

文章编号 :1001-5914(2010)05-0396-04

pEGFP 基因启动子区甲基化的梯度降落 PCR 定量检测法

江艳^{1,2}, 王先良², 王春晖³, 王小利⁴, 杨怡姝⁴, 段小丽², 聂静², 王菲菲², 张金良²

摘要:目的 改进亚硫酸氢钠测序法,并在 CMV 基因启动子甲基化检测中进行验证。方法 提取 pEGFP-C3 质粒重组人肝癌细胞株 HepG2 DNA,亚硫酸氢钠化学修饰,针对修饰后质粒基因 CMV 启动子序列设计特异引物并结合梯度降落 PCR 扩增、T-A 载体克隆、测序,目标区域甲基化定量。结果 pEGFP-C3 质粒基因约 600 bp 的 CMV 启动子区甲基化水平可以精确定量,检测结果与标准品一致,重复测量结果稳定。结论 改进后亚硫酸氢钠测序法能明显减少非特异性扩增,提高 PCR 效率,更适于基因甲基化状态的检测。

关键词: 基因;亚硫酸氢钠测序法;甲基化;梯度降落 PCR;CMV 启动子;pEGFP-C3

中图分类号 R994.6

文献标识码 A

Quantification of Methylation at CMV Promoter of pEGFP-C3 Vector by Gradient Touch-Down PCR Sequencing
JIANG Yan, WANG Xian-liang, WANG Chun-hui, et al. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

Corresponding author: WANG Xian-liang, E-mail:xlwang@craes.org.cn

Abstract Objective To improve the sodium bisulfite sequencing method and validate it in quantification of methylation in CMV promoter. **Methods** DNA was extracted from recombinant HepG2 hepatoma cell line with plasmid pEGFP-C3, and chemically modified with sodium bisulfite, the gene-specific primers were designed according to the modified CMV promoter sequence and conducted PCR amplification with gradient touch-down PCR, then the DNA methylation level in the target areas was quantitated after T-A cloning and sequencing. **Results** The DNA methylation level of the 600 bp CMV promoter within pEGFP-C3 plasmid could be quantified accurately, and be consistent with that of the methylated DNA standards, repeated measurements indicated stable quantification result with this method. **Conclusion** The improved sodium bisulfite sequencing method can reduce non-specific amplification significantly and improve PCR efficiency, therefore has more potential for quantitative detection of gene methylation status.

Key words: Gene; Bisulfite sequencing; Methylation; Gradient landing PCR; CMV promoter; pEGFP-C3

检测异常的 DNA 甲基化位点是当前肿瘤标志物研究的热点之一。真核细胞基因启动子区 DNA 甲基化的定量检测是表观遗传学研究的主要技术困难之一,具体位点的甲基化定量检测成功与否,往往受到目的基因启动子区上下游序列特异性的严重影响。亚硫酸氢钠测序法(bisulfite sequencing)^[1]是一种非常敏感的方法,能够准确检测整条 DNA 序列的 CpG 位点的甲基化状态,但常因 PCR 扩增效率低等缺点给检测带来一定困难;由于普通 PCR 扩增难以摸索最佳扩增条件,导致 PCR 产物不纯或者扩增失败,致使无法使用亚硫酸氢钠测序法对多数基因启动子区的甲基化水平实施成功的定量检测。增强型 EGFP 质粒 pEGFP-C3(以下简称为 C3 质粒)主要用于蛋白质表达的标记与示踪,目前常用于目标融合蛋白的表达研究,应用非常广泛。在借助商品化的 pEGFP-C3 质粒构建去甲基化表观遗传毒物的快速筛选系统的研究中,笔者通过特殊的引物设计,辅以梯度降落 PCR 的条件摸索^[2],借助亚硫酸氢钠测序法成功实现了对 C3 质粒 EGFP 基因启动子区甲基化的定量检测。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20907047),中央级公益性科研院所基本科研业务专项(2008KYYW05)

作者单位 1.厦门大学海洋与环境学院(福建厦门 361005) 2.中国环境科学研究院环境污染与健康研究室(北京 100012) 3.安徽医科大学公共卫生学院(安徽合肥 230032) 4.北京工业大学生命科学院(北京 100022)

