZH2-Promoter质粒构建原理图

Figure 1 Schematic diagram of the construction of pGL3-EZH2-Promoter

蓝色为PCR扩增的启动子片段1,红色为PCR扩增的启动子片段2,绿色为预处理的pGL3-Basic。

Blue indicates the first section of EZH2 promoter, red indicates the second section of EZH2 promoter, green indicates the pretreated pGL3-Basic plasmid.

1.4 Gibson Assembly 反应体系配制

反应体系根据Gibson等^[4]发表的方法加以改进。反应所用5×CBA缓冲液配制:250mgPEG-8000,500μLTris-HCl(1mol/L,pH7.5),400μLdNTP(10mmol/L),50μLNAD(100mmol/L),加ddH₂O至总体积1mL,储存于-20℃备用。Gibson反应master mix配制(所用酶均购自Neb):8μL5×CBA缓冲液,0.8μLT5核酸外切酶,4μLTaqDNA连接酶,0.5μLPhusionDNA多聚酶,8μLMgCl₂(25mmol/L),4μLDTT(0.1mol/L),4.7μLddH₂O,制成总体积30μL混合物,分装为7.5μL每份,储存于-20℃备用。

1.5 报告载体 pGL3-EZH2-Promoter 的构建

于7.5μL Gibson反应master mix中加入100ng预处理过的pGL3-Basic载体、两段PCR产物各0.8μL,加ddH₂O至总体积10μL。反应条件:50℃,50min。

取4 μ L反应产物转化感受态DH5 α 细胞, 挑取克隆, 小提质粒, 用Not I 和Nco I 双酶切鉴定, 以之前构建的携带1.3 kb启动子的载体作为阳性对照, 空载体作为阴性对照。并进行测序分析。

1.6 细胞转染及荧光素酶活性的检测

C4-2细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。转染前将 5×10^5 个细胞接种于24孔培养板中。以转染空质粒pGL3-Basic的C4-2细胞为对照组。转染pGL3-EZH2-Promoter质粒的C4-2细胞为转染组。根据Lipofectamine 2000说明书将pRL-TK、pGL3-EZH2-Promoter/pGL3-Basic共转染细胞。转染24 h后裂解细胞, 按照荧光素酶检测试剂盒的操作说明, 测定荧光值, 计算Firefly/Renilla比值。

1.7 统计学处理

计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用GraphPad Prism 5统计软件分析。计量资料采用student-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 启动子序列 PCR 产物电泳分析

以基因组DNA为模板, 按照Gibson Assembly原理设计的引物分两段进行PCR扩增, 产物行0.8%琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约为534和1 878 bp的片段。切胶回收。

2.2 GL3-EZH2-Promoter 构建与鉴定

应用Gibson Assembly法一步构建了pGL3-EZH2-Promoter载体, 转化感受态大肠杆菌, 挑取一个克隆进行质粒小提, Not I 和Nco I 双酶切鉴定, 得到两个片段, 约4.8和2.4 kb。携带1.3 kb启动子的阳性对照载体酶切得到两个片段, 约4.8和1.3 kb, 对照空载体酶切得到一个片段, 约为4.8 kb (图2)。测序结果与EZH2基因启动子序列符合。

2.3 EZH2 启动子在前列腺癌 C4-2 细胞中的活性验证

pGL3-Basic空载体或构建的pGL3-EZH2-Promoter与pRL-TK转染前列腺癌C4-2细胞后, 检测报告基因的转录活性。发现与空载体pGL3-Basic相比, EZH2启动子在前列腺癌C4-2细胞中有较高的活性($P < 0.05$, 图3), 说明我们成功构建了EZH2启动子荧光素酶报告载体。

