

一种基于 GFP 分子荧光显示的检测大尺度 染色质松弛技术的建立*

秦 夏¹⁾ 张士猛¹⁾ 徐勤枝¹⁾ 叶棋浓²⁾ 周平坤^{1)**}

(¹⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; ²⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 在真核生物中, 基因组 DNA 是被高度包装成染色质的形式而存在的, 这就对基因在复制、转录、修复、重组时的功能分子有效地接近 DNA 形成了天然屏障, 执行上述生化反应需要松散染色质的结构, 染色质松散是染色质动态变化即染色质重塑(chromatin remodeling)的一种形式. 越来越多的证据表明, 染色质重塑在 DNA 损伤反应中起着非常重要的作用, 染色质重塑过程可以把损伤应答和修复蛋白募集到损伤位点, 从而完成修复. 为了进一步探讨染色质重塑和 DNA 损伤修复的偶联机制, 采用了基于 Lac 抑制子和 Lac 操纵子的大规模染色质重塑报告系统, 并借助 GFP 分子荧光显示方法, 建立了可以直观地观察染色质松散的技术. 在利用该技术证实了 DNA 损伤应答蛋白 TIP60 能够强烈诱导染色质松散的基础上, 发现 P53 诱导基因 3 蛋白(PIG3)在细胞辐射 DNA 损伤反应中也能够一定程度地诱导染色质松弛. 这些结果证明此技术是可靠的, 也为阐述 DNA 损伤修复与染色质重塑关联机制提供了新的信息.

关键词 染色质松散, 染色质重塑, DNA 损伤修复, P53 诱导基因 3, 异染色质区, 荧光显示

学科分类号 Q81, Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00642

针对辐射和基因毒性化学物诱发的细胞内 DNA 损伤, 真核细胞形成了一套高度进化保守且精密的损伤信号应答调控网络, 以维持基因组的稳定性. 为了有效地发挥 DNA 损伤修复和细胞周期检查点的功能, 必须使凝聚的异染色质打开, 促进修复蛋白接近 DNA 损伤位点, 这种染色质结构的松散是染色质重塑的重要内容, 主要通过对组蛋白进行共价修饰和 ATP 依赖的染色质重塑复合物两种方式来完成^[1-2]. 近年来, 染色质重塑在 DNA 损伤修复, 尤其是 DNA 双链断裂修复中的重要作用, 如 DNA 损伤修复与染色质重塑的偶联机制等基础问题越来越得到人们的关注^[2-4]. 目前, 在细胞水平研究染色质重塑的技术方法主要是通过检测染色质是否发生了大尺度松弛来建立的. 然而, 经典的研究技术操作步骤既复杂, 又不能实现直观检测, 限制了其推广应用.

为了深入、直观地研究染色质重塑的分子机制, 我们在一种基于免疫组化染色的大尺度染色质松弛检查技术基础上, 建立了一种可在活细胞上直观地实时监测染色质松散过程的荧光显微观察技

术. 该技术的原理是借助基因组中插入有 256 个 Lac 操纵子重复序列的 DG44 CHO 细胞所建立的 AO3_1 细胞系, 在基因共扩增后产生一个大约 90 Mb 的异染色质区域^[5-6]. 将要检测的基因与 Lac 抑制子及荧光蛋白 GFP 融合, 然后将构建的重组质粒转染 AO3_1 细胞, 表达的融合蛋白与 Lac 操纵子结合, 而 GFP 会发出绿色荧光. 基于 Lac 抑制子识别并结合 Lac 操纵子的原理, 融合蛋白可以靶向到细胞的异染色质区, 在激光共聚焦显微镜下通过荧光点的大小判断目的基因是否能够诱导包括 Lac 操纵子在内的大尺度染色质松弛(荧光点的大小与染色质松弛的程度正相关). 采用该系统我们验证了相关 DNA 损伤修复蛋白, 结果发现, TIP 60 (tat interactive protein, 60 ku)可以强烈地诱导异染

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB914603), 国家自然科学基金杰出青年基金(30825011)和国家自然科学基金(81071361)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931217, Fax: 010-68183899, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-12-08, 接受日期: 2011-03-04

染色质松散, P53 诱导基因 3(P53 inducible gene 3, PIG 3) 蛋白在正常情况下不具有这个活性, 而在细胞辐射损伤反应过程中能够一定程度地促进异染色质的松散, 显示染色质重塑功能. 该技术为我们研究阐明 DNA 损伤修复与染色质重塑之间的偶联和调控机制以及寻找潜在 DNA 损伤修复蛋白提供了很好的工具.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ham's F12 培养基购自 Neuronbc 公司; 透析胎牛血清购自 Hyclone 公司; 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司; Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; 内切酶购自 NEB 公司.

