

牛组织中 MBD1 基因表达及其 DNA 甲基化调节

王会敏, 奥旭东, 岳永莉, 高海霞, 于海泉*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: DNA 甲基化是主要的表观遗传调节方式, 在转录水平调节基因的表达, 甲基化 CpG 结合蛋白 MBD1 能够结合甲基化及非甲基化的 DNA, 通过抑制域抑制基因的转录, 在 DNA 甲基化和转录抑制之间起重要作用, 但 DNA 甲基化对 MBD1 自身的调节作用还不清楚。本研究首先利用 RT-PCR 检测成年牛心脏、肾脏、肝脏、睾丸及卵巢 5 种组织中 MBD1 基因 mRNA 的表达; 并根据牛 MBD1 调节区序列, 针对其中的 12 个 CpG 位点设计引物, 利用甲基化 PCR 测序分析方法, 分析该调节区的 DNA 甲基化状态在牛 5 种组织中的变化。结果表明, 在牛的 5 种组织中, MBD1 基因在心脏和肾脏的表达量低于肝脏、睾丸及卵巢, 且差异显著 ($P < 0.05$); DNA 甲基化检测显示, 心脏和肾脏 MBD1 调节区的甲基化比率较肝脏、睾丸及卵巢甲基化低, 说明调控区 DNA 甲基化与 MBD1 基因的组织特异性表达相关。

关键词: MBD1; 组织; DNA 甲基化; mRNA 表达

中图分类号: Q959.8; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2012)05-0725-04

Transcriptional Expression of MBD1 Gene and Its Regulation by DNA Methylation in Bovine Tissues

WANG Hui-min, AO Xu-dong, YUE Yong-li, GAO Hai-xia, YU Hai-quan*

(The Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: DNA methylation is the main epigenetic regulation which regulate gene expression at transcriptional level. Methyl-CpG binding protein MBD1 specially recognized methylated as well as unmethylated DNA through its transcription repression domains to affect gene expression, MBD1 play an important role between DNA methylation and transcriptional repression, but the regulation of DNA methylation on MBD1 gene expression remained unclear. In this study, transcriptional expression of MBD1 was analyzed by RT-PCR in bovine heart, liver, kidney, testis, and ovary. Twelve CpG sites in the regulation region of MBD1 were chosen and their DNA methylation status were checked by bisulfite-sequencing PCR method, the dynamic change of DNA methylation status in the regulatory region of MBD1 were also examined in bovine tissues. Results shows that the transcriptional level of MBD1 gene were lower in heart and kidney than that of the liver, testis and ovary, the differences was significantly ($P < 0.05$); the DNA methylation status of MBD1 regulatory region was also lower in heart and kidney than that of liver, testis and ovary, which suggested that the expression of bovine MBD1 is associated with the DNA methylation of its regulation region.

Key words: MBD1; tissue; DNA methylation; mRNA expression

DNA 甲基化是高等真核生物基因组主要的表观遗传修饰方式, 在基因调节中起着重要作用。研究表明甲基化 DNA 可通过结合特异的转录抑制分子起作用, 其中甲基化 CpG 结合蛋白 MBD(methyl-CpG-binding domain) 家族在 DNA 甲基化介导的基因表达调控中起关键作用 (Joulié *et al.*, 2010)。MBDs 家族包括 MBD1、MBD2、MBD3、MBD4 及

MeCP2 五个成员, 其中 MBD1 具有甲基化结合结构域 MBD(methyl binding domain) 和转录抑制域 TRD(transcription repression domains), MBD 可以和 CpG 结合, 募集组蛋白修饰酶, Ng 等 (2000) 体外实验发现 MBD1 的 TRD 对基因有远距离抑制作用, 当 TRD 缺失时, MBD1 的基因转录抑制作用消失, 且组蛋白脱乙酰酶抑制剂 trichostatin A 可解除 MBD1 的 TRD 对

收稿日期: 2012-05-22 接受日期: 2012-06-14

作者简介: 王会敏 (1982 ~), 女, 硕士研究生, 专业方向: 哺乳动物生殖生物学与生物技术, E-mail: whuimin2005@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, 博士, 研究员, E-mail: haiquan_yu@yahoo.cn

