

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0023-05

血液系统条件性 *DNMT3B* 基因 敲除小鼠的构建及鉴定*

李福兴¹, 胡超², 何薇¹, 乔晓红¹, 谢晓恬¹

(1. 同济大学附属同济医院 儿科, 上海 200065; 2. 复旦大学附属中山医院
泌尿外科, 上海 200032)

摘要: 目的 构建可在血液系统中条件性敲除 *DNMT3B* 基因小鼠并进行鉴定, 为研究 *DNMT3B* 基因的生物功能及其在血液肿瘤疾病的作用机制提供动物模型。**方法** 将引进的 *DNMT3B*^{fllox/fllox} 小鼠与 *Mx1-Cre*⁺ 小鼠进行杂交繁殖, 得到基因型 *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁺ 及 *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁻ 两种子代, 再用这两种子代杂交产生子代小鼠, 通过 PCR 法鉴定子代小鼠的基因型; 获得基因型为 *DNMT3B*^{fllox/fllox}*Mx1-Cre*⁺ 的小鼠, 通过腹腔注射 pI-pC 共 5 次诱导 *DNMT3B* 敲除, 然后用半定量 PCR 方法鉴定 *DNMT3B* 基因敲除情况。**结果** 基因型鉴定确认在 13 只小鼠中有 2 只为 *DNMT3B*^{fllox/fllox}*Mx1-Cre*⁺, 经 pI-pC 腹腔注射后, *DNMT3B* 基因通过 *Cre/loxP* 系统被成功敲除。**结论** 该方法成功构建可以在血液系统条件性敲除 *DNMT3B* 基因的小鼠, 并进行敲除后鉴定。

关键词: *DNMT3B*; 基因敲除; *Cre/loxP* 系统; 小鼠

中图分类号: R33

文献标识码: A

Generation of hematopoietic system-specific *DNMT3B* gene conditional knockout in mouse model*

Fu-xing Li¹, Chao Hu², Wei He¹, Xiao-hong Qiao¹, Xiao-tian Xie¹

(1. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200065, China; 2. Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To generate hematopoietic system-specific *DNMT3B* conditional knockout mice, providing mouse model for further functional study of *DNMT3B* in hematological malignancies. **Methods** *DNMT3B*^{fllox/fllox} mice were cross bred with *Mx1-Cre*⁺ mice to generate *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁺ and *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁻ mice. *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁺ mice were further cross bred with *DNMT3B*^{fllox/+}*Mx1-Cre*⁻ mice for *DNMT3B*^{fllox/fllox}*Mx1-Cre*⁺ mice. *DNMT3B*^{fllox/fllox}*Mx1-Cre*⁺ mice were injected intraperitoneally with poly (I:C) twice a day for a total of five times for *DNMT3B* deletion. PCR was performed for genotyping of off-springs. Deletion of *DNMT3B* was confirmed by semi-quantitative PCR. **Results** Genotyping results identified 2 out of 13 off-springs which were *DNMT3B*^{fllox/fllox}*Mx1-Cre*⁺ homozygous. *DNMT3B* gene was successfully knocked out with injection of pI-pC. **Conclusions** Hematopoietic system-specific *DNMT3B* gene conditional knockout homozygous mice are successfully generated, which serves as an ideal model for functional study of *DNMT3B*.

Keywords: *DNMT3B*; gene knockout; cre/loxP; mice

抑癌基因失活可导致肿瘤的发生, 而启动子区高甲基化是导致抑癌基因沉默失活的常见机制之一, 该

收稿日期: 2017-06-26

* 基金项目: 上海卫生系统先进适宜技术推广项目 (No: 20135Y073)