1.2 细胞培养

AO3_1 细胞株由 Andrew S. Belmont 博士 (University of Illinois, USA) 赠送, 军事医学科学院生物工程研究所叶棋浓教授实验室长期保存. 该细胞来源自二氢叶酸还原酶(DHFR)基因座被敲除的 DG44 CHO 细胞, 整合了包含 256 个拷贝 Lac 操纵子基因的 pSV2-DHFR-8.32 质粒. 在 Lac 操纵子基因上游含有 DHFR 基因, 可用氨甲喋呤(MTX)进行基因共扩增产生 90 Mb 的基因组异染色质区.

AO3_1 细胞常规培养于不含胸腺嘧啶脱氧核苷和次黄嘌呤的 Ham's F12 选择培养基中, 加入含 10% 的透析胎牛血清, 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养.

1.3 质粒构建

用于染色质大规模重塑实验的含有 Lac 抑制子编码序列的空载体 pRC-Lac 由叶棋浓教授赠送. 我们实验室在此基础上 PCR 扩增 Lac 抑制子编码序列并融入核定位信号(NLS), 克隆于 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pEGFP-N1 载体中, 成功构建了带有绿色荧光标记的空白对照载体 Lac-re-EGFP.

重组质粒的构建以 PIG3、TIP60 为例来阐述, PCR 扩增人的 *PIG3* 基因编码序列 cDNA 全长. *PIG3* 上游引物 5' CGGAATTCCGATGGGAGGGG-AGCCGGGCC 3', 下游引物 5' GGGGTACCCC-CAGTTCCTCTTTATTTTC 3'. *TIP60* 上游引物 5' CGGAATTCCGATGGCGGAGGTGGGGGAGAT 3', 下游引物 5' GGGGTACCCCCCACTTCCCCCTCT-TGCTCC 3'. 基因扩增条件如下: 95℃ 5 min; 32 个 PCR 循环反应(95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 90 s); 4℃ 保存. 分别将目的基因克隆到 *Eco*R I 和

Kpn I 双酶切的 Lac-re-EGFP 载体中以构建 Lac-re-*PIG3*-EGFP 及 Lac-re-*TIP60*-EGFP.

1.4 细胞转染

用 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司) 转染 AO3_1 细胞. 转染前 24 h 接种 AO3_1 细胞, 在 35 mm 细胞平皿中放入盖玻片上, 接种密度为每 35 mm 平皿接种 4×10^5 个细胞, 转染时细胞的密度达到 80%~90%. 分别将 4 μg 质粒 DNA 和 10 μl Lipofectamine2000 加入到 250 μl 的 Opti-MEM I Reduced Serum Medium(优化无血清培养基)中, 各自室温孵育 5 min. 然后将孵育的质粒 DNA 和孵育的 Lipofectamine2000 混合, 室温放置 20 min. 将要转染的 AO3_1 细胞用无血清 Ham's F12 培养液洗 2 遍, 并加入 2 ml 无血清 Ham's F12 培养液. 最后, 将混合物小心滴入培养皿中, 轻轻混匀, 6 h 后更换新鲜的含血清的 Ham's F12 培养液. 转染后 36 h 进行荧光显微观察.

1.5 荧光显微观察技术检测异染色质的松散

取出盖玻片, 首先用 4% 多聚甲醛(PBS 溶解)室温固定细胞 30 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; 用 0.2% Triton X-100(PBS 溶解)室温破膜 10 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; 然后用 0.2 mg/L 的 DAPI 或 5 mg/L 的 PI 染核 8 min, PBS 洗 3 遍, 每次 10 min; 最后用 10% 甘油封片. 通过在激光共聚焦显微镜下观察到的荧光点大小来判断靶基因诱导的染色质大尺度松弛程度.

1.6 统计学方法

用 Image-Pro Plus 软件对靶基因诱导的染色质松弛情况即荧光点的大小进行统计, 采用 *t*-test 分析, 确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义.