报告基因的抑制。另外,MBD1 在 161~366 位氨基酸区域中存在 2~3 个半胱氨酸富含区,对结合非甲基化的 DNA 并抑制基因表达起作用(Xuekun *et al.*, 2008)。

MBD1 通过不同结构域可与甲基化或特定非甲基化的 CpG 结合,MBD1 与甲基化 DNA 结合主要发生在染色体着丝粒区域(Jorgensen *et al.*, 2004)。Martin 等(2009)通过 MBD1 荧光融合蛋白转染实验发现,MBD1 定位在小鼠异染色质着丝粒主要微卫星区,提示 MBD1 可能通过与低密度甲基化 CpG 结合或与异染色质其它成分结合来调控基因表达。

有研究显示,MBD1 敲除的小鼠是健康可育的,推测其在小鼠的早期胚胎发育阶段不起关键作用,但这些小鼠显示神经系统的发生有所下降,空间学习能力受损(Zhao *et al.*, 2003)。Nancy 等(2008)对牛 MBD1 蛋白定位显示,卵母细胞成熟过程中,MBD1 位于有丝分裂中期,而且在核质均匀分布。直到 8-cell、16-cell 阶段,MBD1 定位于细胞核。在囊胚阶段 MBD1 急剧减少,定位于核周围,提示 MBD1 与母型合子转变有关。目前对 MBD1 基因在牛组织中的甲基化状态的检测及转录水平的表达还有待研究。本实验选择荷斯坦奶牛为研究对象,对 MBD1 基因在荷斯坦奶牛不同组织里的 mRNA 的表达及其调控区的 CpG 位点的甲基化状况进行检测,探讨 MBD1 基因自身的甲基化变化与 MBD1 基因表达的调控机制。

1 材料方法

1.1 组织来源

从 3 头健康的成年荷斯坦奶牛中取新鲜心脏、肾脏、肝脏、睾丸及卵巢组织,切成 1 cm³ 的小块,在灭菌的生理盐水中冲洗三遍,投入液氮中迅速制冷,在 -80℃ 冰箱中长期保存。

1.2 试剂及仪器

基因组 DNA 提取试剂盒、Wizard DNA 纯化试剂盒、pMD19-T 载体、琼脂糖为 Promega 公司产品,凝胶回收试剂盒是 Axygen 公司产品,RNA iso Reagent、PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒、无酶水(DEPC H₂O)、100 bp DNA Marker、rTaq DNA 聚合酶等试剂购自大连宝生物有限公司,Lysozyme、Tris-base、Sucrose 为 Sigma 公司产品,氯仿及异丙醇及其他试剂均为国产试剂。PCR 仪(Biometra, T1 Theimobycler)、水平电泳仪(北京六一仪器厂, DYCP-31A)、凝胶成像仪(Bio-Rad, P91)。

1.3 引物

根据 NCBI 公布的牛的 MBD1 的 mRNA 序列(BC112458.1),设计跨内含子的 RT-PCR 引物,扩增片段为 245 bp。上游引物序列:5'-AAACAAG-GCGTCCTCTGCTA-3',下游引物序列:5'-CGGGT-AC-CATCTCCTGAAAA-3'。同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作内参基因并设计其引物,扩增片段大小为 119 bp。上游引物序列:5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3' 下游引物序列:5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'。GAPDH 为管家基因,几乎在所有的组织中都高水平表达,在同种细胞或者组织中的蛋白质表达量一般是恒定的,且不受部分识别位点的影响而保持恒定,故用作内参基因。同样根据 NCBI 中公布的牛 MBD1 基因的 DNA 序列,设计亚硫酸氢盐测序(bisulfite genomic sequencing BSP)PCR 引物。扩增片段为 464 bp。上游引物序列:ATGTAGAAAAGG-GAAGAGGTAG,下游引物序列:AAGTTGGGTTAG-GAAAGTAT。以上的引物均由 invitrogen 公司合成。