[通信作者] 谢晓恬, E-mail: xtxie@163.com

现象广泛地存在于多种恶性肿瘤中^[1]。DNA 甲基化是表观遗传学中一种最为重要的修饰,是通过 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)来催化和维持。DNMTs 包括 DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B,后 2 个在哺乳动物 DNA 甲基化中起主要催化作用^[2]。目前研究发现, DNMT3B 在部分 MDS 及急性髓系白血病中呈高表达水平,且高表达患者生存期较短,化疗疗效不佳,预后不良,提示 DNMT3B 在血液肿瘤疾病发生、发展起重要作用^[3-6]。通过基因敲除是研究基因功能的主要手段之一,目前国内尚无在血液系统条件性敲出 DNMT3B 基因小鼠模型的报道,国外仅有利用 Cre/loxP 系统在细胞水平敲出 DNMT3B 基因的研究^[7],也有可以在肠道组织敲除 DNMT3B 小鼠模型相关研究^[8],尚无可以条件性在血液系统敲出 DNMT3B 基因小鼠模型的报道。本课题组利用引进的 DNMT3B^{fllox/fllox} 小鼠,与 Mx1-Cre 小鼠交配,成功构建可以在血液系统条件性敲除 DNMT3B 基因的小鼠,并进行敲除后鉴定,为研究 DNMT3B 在血液肿瘤中的作用提供动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

DNMT3B^{fllox/fllox} 小鼠 [从 Fan Guoping 教授 (David

Geffen School of Medicine, UCLA) 获得], Mx1-Cre 小鼠 (由伊利诺伊大学芝加哥校区血液肿瘤研究实验室保存繁育), 均为 C57BL/6 背景。所有动物饲养繁殖均在伊利诺伊大学芝加哥校区实验动物中心完成。

1.2 小鼠饲养和繁殖

按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养,环境温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%,小鼠饲料、垫料和饮水均经过高温高压灭菌处理,垫料 1 周更换 1 次。采用 1 只雄鼠和 2 只雌鼠同居的方式进行繁殖。母鼠孕期为 19 ~ 21 d,哺乳期为 20 ~ 22 d。

1.3 方法

1.3.1 小鼠构建策略与流程 DNMT3B^{fllox/fllox} 小鼠,是以 DNMT3B 基因的 16~19 号外显子作为靶基因,在其两端插入 loxP 位点 (见图 1A),与表达 Cre 酶的 Mx1-Cre 工具鼠 (见图 1B) 交配后获得 DNMT3B^{fllox/fllox}Mx1-Cre⁺,通过注射 pI-pC 注射诱导 Cre 重组酶表达,切除 2 个 loxP 位点间的序列,从而实现靶基因的敲除。

1.3.2 构建流程 DNMT3B^{fllox/fllox} 小鼠与 Mx1-Cre⁺ 小鼠交配后产生 DNMT3B^{fllox/+}Mx1-Cre⁺ 及 DNMT3B^{fllox/+}Mx1-Cre⁻ 2 种子代,再用 DNMT3B^{fllox/+}Mx1-Cre⁻ 与 DNMT3B^{fllox/+}Mx1-Cre⁺ 杂交产生子代,最后通过 PCR 反应鉴定其基因型 (见图 1C)。

