

学校编码: 10384
学号: 22420070153561

密级_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

沿海受污水产品 QDMP 快速检测分析
与评价研究

The Detection Analysis and Evaluation Research of QDMP
method for coastal polluted aquatic products

江 艳

指导教师姓名: 苏永全 教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2011 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

2011年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

缩略语中英文对照表.....	V
中文摘要.....	VI
英文摘要.....	VIII
第一章 绪论	1
1.1 DNA 甲基化及其表观遗传毒性的生物学意义.....	1
1.1.1 DNA 甲基化是污染物产生健康损害的重要途径.....	1
1.1.2 真核生物基因启动子区 DNA 甲基化与下游基因表达密切相关.....	4
1.2 沿海受污水产品污染毒性的评价方法及其应用.....	10
1.3 本研究目的、意义与技术路线.....	21
1.3.1 目的与意义.....	21
1.3.2 技术路线.....	25
第二章 去甲基化表观遗传毒性 QDMP 的快速检测分析与研究	26
2.1 高甲基化 pEGFP-C3 质粒的制备及鉴定.....	26
2.1.1 材料.....	26
2.1.2 实验方法.....	27
2.1.3 结果.....	33
2.1.4 讨论.....	36
2.2 去甲基化表观遗传毒性 QDMP 的快速检测分析与研究.....	39
2.2.1 材料.....	39
2.2.2 方法.....	40
2.2.3 结果.....	54
2.2.4 讨论.....	67
第三章 沿海受污水产品的 QDMP 的快速检测分析与评价	70
3.1 沿海受污水产品的毒性测试.....	70
3.1.1 材料.....	70
3.1.2 方法.....	71
3.1.3 结果.....	77
3.1.4 讨论.....	77
3.2 沿海受污水产品的 QDMP 快速检测分析与评价.....	80
3.2.1 材料.....	80

3.2.2 方法	80
3.2.3 结果	80
3.2.4 讨论	86
结 语	88
参考文献	91
在学期间发表的论文及成果	104
致 谢	106
附 件	107

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of CONTENTS

Lists of abbreviation	V
Abstract in Chinese	VI
Abstract in English.....	VIII
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 The biological significance of DNA methylation and epigenetic toxicity ·1	
1.2 Pollution of coastal aquatic toxicity evaluation method and its application	10
1.3 Protocol, purpose and significance of research	21
Chapter 2 The Detection Analysis and Research of QDMP method for Demethylation Epigenetic Toxicity	26
2.1 Hypermethylation pEGFP-C3 plasmid preparation and identification	26
2.1.1 Materials	26
2.1.2 Methods.....	27
2.1.3 Results.....	33
2.1.4 Discussion	36
2.2 The Detection Analysis and Research of QDMP method for Demethylation Epigenetic Toxicity Assessment based on EGFP	39
2.2.1 Materials.....	39
2.2.2 Methods.....	40
2.2.3 Results	54
2.2.4 Discussion	67
Chapter 3 The Detection Analysis and evaluation of QDMP for pollution coastal aquatic products	70
3.1 Pollution coastal aquatic toxicity testing.....	70

3.1.1 Materials	70
3.1.2 Methods	71
3.1.3 Results	77
3.1.4 Discussion	77
3.2 The Detection Analysis and evaluation of QDMP for pollution coastal aquatic products	80
3.2.1 Materials	80
3.2.2 Methods	81
3.2.3 Results	81
3.2.4 Discussion	86
Summary	88
References	91
Papers published	105
Acknowledgements	106
Appendix	107