1.4 RT-PCR

提取心脏、肾脏、肝脏、睾丸及卵巢组织的总 RNA,紫外分光光度计测光密度 OD 值(A260/A280)以检测 mRNA 的纯度,检测值在 1.8~2.1 范围时用于下一步实验。根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time 反转录体系提供的说明书进行 cDNA 第一条链的合成。反应体系为:1 μL 反转录液、1 μL 10 × Ex Buffer、1 μL 上下游引物(10 μmol/L)、0.1 μL ExTaq、总反应体系为 10 μL。PCR 反应程序是 94℃ 2 min,94℃ 30 s,58℃ 40 s,72℃ 1 min,72℃ 10 min,35 个循环。并经琼脂糖凝胶电泳后观察。

1.5 亚硫酸盐测序 PCR

此实验中,提取心脏、肾脏、肝脏、睾丸及卵巢组织基因组 DNA 后,分别取 5 μg 的 DNA 进行亚硫酸盐修饰,其修饰过程: EcoR I 酶切、碱变性、硫化与脱氨、纯化与脱硫、沉淀回收 DNA。亚硫酸盐测序法(BSP 法)体系为:亚硫酸盐处理的模板 1.0 μL,5 × Green buffer 2.4 μL,2.5 mol/L dNTP 1.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,Go Taq 0.1 μL,总反应体积 12 μL。PCR 按照如下温度条件进行反应:94℃ 5 min;94℃ 40 s,58℃ 40 s,72℃ 10 min;72℃ 2 min。35 个循环,各组织分别进行 3 次 BSP-PCR。将 PCR 目的片段回收后与 pMD18-T 连

接,重组菌鉴定并测序。

2 结果与分析

2.1 MBD1 在不同组织的表达

根据 RNAiso Reagent 试剂盒操作程序提取各组织 mRNA,并用紫外分光光度计检测 mRNA 纯度(表),各组织的检测结果在允许的 1.8 ~ 2.1 范围内,随后利用 PrimeScript^R RT reagent Kit 进行反转录实验。

表 mRNA 纯度检测

Table OD detection of mRNA

组织	心脏	肾脏	肝脏	睾丸	卵巢
OD 值(A260/A280)	2.05	2.10	1.99	1.94	2.08

分别对荷斯坦奶牛的 5 个组织中的 MBD1 基因 cDNA 进行 RT-PCR 扩增,以 GAPDH 为内参基因, H₂O 为阴性对照。经琼脂糖凝胶电泳检测,大小与预期片段相符(图 1, A),并用 Image J 灰度分析软件分析(图 1, B),结果显示在心脏及肾脏 mRNA 表达量显著低于其他组织($P < 0.05$)。

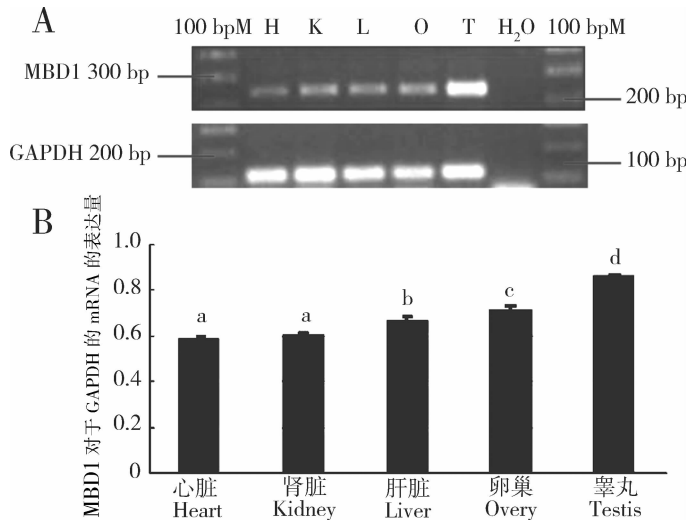


图 1 A. 牛 5 种组织中的 MBD1 基因的表达 H. 心脏, K. 肾脏, L. 肝脏, O. 卵巢, T. 睾丸

B. Image J 分析 mRNA 表达量,不同字母之间表示具有显著性差异

Fig. 1 A. MBD1 gene expression in the bovine tissues H. Heart, K. Kidney, L. Liver, O. Ovary, T. Testis