1.3.3 小鼠基因型鉴定 剪取 4 周龄小鼠尾尖

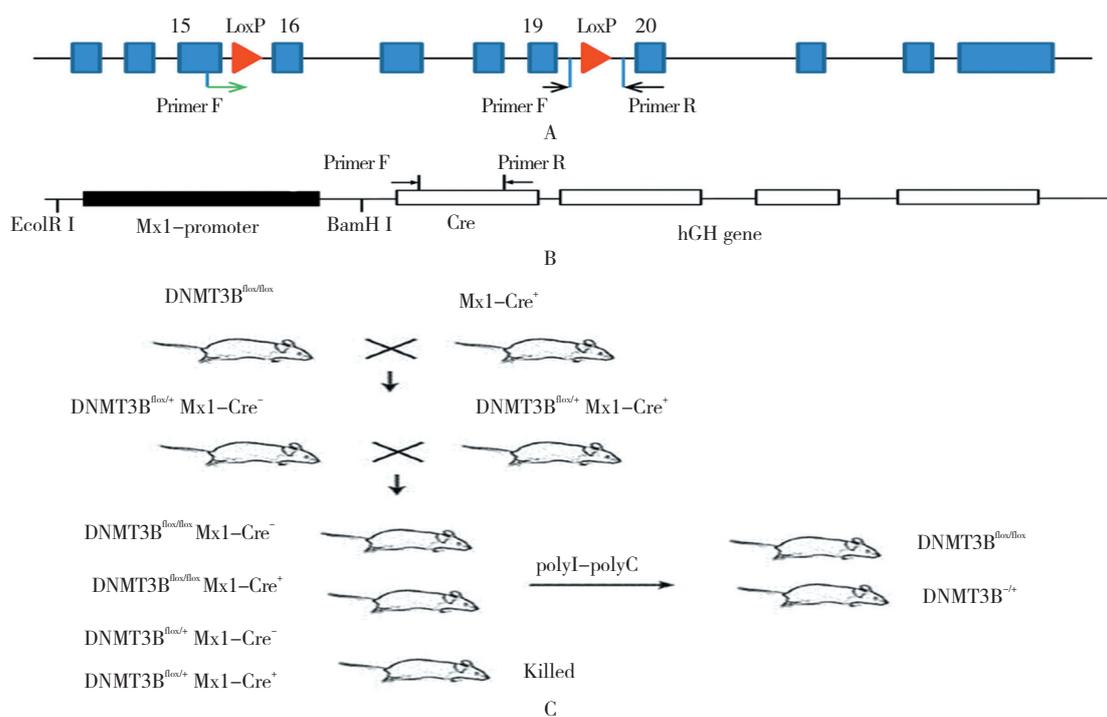


图 1 DNMT3B 敲除小鼠模型构建流程

2 ~ 5 mm, 置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 每管加入鼠尾裂解缓冲液 (direct PCR lysis reagent, Viagen Biotech Inc) 100 μ l 和蛋白酶 K (proteinase K, Sigma-Aldrich) 5 μ l, 55 $^{\circ}$ C 震荡裂解过夜; 然后 85 $^{\circ}$ C, 45 min 灭活蛋白酶 K; 室温, 12 000 r/min 离心, 5 min, 取上清做模板可用于 PCR 分析。使用 Sigma 公司合成的引物进

行聚合酶链反应 (PCR)。见表 1。

反应体系 (10 μ l): 10 \times Titanium Taq Buffer 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l, 正反向引物各 0.1 μ l, 50 \times Titanium Taq Polymerase 0.2 μ l, 4 μ mol/L dNTP 0.5 μ l, 双蒸水补足至 10 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、63 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸

表 1 基因型鉴定的引物

基因	引物序列	长度 /bp
<i>Mx1-Cre</i>	正向: 5'-CTGCATTACCGGTCGATGCAAC-3'	301
	反向: 5'-GCATTGCTGTCACCTGGTCTGTG-3'	
<i>Floxed</i>	正向: 5'-AGAGCACTGCACCACTACTGCTGGA-3'	270 (wild)
	反向: 5'-CAGCTCAGACCTCTCTGGTGACAAG-3'	406 (floxed)
<i>DNMT3B deleted</i>	正向: 5'-TGCCCTGCAAGACTTCTTCA-3'	500
	反向: 5'-CAGCTCAGACCTCTCTGGTGACAAG-3'	

30 s, 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 置入 4 $^{\circ}$ C 保存备用, 取 PCR 反应终产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 根据扩增条带确定小鼠子代基因型。

使用 *Floxed* 引物扩增, 凡是能扩增出 2 条带 (270 和 406 bp) 者均为 DNMT3B^{flox/+}, 而只能扩增出 1 条 406 bp 条带者基因型必为 DNMT3B^{flox/flox} Mx1-Cre⁺ 或者 DNMT3B^{flox/flox} Mx1-Cre⁻; 再以 Cre 通用引物扩增, 凡是能扩增出 301 bp 条带者为 DNMT3B^{flox/flox} Mx1-Cre⁺, 即可以用于 DNMT3B 敲除的小鼠, 见表 2。

表 2 基因型对应电泳条带

基因	406 bp	270 bp	500 bp
<i>DNMT3B^{flox/flox}</i>	+	-	-
<i>DNMT3B^{flox/+}</i>	+	+	-
<i>DNMT3B^{+/+}</i>	-	+	-
<i>DNMT3B^{-/-}</i>	-	-	+