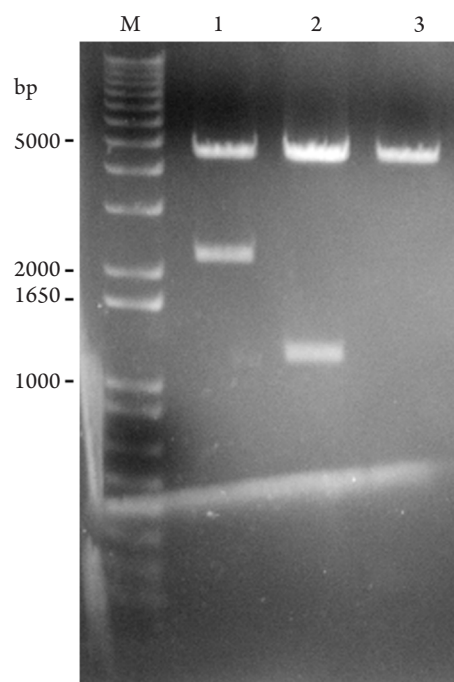


图2 pGL3-EZH2-Promoter质粒酶切图谱

Figure 2 Enzyme digestion result of pGL3-EZH2-Promoter

M, 1 kb plus DNA marker; 1, pGL3-EZH2-Promoter酶切; 2, 阳性对照pGL3-1.3 kb酶切; 3, 阴性对照pGL3-Basic酶切。M, 1 kb plus DNA marker; 1, digestion of pGL3-EZH2-Promoter; 2, digestion of the positive control pGL3-1.3 kb; 3, digestion of the negative control pGL3-Basic.

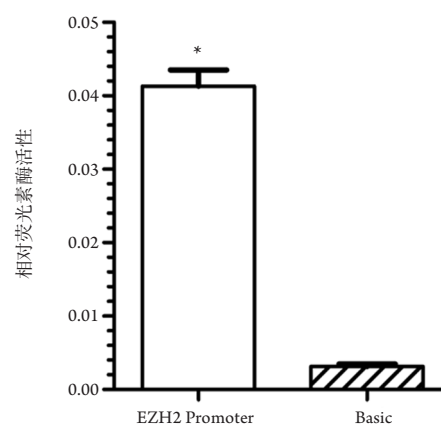


图3 EZH2启动子片段活性分析

Figure 3 Activity analysis of pGL3-EZH2-Promoter

3 讨论

我们应用Gibson Assembly法快速构建了人EZH2基因启动子的荧光素酶报告载体。并通过酶切和测序进行了鉴定。荧光素酶检测证实转染

pGL3-EZH2-Promoter质粒的实验组能观察到有显著的转录活性, 而转染pGL3-Basic质粒的对照组无明显转录活性。相对于传统酶切-连接的经典克隆方法, Gibson Assembly应用于本次构建有以下优势: 1)对于长的序列, 尤其是富含GC等复杂情况, 整段PCR可能无法得到目的条带或碱基突变的机会显著增加, 可以分2段甚至数段PCR扩增, 然后一次拼接成功, 大大减少了构建步骤和时间。2)时间短, 传统法PCR产物酶切及T4 DNA连接酶连接均需要较长时间, 本法PCR产物无需酶切, Gibson拼接只需约50 min的反应时间。3)传统方法需要考虑目的片段内部有无酶切位点, 而在多克隆位点处选取不同的酶切位点。本法无需考虑此问题, 因此预处理好的载体可以一直使用。4)传统方法由于可能存在载体酶切后纯化不完全, 残留小片段, 导致空载体自连、挑选克隆时阳性率不高。本方法阳性率高, 理论上能达到100%, 只需挑选1~2个克隆即可。

NEB公司已经推出了商品化的Gibson Assembly试剂盒, 但其价格昂贵。我们根据Gibson^[4]所描述的方法, 配置了反应液, 并发现只需原用量1/4的反应液即可确保成功完成反应, 因此大大降低了克隆的费用。

研究^[5]表明EZH2是多种恶性肿瘤发生发展过程中的关键基因。EZH2在前列腺癌中高表达, 促进前列腺癌增殖和转移, 并促进激素依赖前列腺癌向激素抵抗前列腺癌转化^[6], 但其详细调控机

制尚未完全阐明。另外, 我们正在进行的研究发现, EZH2在特定的恶性肿瘤中低表达, 与在其他肿瘤中的普遍高表达不同。因此, EZH2在肿瘤发生、发展中的作用还需要我们进一步的研究。本实验构建的人EZH2启动子荧光素酶报告载体为后续研究奠定了基础。

参考文献

1. Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(2): 155-164.
2. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics[J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1-2): 21-29.
3. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer[J]. *Nature*, 2002, 419(6907): 624-629.
4. Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(20): 6984-6990.
5. Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression[J]. *British Journal of Cancer*, 2011, 106(2): 243-247.
6. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent[J]. *Science*, 2012, 338(6113): 1465-1469.

本文引用: 朱进, 单玉喜, 阳东荣. 应用Gibson Assembly法快速构建人组蛋白甲基化转移酶启动子荧光素酶报告载体[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(12): 1971-1974. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.015

Cite this article as: ZHU Jin, SHAN Yuxi, YANG Dongrong. Construction of human enhancer of zeste homolog 2 promoter reporter vector using Gibson Assembly method[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(12): 1971-1974. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.015