作者简介 江艳(1976-),女,博士研究生,主要从事污染物的健康损害及其风险控制研究。

通讯作者 王先良, E-mail:xlwang@craes.org.cn

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

CO₂ 培养箱(SHEL2LAB,美国 Forma 公司),PX2 型 PCR 扩增仪(美国 Thermo 公司),凝胶成像分析系统(法国 Vilber Louram 公司),J-3010 型紫外分光光度计(日本 HITACHI 公司)等。

Wizard DNA 纯化试剂盒和真核表达载体 pGEM2T (Promega 公司),亚硫酸氢钠(优级纯 Sigma 公司),Taq DNA 聚合酶(TAKARA 公司),500~7500 bp DNA Marker(北京天根公司),引物(上海生物公司 PAGE 纯化)。

1.2 C3 质粒甲基化标准品研制及真核细胞转染

1.2.1 pEGFP-C3 质粒 DNA 提取 在不含抗生素的 LB 固态培养基平皿上划线接种 *E.coli* DH5 α 冻存菌,于 37℃ 温箱中培养 12~16 h。菌落长出后,平皿保存在 4℃,挑单菌落至 3 ml LB 培养基的试管内,35℃,180 r/min 振荡 12~16 h(过夜)。取 1 ml 菌液,加到含 100 ml LB 液体培养基的三角烧瓶中,35℃,180 r/min 振荡 2~4 h,对光观察,液体呈云雾状即可。将 100 ml 菌液于冰上放置 10 min,4℃,4 000 \times g 离心 10 min。尽弃上清用 1/10 体积预冷的 CaCl₂(0.1 mol/L)溶液重悬沉淀,冰浴 20 min,再次 4℃,4 000 \times g 的条件下离心 10 min。弃上清,倒置 1 min,加 3.4 ml 预冷 CaCl₂ 溶液重悬,再加 600 μ l 预冷的无菌甘油,混匀(总体积 4 ml)。Ep 管每管分装 100 μ l 感受态细胞,-80℃ 保存。

取-80℃ 的感受态细胞,冰上融化;将干粉状态的质粒离心,加 20 μ l 超纯水溶解,振荡,离心。稀释 10 倍,取 5 μ l,加到含有 50 μ l 感受态细胞的 Ep 管中,混合,冰浴 30 min,42℃ 水浴

90 s 后立即放置冰上 1~2 min。每管加入 600 μl LB 培养基, 37 °C 振荡培养 0.5~1 h。在此期间细菌恢复, 并开始表达对抗生素的抗性。取 50 μl 已转化的感受态细胞, 涂布到含有相应抗生素的 LB 固体培养基上, 倒置平板, 37 °C 培养 12~16 h(过夜)。次日, 挑取菌落在 37 °C 振荡培养 12~16 h(过夜)。过夜培养的菌液用 QIAGEN Plasmid purification 试剂盒进行质粒的大量提取。

1.2.2 pEGFP-C2 质粒的细胞外人工甲基化修饰 参照 Gonzalzo 等^[4]使用的方法用甲基化酶 M.SssI 处理质粒 DNA。HpaI 酶切检测甲基化修饰处理效果, 未甲基化 DNA 双链的去除和甲基化 DNA 的纯化按照文献[4]进行。

1.2.3 pEGFP-C3 质粒 EGFP 基因启动子区高甲基化状态的检测与确认 参照 Herman 等^[5]的方法进行甲基化 pEGFP-C3 质粒 DNA 亚硫酸氢钠处理和 MSP 分析。

1.2.4 高甲基化 C3 质粒真核细胞转染 转染试剂混合物配置(100 μl): 取 2 μg 甲基化 C3 质粒到 100 μl 的 optim-Mem 培养基中, 混匀。加入 Eugene HD 转染试剂 7 μl, 直接加入液体中, 不要挨管壁, 轻轻混匀(勿用吸头反复吹打), 室温放置 15~20 min, 逐滴加入 2 ml 平板培养基中, 缓慢混匀, 放入培养箱。

1.3 真核细胞甲基化 C3 质粒提取及亚硫酸氢钠处理

按照 ZYMORESEARCH DNA 甲基化试剂盒标准操作处理重组质粒。CT 转化试剂的制备: 添加 900 μl 无菌超纯水、50 μl 的 M-溶解缓冲液和 300 μl 的 M 型稀释缓冲液到 CT 转化试剂中。在室温下溶解并且振荡 10 min 或在摇床上摇动 10 min。使用之前室温(20~30 °C)下避光保存。M 型洗脱缓冲液的制备: 添加 24 ml 100%的乙醇到 M 型洗脱缓冲液中来制备最终可以使用的 M 型洗脱缓冲液。