1.3.4 转基因小鼠 DNMT3B 敲除效能鉴定 由于 *floxed* 小鼠在 *DNMT3B* 基因的 15 和 16, 19 和 20 号外显子中间各插入 1 个 LoxP 位点, 设计敲除后鉴定引物 primer F', 位于 15 号外显子, 如果成功敲除, 将可以扩增出 500 bp 左右条带。对 DNMT3B^{flox/flox} Mx1-Cre⁺ 小鼠, 通过隔天腹腔注射聚肌胞苷酸 (pI-pC; GE Healthcare) 1 次, 体重 10 μ g/g, 共 5 次, 诱导 *DNMT3B* 基因的丢失。pI-pC 腹腔注射完成后, 第 7 天处死小鼠取骨髓细胞, 使用 DNA 提取试剂盒 (Puregene Blood Core KitB, QIAGEN) 按说明书提取 DNA, 同时使用 3 条引物

primer F, primer F', primer R 按 genotyping 体系和条件行 PCR 证实 DNMT3B 的敲除。

2 结果

2.1 DNMT3B^{flox/flox} Mx1-Cre⁺ 小鼠鉴定

通过 DNMT3B^{flox/+} Mx1-Cre⁺ 和 DNMT3B^{flox/+} Mx1-Cre⁻ 交配, 共产出小鼠 13 只, 分两步分别进行 DNMT3B^{flox/flox} 和 *Mx1-Cre* 基因型鉴定。

2.1.1 DNMT3B^{flox/flox} 基因型鉴定 DNMT3B^{flox/+} 小鼠自交所生子代 DNMT3B^{flox/flox}、DNMT3B^{flox/+}、DNMT3B^{+/+} 的基因型鉴定结果, 见图 2: 仅可以扩增出 270 bp 条带的为野生型 (如 2 号和 10 号), 可以同时扩增出 270 和 406 bp 的为杂合子 (如 1, 3, 6, 11, 13 号), 而仅可以扩增出 406 bp 条带者为 DNMT3B^{flox/flox}, 需要的突变纯合子 (如 4, 5, 7, 8, 9, 12 号)。

2.1.2 Mx1-Cre 基因型鉴定 Mx1-Cre⁺ 及 Mx1-Cre⁻ 小鼠交配仅可以产出 Mx1-Cre⁺ 和 Mx1-Cre⁻ 两种子代,

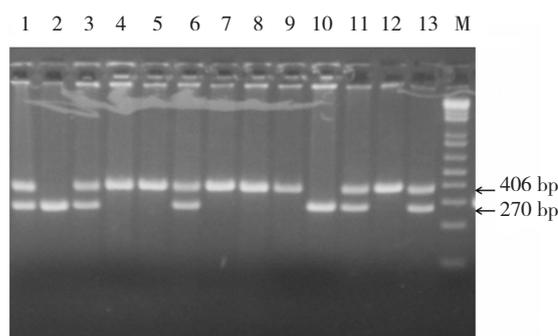


图 2 DNMT3B^{flox/flox} 基因型 PCR 鉴定结果

其中基因型为 $Mx1-Cre^+$ 的子代可以扩增出 301 bp 条带 (如 9 和 12 号), 而基因型为 $Mx1-Cre^-$ 的子代无法扩增出条带 (如 1-8 号, 10 号和 13 号), 在获得的 13 只子代小鼠中, 只有 9 号和 12 号携带 $Mx1-Cre$ 基因。见图 3。

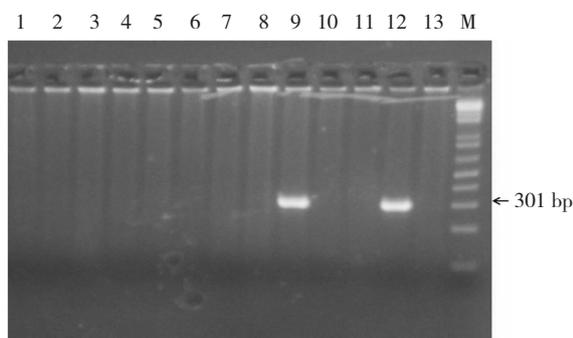


图 3 $Mx1-Cre$ 基因型 PCR 鉴定结果

2.1.3 DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁺ 个体获得 综合分析 DNMT3B^{flx/flx} 基因型和 Mx1-Cre 基因型鉴定结果, 确认 9 号和 12 号子鼠基因型为 DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁺, 是可以用于敲除 DNMT3B 的工具鼠。