B. Image J analysis of mRNA expression, different letter indicates a significant difference

2.2 MBD1 基因调节区甲基化变化

基因组 DNA 经亚硫酸盐处理后针对 MBD1 基因调控区设计引物并进行 PCR 反应扩增,产物与预期片段大小相符。测序结果及甲基化程度分析: MBD1 基因在心脏,肾脏甲基化程度较低,分别为 49.17% 和 30%,而肝脏、睾丸及卵巢的甲基化比率分别为 87.50%、81.67%、79.17%,肾脏较心脏、肝脏、睾丸及卵巢有显著性差异($P < 0.05$),而且在甲基化与未甲基化位点的区域亦不同(图 2)。

3 讨论

DNA 甲基化是基因表达的表观遗传调控的一种方式,DNA 甲基化影响基因表达的作用具有种属特异性和组织特异性,并且与生物发育阶段相关。在真核生物中存在着一些 CpG 高频区域,称为 CpG 岛(CpG island),多位于基因的启动子区,启动子区的 CpG 位点高甲基化可以抑制基因转录,导致基因

沉默(Muller *et al.*, 2010)。甲基化模式的建立与维持是由 DNA 甲基化转移酶等修饰酶完成,而 DNA 甲基化对转录的影响也存在多种途径,其中甲基 CpG 结合蛋白家族在其中起重要作用。MBD1 是甲基化 CpG 结合蛋白家族中的一员,可招募并结合特异转录抑制因子,通过干扰转录因子与基因调控区结合或者直接抑制 RNA 聚合酶活性而抑制基因表达(Fatemi & Paul, 2006)。此外 MBD1 甲基化可改变染色质结构,即甲基 CpG 结合蛋白可以通过某些区域的结构间接阻止转录因子与 DNA 结合而抑制基因表达(Santos *et al.*, 2002)。

一般情况下 DNA 甲基化与基因表达呈负相关,本实验中 MBD1 在肾脏中的甲基化程度明显低于其他组织,同时 MBD1 在心脏及肾脏中的 mRNA 的表达明显低于其他组织中的表达量,实验里各组织的甲基化程度和基因的表达并不完全呈负相关。这提示 MBD1 的调节还存在其他机制,例如组蛋白的共

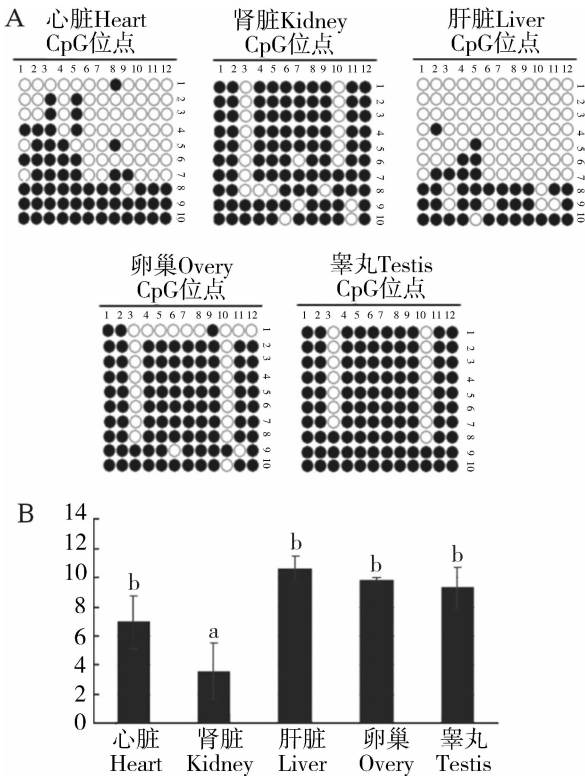


图 2 A. 各组织中 MBD1 调节区 DNA 甲基化状态, B. 测序结果统计 ● 甲基化 CpG, ○ 未甲基化 CpG, 不同字母之间表示具有显著性差异 Fig. 2 A. DNA methylation status of MBD1 regulation region in different tissues, B. Results of BSP sequencing ● Methylated CpG, ○ Unmethylated CpG, Different letter indicates a significant difference