具体实验步骤如下, 在 PCR 管中添加 130 μl 的 CT 转化试剂到每 20 μl DNA 样品中, 将样品管放到循环变温器, 并按以下步骤操作: 98 °C 放置 10 min, 64 °C 放置 2.5 h, 4 °C 下存储(最多 20 h), 添加 600 μl 的 M 型结合缓冲液到 Zymo-SpinIC™ 型柱中, 并将柱放入试剂盒所提供的收集管中, 将 PCR 产物样品移置含有 M 型结合缓冲液的 Zymo-SpinIC™ 型柱中, 盖上盖将柱颠倒数次来混合样品, 全速(>10 000×g)离心 30 s, 去除滤出液, 添加 100 μl 的 M 型洗脱缓冲液到柱中, 全速离心 30 s, 添加 200 μl 的 M 型脱硫缓冲液到柱中并且在室温(20~30 °C)下放置 15~20 min, 孵育后, 全速离心 30 s, 添加 200 μl 的 M 型洗脱缓冲液到柱中, 全速离心 30 s, 再添加 200 μl 的 M 型洗脱缓冲液到柱中, 全速离心 30 s, 直接添加 10 μl 的 M 型洗提缓冲液到柱基质中, 将柱放置在 1.5 ml 的管中, 全速离心 30 s 来洗脱 DNA, DNA 可立刻进行分析或储存在-20 °C 下以备以后使用。

亚硫酸氢钠处理方法同 1.2.3。

1.4 EGFP 基因 CMV 启动子区序列扩增

1.4.1 PCR 引物设计 采用 methyl_primer_express_software_v1.0 软件, 设计完全修饰后的 pEGFP-C3 质粒 EGFP 基因 CMV 启动子区的特异性扩增引物, 序列为: 正向 5'-TAATGGGAGT TTGTTTTGGTATT-3', 反向 5'-TTATACTCCAACCTATACCCCAA AA-3', 引物的特点见表 1。

表 1 C3 质粒 EGFP 基因 CMV 启动子亚硫酸氢钠测序 PCR 扩增引物

引物	长度(nt)	变性温度(°C)	质粒起始位点(bp)	CpG 位点
正向	23	59.75	447~470	0
反向	25	59.93	1 022~1 047	0

1.4.2 梯度降落 PCR 条件摸索 按照 1.4.1 所设计的引物, 采用降落 PCR 退火(温度分别为 56.3、56.8、57.6、58.6、59.8、61.0、62.2、63.5、64.4、64.8 °C), 扩增产物长度为 599 bp。采用 50 μl 反应体系, 修饰后 DNA 溶液 2.0 μl, 10×缓冲液[50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.3)、1.5 mmol/L MgCl₂] 5.0 μl, dNTP(10 mmol/L) 1.0 μl, 引物 10 pmol/μl 各 2.5 μl, Taq DNA 聚合酶(400 U/μl) 0.5 μl。表面用 20 μl 石蜡油覆盖。常规法循环条件为: 盖温 104 °C, 变性 94 °C 50 s, 退火 58 °C 60 s, 延伸 72 °C 50 s, 72 °C 5 min, 循环 40 次。退火 56 °C 60 s, 延伸 72 °C 50 s, 72 °C 5 min, 循环 40 次。产物均采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察、拍照。

1.5 PCR 产物 T 克隆及测序^[6]

1.5.1 TA 载体连接 短暂离心 pGEM® -T 载体及 DNA 插入对照管, 使内容物汇集到管底。按以下方法建立连接反应。用移液器吹打连接反应使之混匀后, 4 °C 孵育过夜。反应体系见表 2。

表 2 TA 载体连接反应体系

反应体系	目标管(μl)	阳性对照(μl)	阴性对照(μl)
2×缓冲液	5	5	5
pGEM® -T 载体	1	1	1
DNA 产物	*	-	-
DNA 参照	-	2	-
T4 DNA 连接酶(3U/μl)	1	1	1
超纯水	*	1	3
合计	10	10	10