2 结 果

2.1 表达载体的构建

本报告系统是利用 Lac 抑制子蛋白可以识别并特异结合 Lac 操纵子的原理来设计的. 如前文所述, AO3_1 细胞整合有 256 个 Lac 操纵子的基因拷贝, 这段 DNA 的长度大概有 10.1 kb, 在正常的间期细胞中, 它会诱导其附近的 DNA 产生大约 90 Mb 的异染色质区. 我们将 Lac 抑制子基因克隆到 pEGFP-N1 载体中, 并在其下游加上核定位信号, 借助 EGFP 的荧光显示实现了直观观察这段异染色质松弛程度的目的(图 1a). 将待检测的基因插入到 Lac 抑制子 -EGFP 载体中, 当重组质粒转染

AO3_1 细胞后, 表达 Lac 抑制子 - 靶基因 -EGFP 的融合蛋白通过核定位信号进入细胞核, 通过 Lac 抑制子与异染色质上的 Lac 操纵子结合, 同时 EGFP 发出绿色荧光, 使得在荧光显微镜下就可以观察靶基因是否能够诱导异染色质的松弛. 采用这种策略, 我们构建了含有 *TIP60* 及 *PIG3* 靶基因的重组质粒, 并在正常及辐射损伤情况下对它们诱导染色质大尺度松弛的功能进行了研究.

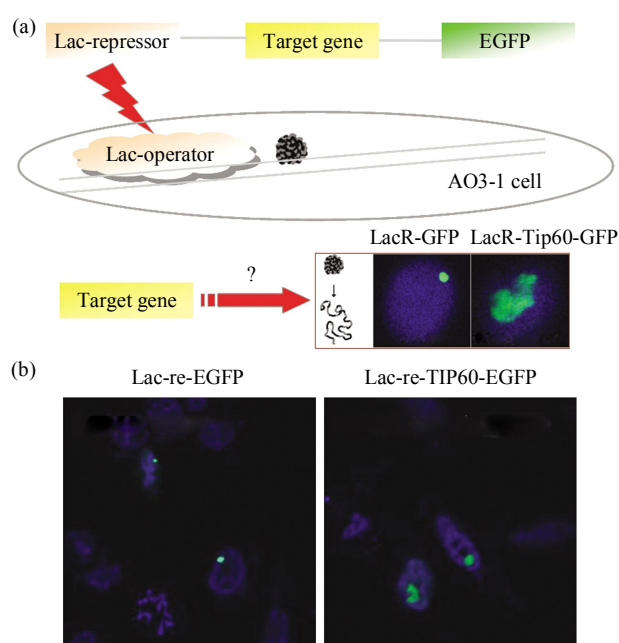


Fig. 1 TIP60 mediated large scale chromatin relaxation

(a) Lac repressor-GFP based large-scale chromatin relaxation system. (b) AO3_1 cells which contain heterochromatic 256 Lac-operator repeats were transfected with the vectors expressing the Lac-re-TIP60-EGFP fusion protein or the control Lac-re-EGFP vectors. At 36 h after transfection, cells were fixed, stained with DAPI for DNA and subjected to the observation of fluorescent confocal microscopy.

2.2 TIP60 可以诱导大尺度染色质松弛

TIP60 是细胞内广泛存在的乙酰转移酶, 作为重要的成员参与到多条信号通路中调节靶分子的活性, 包括基因的转录激活、染色质重塑、组蛋白的乙酰化、DNA 损伤修复等^[7]. TIP60 在 DNA 双链断裂(DSB)的修复中起重要作用, TIP60 通过与 H3K9 相互作用从而激活它的乙酰转移酶活性, 进而乙酰化并激活 ATM^[8-9]. 这些揭示了 TIP60 参与染色质重塑与 DNA 损伤修复的重要功能信息.

基于大尺度染色质松弛荧光显微观察技术, 构建 Lac-re-TIP60-GFP 重组质粒, 转染 AO3_1 细胞, 转染后通过激光共聚焦显微镜观察 TIP60 诱导异染色质松散的情况. 荧光显像结果显示 TIP60 能够强

烈地诱导大尺度染色质松弛(图 1b).

2.3 PIG3 诱导大尺度染色质松弛的活性

PIG3 (p53-inducible gene 3), 是受 p53 诱导表达上调并参与细胞早期凋亡的前凋亡基因^[10], 并发现其在 DNA 损伤的早期应答反应中具有重要功能^[11]. 我们通过对大尺度染色质松弛报告系统对 PIG3 进行了研究, 结果显示, 其在正常情况下并不能诱导异染色质的大尺度松弛, 而在 10Gy ⁶⁰Co γ 射线照射后则能够一定程度地诱导异染色质的松散(图 2a). 荧光斑点大小的量化结果显示, 10 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射下, 转染和表达包含 PIG3 融合蛋白(Lac-re-PIG3-EGFP)细胞的荧光斑点显著大于对照细胞(Lac-re-EGFP)($P = 0.02$, 图 2b).