缩略语中英文对照表

缩写	英文	中文
AA	Amino acid	氨基酸
QDMP	Quantification of demethylation potential	去甲基化能力定量评价方法
CpG	The cytosine and guanine dinucleotide	CG 二核苷酸
CpGs	CpG islands	CpG 岛
SAM	S-adenosylmethionine	S 腺苷蛋氨酸
DNMT	DNA methyltransferase	DNA 甲基转移酶
HEC	Human Epigenome Consortium	人类表观遗传学联盟
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
MSP	Methylation-specific primers	甲基化特异性引物
EGFP	Enhance Green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine,5-aza-dc	5-氮杂-2'-脱氧胞苷
HepG-2	Human hepatocellular liver carcinoma cell line	人肝癌细胞系
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	BLAST 序列搜索
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
RE	Restriction endonuclease	限制性核酸内切酶
MSREs	Methylation-sensitive restriction endonucleases	甲基化敏感的限制性内切酶
FDA	U.S. Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
MSO	Methylation-specific oligonucleotide microarray	甲基化寡核苷酸微阵列技术
5-mC	5-methylated cytosine	5-甲基胞嘧啶
RT	Reverse transcription	反转录
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TAE	Tris-acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液

摘要

构建了高甲基化pEGFP-C3质粒的重组真核表达载体和创立污染物去甲基化表观遗传毒性的快速检测方法,以该方法对天津沿海受污水产品的表观遗传毒性进行检测分析与评价。

pEGFP-C3质粒经过大肠杆菌扩增后大量提取pEGFP-C3质粒;对pEGFP-C3质粒进行双酶切,胶回收目的双酶切短片段;并对其中EGFP基因启动子区DNA片段实施定向甲基化处理。随后将其与双酶切长片段回复连接成环,胶回收重组质粒,双酶切验证重组质粒的高甲基化状态。

将甲基化处理重组pEGFP-C3质粒转染进HepG-2细胞,以5-aza-dC为阳性去甲基化毒物与转染细胞共培养,通过亚硫酸氢钠测序法定量检测EGFP基因启动子区甲基化状态,通过实时定量PCR定量检测EGFP基因表达,借助流式细胞术和荧光定量摄片定量检测共培养细胞的绿色荧光强度,在DNA甲基化、EGFP基因mRNA表达、EGFP蛋白等多个层次研究5-aza-dC染毒处理与其去甲基化能力的响应关系。

双酶切和亚硫酸氢钠测序结果等表明:pEGFP-C3质粒EGFP基因启动子区处于高甲基化状态。当5-aza-dC的染毒梯度为0.00016, 0.00080, 0.00400, 0.02000, 0.10000 $\mu\text{mol/L}$ 时,其染毒量与基因启动子区甲基化水平,EGFP基因mRNA表达、EGFP蛋白荧光强度均呈现良好的线性关系。C3质粒EGFP基因启动子区甲基化水平与5-aza-dC处理浓度存在线性相关,线性方程为 $y = -0.1962x + 0.856$; $R^2 = 0.800$ 。EGFP表达相对量和5-aza-dC剂量梯度成良好的剂量效应关系, $y = 37.022x + 0.3087$; $R^2 = 0.9821$ 。细胞EGFP荧光强度均数与5-aza-dC存在良好的剂量效应线性关系,线性方程为 $y = 10.402x + 6.0334$; $R^2 = 0.829$ 。

利用构建的高甲基化的绿色荧光蛋白的HepG-2细胞株报道基因载体,对天津沿海受污水产品的表观遗传毒性实施检测分析与评价。水产样品经过统一处理后,以其重金属提取物为测试样品,去甲基化能力以5-aza-dC当量表示。检测结果显示,低至0.00080 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的5-aza-dC,其去甲基化能力也可以被定量检测。EGFP产物的荧光通过显微镜检测。在添加了0.02000 $\mu\text{mol/L}$ 或者更高

剂量的 5-aza-dC，也能观察到 EGFP 基因启动子区的去甲基化的表达。发现 9 种水产的去甲基化能力较强，范围介于 0.00640-0.03870 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 当量之间，占总体 19 种受试样品的 47 %。

成功构建了高甲基化的绿色荧光蛋白的报告基因载体，并且其在真核细胞内的绿色荧光蛋白基因表达与阳性受试去甲基化污染物存在比较灵敏的响应关系。成功创立了污染物去甲基化表观遗传毒性评价方法。实际检测结果显示，天津沿海受污水产品重金属污染较为严重，去甲基化表观遗传毒性较强，尤以贝类最为显著。提示我国环境水体污染对水产品的质量构成了严重影响，污染水产品的安全性值得重视。