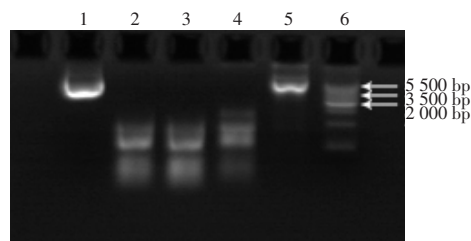
注: * 视实际情况而定。

1.5.2 目的基因的克隆和筛选 用大肠埃希菌菌株 DH5α 制备感受态细菌, 纯化回收 PCR 产物后与 pGEM2T 载体连接、转化进感受态细菌中, 蓝白斑筛选, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察、拍照。做 PCR 扩增筛选阳性克隆, 选取分子量为部分载体及目的 DNA 分子量之和的菌体, 37 °C 恒温振荡培养后, 取菌液送北京华大基因生物技术公司采用通用引物 T7 和 SP6 测序。

2 结果

2.1 DNA 甲基化处理效果

未甲基化处理的质粒分别经 HpaI 和 MspI 酶切后电泳呈现“涂抹”现象, 经过甲基化处理的质粒经 MspI 酶切后电泳呈“涂抹”现象, 而经 HpaI 酶切后与未经酶切的 DNA 一样均呈单一条带, 提示经甲基化处理的质粒处于甲基化状态。HpaI 和 MspI 酶切效果比对。甲基化处理完全。见图 1。



1—阴性对照 2—未甲基化的质粒被 HpaI 处理的扩增产物 3—未甲基化的质粒被 MspI 处理的扩增产物 4—甲基化的质粒被 HpaI 处理的扩增产物 5—甲基化的质粒被 MspI 处理的扩增产物 6—marker

图 1 DNA 甲基化处理效果双酶切检测

2.2 甲基化特异性 PCR 产物凝胶电泳

在梯度退火温度范围内(56.3~64.8 °C),所设计引物对 C3 质粒 EGFP 基因序列具有良好的扩增效果。凝胶电泳显示,最优退火温度为 61.0~64.4 °C 之间,条带最亮(599 bp),杂带最少,见图 2。建议实际退火温度为 61.0 °C,条带单一,无明显杂带,提示所设计降落 PCR 程序可以对目的亚硫酸氢钠处理目的片段进行有效扩增。

2.3 甲基化 PCR 产物 T 克隆及测序结果

测序结果与 GenBank 数据库 C3 质粒 EGFP 基因 CpG 岛 DNA 序列比对,目的片段无突变,CpG 的胞嘧啶均未被亚硫酸氢钠修饰,仍按胞嘧啶扩增,表明 HepG2 细胞株 C3 质粒 EGFP 基因启动子 CpG 岛高甲基化。代表性测序图和部分甲基化测序图谱见图 3,表明构建质粒甲基化效果较好,质粒 EGFP 基因启动子区经过甲基化处理有 90.4% 的 CG 位点被甲基化,定量地表述了 EGFP 基因启动子区的高甲基化状态。