2.2 Dnmt3B 敲除鉴定

对 DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁺ 小鼠, 隔天注射 5 次 pI-pC 后, 取鼠尾组织行 PCR 进行基因型鉴定, 由于可以敲除 DNMT3B 基因, 故能扩增出 500 bp 的片段, 用作实验组对象。而 DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁻ 小鼠无法敲除 DNMT3B 基因, 只能扩增出 406 bp 的片段, 可用作对照组。见图 4。

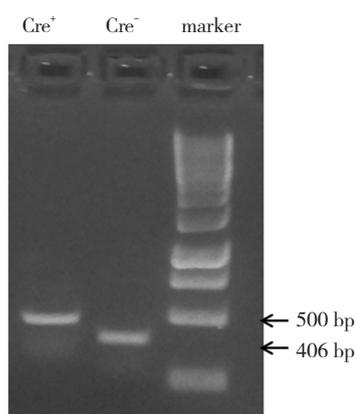


图 4 DNMT3B 敲除后 PCR 鉴定结果

3 讨论

在哺乳动物基因组中, CpG 岛甲基化是最常见的表观遗传学修饰, 不仅对个体正常发育起重要作用,

还可以影响基因表达、染色体结构和稳定性^[9]。甲基化调控需要 DNMTs 的参与, 其中 DNMT3A 和 DNMT3B 负责从头甲基化, 影响 DNA 的甲基化水平并调节基因表达^[10]。R OBERTSON 等研究发现, 恶性肿瘤患者 DNMT3A、DNMT1 及 DNMT3B 表达上调, 且 DNMT3B 的表达水平升高最为显著^[11], 提示 DNMT3B 可能在恶性肿瘤发病中起重要作用。随着研究的深入发现, DNMT3B 基因高表达与膀胱癌, 胃肠道恶性肿瘤, 乳腺癌、肝癌及白血病等多种恶性肿瘤发生、发展关系密切^[12-15], 目前认为, DNMT3B 可以导致抑癌基因启动子 CpG 岛高甲基化, 导致基因表达沉默, 从而导致肿瘤的发生^[16-17]。有研究提示, DNMT3B 在 myc 诱发的淋巴瘤和 MLL-AF9 诱发的 AML 中表现为抑制肿瘤作用, 提示其抑癌基因属性^[18], 然而亦有研究显示在 AML 患者中, DNMT3B 高表达与不良预后有关^[19], 提示原癌基因属性, 故 DNMT3B 在血液肿瘤中的作用和机制有待进一步研究。

构建基因敲除小鼠模型, 在全部组织或者特定组织中使某基因功能缺失, 是阐明该基因功能最直接有效的手段之一。Cre/LoxP 重组酶系统是目前用于条件性基因敲除中最常用的系统工具之一。LoxP 序列来源于噬菌体 P1, 而 Cre 酶是来源于噬菌体 P1 的一种蛋白。LoxP 序列中的特殊回文结构可以被 Cre 酶特异性识别结合并催化 2 个 LoxP 序列之间的片段发生同源重组, 进而实现对该片段的基因敲除。如果将 Cre 重组酶 cDNA 通过基因工程的手段置于组织或细胞特异性启动子之下, 可以在特定组织/细胞特异性表达 Cre, 获得 Cre 工具小鼠跟 Flox 小鼠交配之后, 可以得到可以在特定组织细胞中进行基因敲除的小鼠^[20]。

本研究为构建 DNMT3B 基因条件性敲除小鼠, 首先从美国实验室引进 DNMT3B^{flx/flx} 小鼠, 该小鼠在 DNMT3B 基因的 15 和 16, 19 和 20 号外显子中间各插入 1 个 LoxP 位点^[21]。通过与血液系统特异表达 Cre 酶的 Mx1-Cre 小鼠杂交, 获得 DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁺ 小鼠, 用 pI-pC 诱导 Cre 酶表达, 可以在血液系统敲除 DNMT3B 核心序列, 使得靶基因不能正常转录表达。DNMT3B^{flx/flx} Mx1-Cre⁺ 小鼠模型的构建为研究 DNMT3B 在正常造血调控及血液肿瘤中的作用机制提供合适的工具。基于 Cre/LoxP 系统, 开发构建其他组织系统特异性 CRE 表达小鼠, 可以通过条件敲除 DNMT3B 研究其在多种肿瘤中的作用机制。