关键词： 去甲基化； 表观遗传毒性； 评价载体； EGFP； 沿海受污水产品

Abstract

It was studied that a novel quantification method for demethylation epigenetic toxicity of pollutants based on construction of hyper-methylated pEGFP-C3 plasmid eukaryotic expression vector and applied to evaluate the epigenetic toxicity of aquatic from polluted coastal in Tianjin, China.

pEGFP-C3 plasmid was extracted and purified after *E. coli* amplified intensively; and then was double digested with restriction enzyme digestion for 3.0 kb long DNA strand and 1.7 kb short DNA strand, which be collected and purified with agarose gel electrophoresis. The EGFP gene promoter within the short DNA strand were methylated completely with Mss.I, and then ligated to the long DNA strand for whole circular pEGFP-C3 plasmid, which be gel purified for full-methylation status verification. The methylated pEGFP-C3 plasmid were transfected into HepG-2 cells and incubated with 5-aza-dC at series of concentrations for 30 h.

Sodium bisulfite sequencing assay were carried out for quantification of methylation status of EGFP gene promoter, quantitative real-time quantitative PCR were used for quantification of EGFP gene expression, quantitative flow cytometry and fluorescence photographs of cultured cells were resorted for quantitative detection of green fluorescence intensity. The dose-response relationship between 5-aza-dC exposure and its ability to demethylation at different levels, EGFP gene mRNA expression, and EGFP protein were explored. Restriction enzymes co-digestion analysis and bisulfite sequencing results showed that the methylation status of pEGFP-C3 gene promoter is high. The tests of DNA methylation, EGFP gene mRNA expression, EGFP gene expression were conducted successfully after artificial treated pEGFP-C3 plasmid transfected into HepG-2 hepatoma cells successfully.

Good linear relationships were observed between 5-aza-dC exposure and gene promoter methylation status, EGFP mRNA gene expression, EGFP protein fluorescence intensity while 5-aza-dC exposure gradient of 0.00016, 0.0008, 0.004, 0.02, 0.1 μM , respectively. The linear relationship for EGFP gene promoter methylation and 5-aza-dC is $y = -0.1962x + 0.856$; $R^2 = 0.800$. The linear relationship for relative EGFP expression volume and 5-aza-dC dose is $y = 37.022x + 0.3087$; $R^2 = 0.9821$. The linear relationship for EGFP mean fluorescence intensity of cells and 5-aza-dC is $y = 10.402x + 6.0334$; $R^2 = 0.829$.

The epigenetic toxicity of major polluted aquatics from marine in Tianjin is evaluated based on the HepG-2 cell line reporter gene vector above. The heavy metal extract of aquatic samples are prepared first uniformly, and then to be co-cultured with the test system. The demethylation potential of them is marked with the corresponding equivalent of 5-aza-dC. EGFP fluorescence can be quantitated with microscopy. Test results indicate that the demethylation ability of 5-aza-dC with dose between 0.00080 $\mu\text{mol/L}$ and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ can be quantitatively detected successfully. 9 of the total 19 aquatic samples show relatively strong demethylation ability and the amount of them are among 0.00640-0.03870 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC equivalent which accounted for 47 % of the samples tested in overall 19 species.

A green fluorescent protein reporter gene vector with hyper-methylated CMV promoter is constructed successfully and the relatively sensitive response relationship between the green fluorescent protein gene expression of it and the doses of 5-aza-dC is observed. A novel method for quantification of demethylation ability of pollutants is established. Actual test results show that there is serious heavy metal contamination of seafood, especially shellfish, from Tianjin coastal and therefore have obvious demethylation epigenetic toxicity. Environment water pollution poses a serious impact on the quality of aquatic, and the safety of polluted aquatic can not be overseen.