2.4 甲基化标准样品的定量及重复测定

对已知甲基化水平的 C3 质粒样品(90%)进行 3 次重复测定,重复定量结果为 81.4%,与已知 DNA 甲基化水平一致。

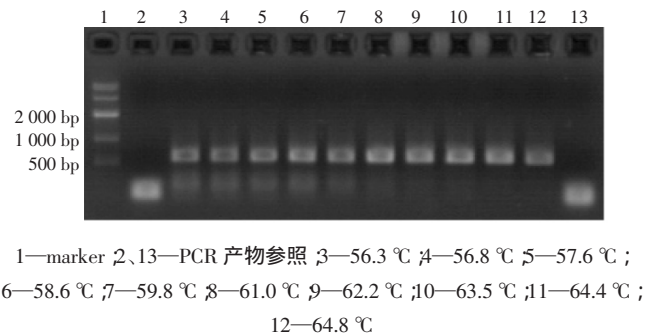
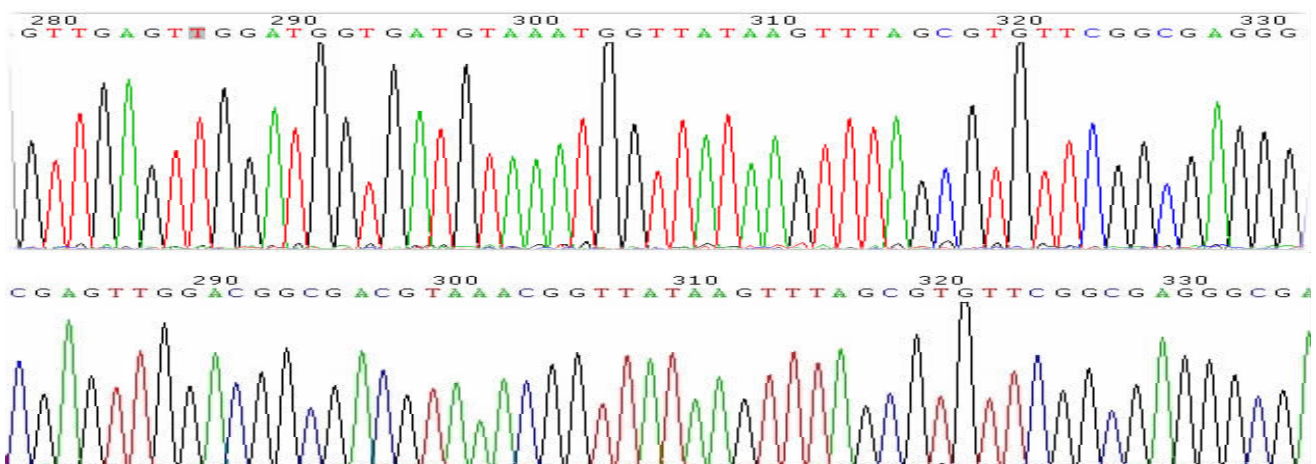


图 2 亚硫酸氢钠处理 C3 质粒目的片段扩增效果



注:在测序图中的 9 个目标 CG 位点中,上图显示有 3 个位点来自甲基化位点,6 个位点来自未甲基化位点;下图显示 9 个位点全部处于甲基化状态。

图 3 代表性的亚硫酸氢钠处理组和未处理组测序结果

3 讨论

检测异常的 DNA 甲基化位点是当前肿瘤标志物研究的热点之一。采用亚硫酸氢钠法处理 C3 质粒 EGFP 基因启动子区,未甲基化的胞嘧啶转变成胸腺嘧啶,而 5-甲基胞嘧啶则保持不变,绝大多数甲基化检测方法就是利用修饰后序列的这一特点进行 PCR 扩增而完成^[7]。但亚硫酸氢钠处理后,DNA 链因碱基发生改变而不再互补,相当于以单链为模板扩增,同时 DNA 大量减少,不稳定性增加,且引物易与模板发生错配,而产生大量非特异性扩增,再加上 CpG 岛总 CG 含量很高,造成 PCR 扩增时稳定性、重复性差,常得不到目的 DNA 或是扩增效率极低。

本方法利用沉降 PCR 法在最佳退火温度(61.0 °C),采用设计引物进行 PCR 扩增,增强了扩增的敏感性又抑制了非特异性扩增。其次,利用沉降 PCR 法在最佳退火温度(61.0 °C),用该方法进行了多次重复实验,均能得到理想的扩增产物。测序结果表明,亚硫酸氢钠修饰完全,HepG2 细胞 C3 质粒 EGFP 基因启动子 CpG 岛中的位点均为甲基化。

借助梯度降落 PCR 方法对 DNA 甲基化亚硫酸氢钠测序法进行改进,极大地提升了甲基化定量检测效果。通过 40 个循环的降落扩增程序设计,通过设置较高的退火温度,优先扩增目的区域片段,抑制非特异性扩增,提升了 PCR 产物的特异性和抑制了 PCR 扩增的假阳性^[8]。通过较宽范围的梯度退火温度设计,可以很快地探测出最佳退火温度,增加了 PCR 成功扩增的可能

性,提高了硫酸氢钠测序法的灵敏度。重复测定结果显示,本方法能够对甲基化标准品进行精确定量,并与已知甲基化水平相符,具有良好的稳定性,效果令人满意。

本研究针对具体 C3 质粒 CMV 启动子区,借助梯度降落 PCR 方法,成功实现了 DNA 甲基化的定量测定。鉴于增强型质粒 pEGFP-C3 在报告基因领域的广泛使用,C3 质粒 CMV 启动子区甲基化的定量检测方法对于相关领域的表观遗传学研究具有实际借鉴意义。