志谢: 感谢 UCLA 范国平教授慷慨提供 DNMT3B^{flx/flx} 小鼠, 感谢伊利诺伊大学芝加哥分校钱

志坚教授提供 Mx1-cre 小鼠及实验指导,感谢黎力平博士对实验操作技术指导。

参 考 文 献:

- [1] MCCLUSKEY L L, CHEN C, DELGADILLO E, et al. Differences in p16 gene methylation and expression in benign and malignant ovarian tumors[J]. *Gynecologic Oncology*, 1999, 72(1): 87-92.
- [2] ARAND J, SPIELER D, KARIUS T, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(6): e1002750.
- [3] LUGTHART S, FIGUEROA M E, BINDELS E, et al. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1[J]. *Blood*, 2011, 117(1): 234-241.
- [4] FIGUEROA M E, LUGTHART S, LI Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(1): 13-27.
- [5] HAYETTE S, THOMAS X, JALLADES L, et al. High DNA methyltransferase DNMT3B levels: a poor prognostic marker in acute myeloid leukemia[J]. *PLoS one*, 2012, 7(12): e51527.
- [6] LÄNGER F, DINGEMANN J, KREIPE H, et al. Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in myelodysplastic syndrome[J]. *Leukemia Research*, 2005, 29(3): 325-329.
- [7] DODGE J E, OKANO M, DICK F, et al. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(18): 17986-17991.
- [8] LIN H, YAMADA Y, NGUYEN S, et al. Suppression of intestinal neoplasia by deletion of Dnmt3b[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(8): 2976-2983.
- [9] SCHAEFER C B, OOI S K T, BESTOR T H, et al. Epigenetic decisions in mammalian germ cells[J]. *science*, 2007, 316(5823): 398-399.
- [10] HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61(19/20): 2571-2587.
- [11] ROBERTSON K D, UZVOLGYI E, LIANG G, et al. The human DNA methyltransferases DNMTs 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors[J]. *Nucleic acids research*, 1999, 27(11): 2291-2298.
- [12] PERES R, FURUYA H, PAGANO I, et al. Angiogenin contributes to bladder cancer tumorigenesis by DNMT3b-mediated MMP2 activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43109-43123.
- [13] ZHANG X M, LI S, ZHANG Q M. DNA methyltransferase 3B-149C/T polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma: a case-control study[J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2014, 14(4): 12866-12871.
- [14] KHORAM-ABADI K M, FORAT-YAZDI M, KHEIRANDISH S, et al. DNMT3B-149 C > T and-579 G > T polymorphisms and risk of gastric and colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2016, 17(6): 3015-3020.
- [15] 李英华, 刘学东, 郭秀芬, 等. DNA 甲基转移酶在慢性髓系白血病患者中的表达及临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(6): 1547-1550.
- [16] ESTELLER M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer[J]. *The lancet oncology*, 2003, 4(6): 351-358.
- [17] FAN H, CHEN L, ZHANG F, et al. MTSS1, a novel target of DNA methyltransferase 3B, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2012, 31(18): 2298-2308.
- [18] ZHENG Y, ZHANG H, WANG Y, et al. Loss of Dnmt3b accelerates MLL-AF9 leukemia progression[J]. *Leukemia*, 2016, 30(12): 2373-2384.
- [19] NIEDERWIESER C, KOHLSCHMIDT J, VOLINIA S, et al. Prognostic and biologic significance of DNMT3B expression in older patients with cytogenetically normal primary acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(3): 567-575.
- [20] SCHMIDT-SUPPRIAN M, RAJEWSKY K. Vagaries of conditional gene targeting[J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(7): 665-668.
- [21] DODGE J E, OKANO M, DICK F, et al. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(18): 17986-17991.

(王荣兵 编辑)