Key words: *Demethylation; Eigenetic toxicity; Cellar Test System; EGFP; Pollution coastal Aquaculic products*

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

多年来人们都很关注经典的遗传物质损伤，主要是基因结构改变(如突变、缺失、倒位、插入、易位及扩增等)及染色体数目的变化等，但是近年来，另一种与稳态失衡和各种疾病密切相关的机制-表观遗传机制(epigenetic mechanism)受到人们的高度关注^[1]。表观遗传学不涉及 DNA 序列的改变，主要研究基因表达的变化，这种变化可以通过减数/有丝分裂遗传，并导致基因表达异常。DNA 甲基化是表观遗传学中研究最为深入的形式之一，具有多方面的生物学意义，DNA 甲基化与胚胎正常发育、雌性个体 X 染色体失活、基因表达调控、寄生 DNA 序列的抑制、印迹基因及基因组的结构稳定等密切相关^[2]。近几年来，特别是在 DNA 甲基转移酶、DNA 甲基化机制、甲基化转录抑制机理、甲基化与肿瘤的关系及检测方法研究等方面取得了一些进展，DNA 甲基化研究正成为肿瘤研究中的重要的前沿领域之一。

1.1 DNA 甲基化及表观遗传毒性的生物学意义

1.1.1 DNA 甲基化是污染物产生健康损害的重要途径

1.1.1.1 表观遗传学

表观遗传学(epigenetics)不涉及 DNA 序列的变化，与遗传学是一个对应的关系。是研究可遗传的基因表达的改变，研究如何通过抑制、激活某些基因的表达有选择地利用基因组的信息。表观遗传修饰(epigenetic modification)对肿瘤的发生、诊断和治疗的意义很大。与人类疾病相关的表观遗传学过程包括：DNA 甲基化、组蛋白修饰和基因印记。以 DNA 甲基化为代表的表观遗传修饰是研究较为深入的一种。包括人类的所有脊椎动物，其基因组 DNA 除了包含常见的 4 种脱氧核苷酸外，还可以检测到第五种脱氧核苷酸，即 5-甲基胞嘧啶脱氧核苷酸(5-mC)，它是在 DNA 复制后由 DNA 甲基转移酶(或称甲基化酶)催化，以 S-腺苷甲硫氨酸为供体，将甲基转移到 5'-CG-3' 序列的胞嘧啶环 5 位 C 上而形成的(如

图 1.1 所示), 甲基化是哺乳动物基因组中最常见的一种 DNA 结构修饰^[3]。

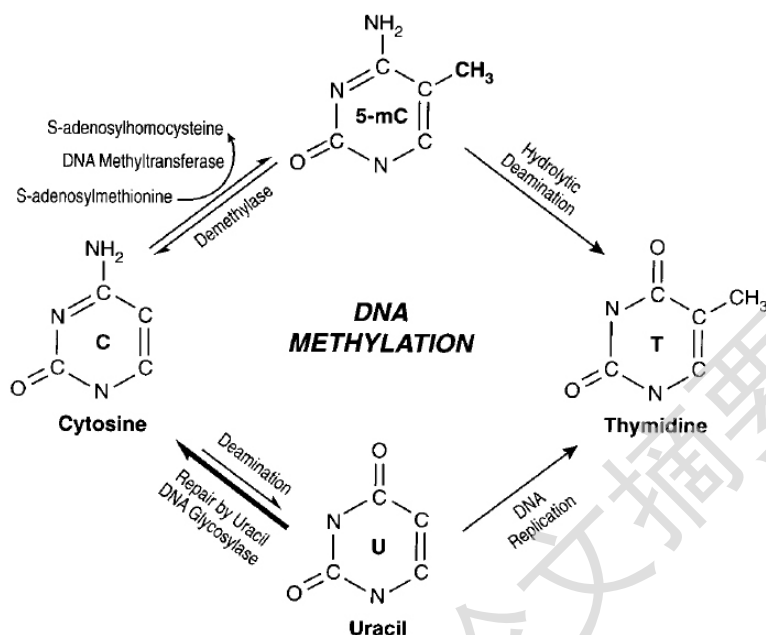


图 1.1 胞嘧啶甲基化, 去甲基化的生化途径与胞嘧啶和 5 - mC 的诱变示意图

Fig. 1.1 Schematic representation of the biochemical pathways for cytosine methylation, demethylation, and mutagenesis of cytosine and 5-mC