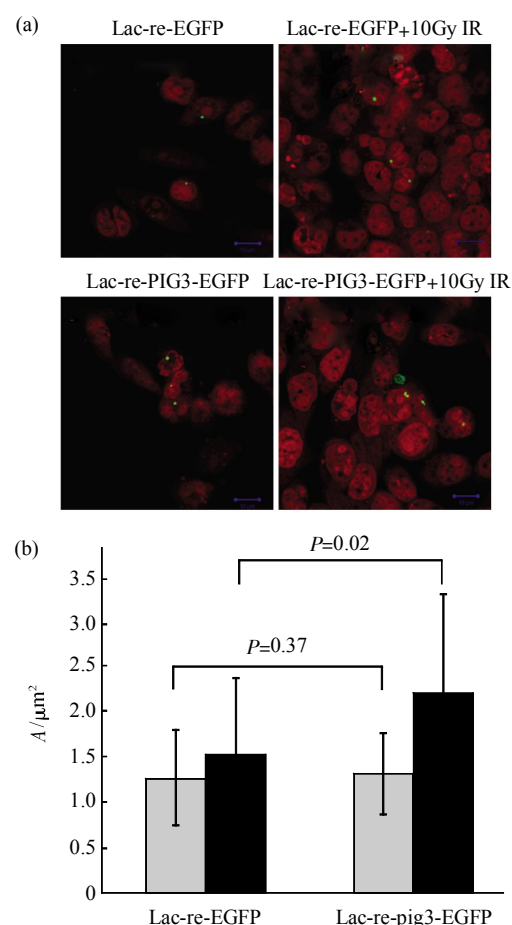


Fig. 2 Effect of PIG3 on large scale chromatin relaxation

(a) AO3_1 cells were transfected with vectors expressing the Lac-re-PIG3-EGFP fusion protein or control Lac-re-EGFP protein as indicated. At 36 h after transfection, cells were irradiated with or without 10 Gy γ -rays. At 45 min after irradiation, cells were fixed, stained with PI for DNA and subjected to the observation of fluorescence microscopy. (b) Data analysis of the chromatin relaxation. Ten EGFP positive cells were captured with fluorescence microscopy and the green dot size was calculated with Image-Pro Plus software. Statistical analysis was performed using student *t*-test method. □: 0Gy; ■: 10Gy.

3 讨 论

染色质松弛作为染色质重塑过程的重要内容,在核基因组 DNA 的代谢活动中具有重要意义.本研究建立的大尺度染色质松弛荧光显微观察技术,能够直观地检测到参与染色质重塑的蛋白质及其重塑功能,只需要构建含有靶基因的重组质粒,转染包含 256 个 Lac 操纵子的 AO3_1 细胞,36 h 后在荧光显微镜下观察融合蛋白诱导染色质松弛的活性,同时对荧光点的大小进行统计学分析即可得到科学可靠的结果.目前,虽然研究人员都非常关注染色质重塑及其与 DNA 损伤修复的关系,但是这方面研究进展相对较慢,对于其具体的分子机制更是知之甚少,其中一个非常重要的原因是受到技术方法的限制.目前,对于染色质重塑研究的技术方法主要是通过检测凝聚的染色质结构是否被打开从而处于松散的活性染色质状态,即大尺度的染色质松弛.其中经典检测方法主要通过用 DNase I、微球菌核酸酶等许多核酸酶对活性染色质的超敏感位点进行优先切割然后进行琼脂糖凝胶电泳分析^[4,12].若某基因无活性时,该基因分布的染色质区段在 DNase I 的作用下就出现有规律的呈梯度大小变化的 DNA 片段;若该基因有活性时,则该区段染色质就水解成为酸溶性的小片段,而不出现片段梯度带现象.但超敏感位点范围较广,无法检测某一具体靶基因诱导的大尺度染色质松弛.关于大尺度染色质松弛的检测方法目前报道较少,有文献报道,对于异染色质的伸展活性是通过 Lac 抑制子的多克隆抗体和荧光二抗标记的方法检测^[13],但是这种方法无法做到实时动态监测.我们将其系统进行改造,对重组质粒加上核定位信号(NLS)和 GFP 标签,这样不仅可以简单经济地检测靶蛋白诱导的异染色质的伸展情况,而且还可以对我们感兴趣的靶蛋白进行活细胞的荧光实时观测.采用该系统,证实了 TIP60 能够强烈地诱导大尺度染色质松弛,同时证明了另一个 DNA 损伤反应调节分子 PIG3 在辐射 DNA 损伤反应中也能够一定程度地诱导染色质松散,这为我们深入研究大规模染色质重塑与 DNA 损伤修复的关系奠定了很好的基础.