价修饰。组蛋白 N-末端氨基酸残基可发生乙酰化、甲基化等多种共价修饰作用,这种修饰可通过影响组蛋白与 DNA 双链的亲合性,从而改变染色质的疏松或凝集状态,或通过影响其它转录因子与结构基因启动子的亲和性来发挥基因调控作用 (Loizou *et al.*, 2006),有关组蛋白修饰对 MBD1 的表达调节还有待于进一步研究。另外,本研究还发现,不同组织中发生 DNA 甲基化的位点虽有不同,但 ATG 上游-443 bp 及-696 bp 位的 CpG 位点趋向于未甲基化,而其余位点更多处于甲基化状态,即 MBD1 调节区特异 CpG 位点的 DNA 甲基化可能对基因表达起关键作用。Hoppe 等(2000)的研究表明,甲基化位点与转录起始点的相对位置对转录抑制有重要作用,如 Kang (2001) 等研究次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPR1) 基因启动子的 3 个特定 CpG 位点的甲基化对于转录抑制具有重要意义,而启动子其他 CpG 位点的甲基化不会影响基因转录抑制。

本研究比较了不同组织间 MBD1 基因甲基化水平,发现不同组织基因的甲基化具有特异性,这与以前研究者的报道相符 (Sharma *et al.*, 2009)。通过比

较 MBD1 在牛不同组织中的表达情况以及调节区 DNA 甲基化的变化,有助于了解 MBD1 的自身调节及起关键作用的 DNA 甲基化敏感位点,为研究 MBD1 在早期胚胎发育阶段自身的甲基化的变化及其对胚胎发育的相关作用奠定基础。

4 参考文献

Fatemi M, Paul A. 2006. MBD family proteins: reading the epigenetic code [J]. *Journal of Cell Science*, 119: 3033 ~ 3037.

Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, *et al.* 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome dependent processing [J]. *Cell*, 102(5): 577 ~ 586.

Joulié M, Miotto B, Defossez PA. 2010. Mammalian methyl-binding proteins: What might they do? [J]. *Bioessays*, 32: 1025 ~ 1032.

Jorgensen HF, Ben-Porath I, Bird AP. 2004. Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains [J]. *Mol Cell Biol*, 24(8): 3387 ~ 3395.

Kang MS, Lim BK, Seong IS, *et al.* 2001. The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal serine protease [J]. *EMBO J*, 20(4): 734 ~ 742.

Loizou JI, Murr R, Finkbeiner MG, *et al.* 2006. Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair [J]. *Cell Cycle*, 5: 696 ~ 701.

Muller I, Wischniewski F, Pantel K, *et al.* 2010. Promoter and cell specific epigenetic regulation of CD44, Cyclin D2, GLIPR1 and PTEN by Methyl-CpG binding proteins and histone modifications [J]. *BMC Cancer*, 10: 297.

Martin Caballero I, Hansen J, Leaford D, *et al.* 2009. The methyl-CpG binding proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation [J]. *PLoS One*, 4(1): 4315.

Nancy T, Jun Xue, Kateina J, *et al.* 2008. Dynamic changes in the localization of five members of the methyl binding domain (MBD) gene family during murine and bovine preimplantation embryo development [J]. *Molecular reproduction and development*, 75: 48 ~ 59.

Ng HH, Jeppesen P, Bird A. 2000. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2(4): 1394 ~ 1406.

Santos F, Hendrich B, Reik W, *et al.* 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo [J]. *Developmental Biology*, 241: 172 ~ 182.

Sharma R, Mohan Singh RK, Malik G, *et al.* 2009. Rice cytosine DNA methyltransferases-gene expression profiling during reproductive development and abiotic stress [J]. *FEBS*, 276: 6301 ~ 6311.

Xuekun Li, Basam Z, Barkho, *et al.* 2008. Epigenetic regulation of the stem cell mitogen Fgf-2 by Mbd1 in adult neural stem/progenitor cells [J]. *The Journal Biological Chemistry*, 283(41): 27644 ~ 27652.

Zhao X, Ueba T, Christie BR. 2003. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 6777 ~ 6782.