1.1.1.2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是最早发现的一种基因修饰方式, 可能存在于所有高等生物中。DNA 甲基化可以关闭某些基因的活性, 去甲基化则能诱导基因的重新活化和表达。DNA 甲基化是重要的遗传外修饰之一, 是表观遗传学(epigenetics)的重要组成部分^[4]。DNA 甲基化参与了动物胚胎发育、基因印迹和 X 染色体失活等过程, 在基因表达调控中具有重要的作用, 异常甲基化能够导致肿瘤的形成^[5]。DNA 甲基化可以随着外界环境因素的变化而改变。近 20 年来, DNA 甲基化的研究逐渐成为新的研究热点。随着对甲基化研究的不断深入, 各种甲基化检测方法被开发以满足不同类型研究的要求。因此, 探索甲基化形成与改变的可能机制, 建立操作简单, 准确性高, 灵敏度高的 DNA 甲基化检测方法, 对探讨甲基化调控规律, 提高哺乳动物体细胞核的移植效率、揭示杂种优势的表观遗传学基础意义重大^[6]。DNA 甲基化在发育和分化中调控基因的表达, 同 DNA 甲基化与基因表达呈负相关, 在启动子区的低甲基化与转录活性正相关(非启动子区甲基化例

外)。基因 CpG 岛的甲基化能干扰一些转录因子与基因调控区的结合，DNA 甲基化还可能直接抑制 RNA 聚合酶活性而抑制基因的表达。同时，甲基化的 DNA 可与特异蛋白结合及通过 DNA 甲基化改变染色质结构等，从而间接的阻碍转录因子与 DNA 结合而抑制转录。目前已证实 DNA 甲基化与组蛋白去乙酰化呈正相关^[7]，而乙酰化是调控基因表达的另一种重要的方式。

CGI 甲基化和组蛋白的乙酰化这两种机制通过联系甲基化 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)共同发挥作用^[8]。MeCP2 特异性地与甲基化的 DNA 相互作用，紧密结合染色体，其转录抑制区(TRD)与包括转录抑制因子和组蛋白去乙酰化酶在内的抑制复合物有关，能在体内调控基因表达。另外也有研究表明^[9]，哺乳动物的 DNA 甲基转移酶和组蛋白甲基化转移酶 Suv39h 有相互作用。

DNA 甲基化状态改变是致癌作用的关键因素之一。是一种肿瘤抑制基因的失活方式，通过基因机制和基因外机制致使细胞增殖和分化的相关基因表达异常，造成细胞失去控制而发生恶变形成肿瘤^[10]。与正常细胞相比，肿瘤细胞的甲基化模式发生了改变。表现在整个基因组的低甲基化，同时伴随着某些区域(CpG 岛)的过甲基化。

传统的由多步骤多途径的基因突变引起肿瘤的观念日益受到挑战。传统的肿瘤二次打击理论告诉我们基因改变是肿瘤发生发展中的始动因素，但是这种观点现在正受到质疑。约翰霍普金斯大学的研究者认为，肿瘤的最早的发生可能源自于干细胞阶段的表观遗传学改变(epigenetic alterations)。目前观点更倾向于表观遗传上的改变比基因改变来的更早^[11]。

DNA 甲基化的模式

DNA 甲基化反应可以分成两种类型(如图 1.2 所示)，一种是从头甲基化。另一种是保留或维持甲基化^[12]。只一条链甲基化的双螺旋 DNA 也称作半甲基化 DNA，是甲基化 DNA 半保留复制后的新产物。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库