在本研究中,出于条件的限制,我们只观察了含有靶基因的重组质粒转染 AO3_1 细胞后 36 h 时其诱导的染色质松弛程度,而未能对其参与染色质重塑的整个过程做一个时间分布.因为在一般的激

光共聚焦显微镜下,我们无法在不同的时间点对同一个单细胞的生命活动(包括染色质重构在内)动态过程进行全程观测.要实现实时观测靶基因诱导染色质松散的过程,只有采用类似实时荧光显微技术(Time Lapse)这样的技术.由于实验室受此条件的限制,此研究未能涉及这样的动态观测.因此,我们通过比较后,选择了转染后 36 h 这个瞬时蛋白表达最佳状态的时间点的观察结果,来显示此大尺度染色质松弛功能研究技术的有效性.

参 考 文 献

- [1] Pandita T K, Richardson C. Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucl Acid Res*, 2009, **37**(5): 1363-1377
- [2] Bao Y, Shen X. Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, **17**(2): 126-131
- [3] Van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, *et al.* Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, 2004, **119**(6): 777-788
- [4] Peng G, Yim E K, Dai H, *et al.* BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(7): 865-872
- [5] Tumber T, Sudlow G, Belmont A S. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol*, 1999, **145**(7): 1341-1354
- [6] Belmont A S. Visualizing chromosome dynamics with GFP. *Trends Cell Biol*, 2001, **11**(6): 250-257
- [7] Ikura T, Ogryzko V V, Grigoriev M, *et al.* Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 2000, **102**(4): 463-473
- [8] Sun Y, Jiang X, Xu Y, *et al.* Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(11): 1376-1382
- [9] Sun Y, Jiang X, Chen S, *et al.* A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(37): 13182-13187
- [10] Polyak K, Xia Y, Zweier J L, *et al.* A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 1997, **389**(6648): 300-305
- [11] Lee J H, Kang Y, Khare V, *et al.* The p53-inducible gene 3 (PIG3) contributes to early cellular response to DNA damage. *Oncogene*, 2010, **29**(10): 1431-1450
- [12] Peng G, Lin S Y. BRIT1/MCPH1 is a multifunctional DNA damage responsive protein mediating DNA repair-associated chromatin remodeling. *Cell Cycle*, 2009, **8**(19): 3071-3072
- [13] Ye Q, Hu Y F, Zhong H, *et al.* BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol*, 2001, **155**(6): 911-921

Establishment of a Technology Detecting The Large Scale Chromatin Relaxation Based on GFP Fluorescence Imaging*

QIN Xia¹⁾, ZHANG Shi-Meng¹⁾, XU Qin-Zhi¹⁾, YE Qi-Nong²⁾, ZHOU Ping-Kun^{1)**}

(¹⁾ Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; (²⁾ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract Eukaryotic genome DNA is packaged into condensed chromatin, which creates a natural barrier for functional factors to access to DNA during replication, transcription, repair and recombination. Interactions of these factors with DNA require relaxation of local chromatin structure, and this type of chromatin dynamic alteration is called chromatin remodeling. Increasing evidences have indicated that chromatin remodeling plays key role in DNA damage repair by facilitating the recruitment of DNA damage response proteins to DNA lesions. To investigate the association between chromatin remodeling and DNA repair and its coupling mechanisms, a Lac-repressor and Lac-operator based system was employed. Through this system, the Lac repressor-target gene-EGFP fusion protein can bind to the Lac-operator elements integrated in the genome of AO3_1 cells, and potentially reflects the process of chromatin remodeling after DNA damage. Using this system, it was found that TIP60 strongly promotes the large scale chromatin relaxation, and the p53 inducible gene 3 protein (PIG3) can also promote the large scale chromatin relaxation in the process of cellular response to DNA damage induced by 10 Gy γ -ray irradiation. Taken together, an efficient method was established to screen potential chromatin remodeling proteins associating with DNA damage repair.

Key words chromatin relaxation, chromatin remodeling, DNA damage repair, P53 inducible gene 3, heterochromatin region, fluorescent imaging

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00642

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2007CB914603), The National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar (30825011) and The National Natural Science Foundation of China (81071361).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-68183899, Fax: 86-10-68183899, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

Received: December 8, 2010 Accepted: March 4, 2011