参考文献:

- [1] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1827-1831.
- [2] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, et al. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 4008.
- [3] Gonzalgo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SnuPE) [J]. Methods, 2002, 27: 128-133.
- [4] Wang XL, Zhang C, Zhang LJ, et al. High-throughput assay of DNA methylation based on methylation-specific primer and SAGE [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 341: 749-54.
- [5] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl

文章编号 :1001-5914(2010)05-0399-05

化学致癌物诱导人胚肾上皮细胞转化模型的构建

唐石伏,王庆,庞雅琴,赖延东,肖勇梅,张波,李道传,陈丽萍,杨萍,陈雯

摘要 目的 探讨 DNA 修复缺陷和癌基因高表达人胚肾上皮细胞转化模型在化学致癌物筛查中的应用价值。方法 利用 siRNA 技术构建 DNA 损伤修复基因缺陷人胚肾上皮细胞 (human embryonic kidney epithelial cell HEK) 采用微核实验检测 DNA 修复基因缺陷和 H-ras^{V12} 癌基因高表达对 DNA 损伤修复功能的影响,并测定已知致癌物 [硫酸镍(NiSO₄)、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)]和促癌剂佛波酯(TPA)诱导上述细胞的转化活性,比较两种类型的 HEK 细胞模型筛查化学致癌物的应用价值。结果 应用慢病毒介导的 siRNA 干扰技术成功构建了 HEK-shERCC1、HEK-shERCC2、HEK-shATM 和 HEK-shMLH1 等 DNA 损伤修复基因缺陷细胞株。与对照细胞 HEK-shGFP 相比,各 DNA 修复缺陷 HEK 细胞的生长速度、细胞形态和琼脂糖克隆的克隆形成率均没有差异,但 HEK-shERCC2 和 HEK-shATM 细胞对 MMC(mitomycin C, MMC)所致遗传损伤的修复能力显著降低,1.0 μg/ml MMC 处理后,HEK-shERCC2 和 HEK-shATM 细胞的微核率比对照细胞 HEK-shGFP 分别增加了 34%和 30%($P<0.05$)。2 μmol/L MNNG、400 μmol/L NiSO₄ 和 800 ng/ml TPA 诱导 HEK 细胞转化的时间分别是 8 周、8 周和 11 周,但在染毒后 20 周均未能诱导各 DNA 损伤修复缺陷 HEK 细胞发生转化。结论 癌基因高表达转化模型用于化学物质致癌活性的筛查,其灵敏性高于 DNA 修复基因缺陷细胞转化模型。

关键词 DNA 损伤修复基因;癌基因;人胚肾上皮细胞;N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍;硫酸镍;佛波酯;细胞转化

中图分类号:R994.6

文献标识码:A

Establishment of Human Embryonic Kidney Epithelial Cell Transformation Models Induced by Chemical Carcinogens
TANG Shi-fu, WANG Qing, PANG Ya-qin, et al. Faculty of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun-Yat Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China

Corresponding author: CHEN Wen, E-mail: wenchen1107@163.com

Abstract Objective To study the application of human embryonic kidney epithelial cell (HEK) models with DNA repair gene deficiency or human oncogene over-expression in screening potential human chemical carcinogens. **Methods** HEK cell line with DNA repair gene deficiency was constructed by using siRNA interference technology. DNA repair capacity of these cell lines and oncogene overexpression cells (HEKR) was detected by micronucleus (MN) test. Simultaneously, these cell lines were treated by known carcinogens MNNG, NiSO₄ and tumor promotor-TPA. The malignant transformed phenotypes were examined by soft agar assay and tumor formation in immunodeficient mice to compare the sensitivity between the two types of HEK cells in screening potential human chemical carcinogens. **Results** HEK cell lines with DNA repair gene deficiency (HEK-shERCC1, HEK-shERCC2, HEK-shATM and HEK-shMLH1) were successfully established using lentivirus-mediated siRNA interference technology. The population doubling time, cell morphology and colony forming of these cell lines showed no significant difference compared with those of the control cell line. However, the micronucleus rates of HEK-shERCC2 and HEK-shATM cells were increased by 34% and 30% ($P<0.05$) compared with those of the control cells after the treatment of 1.0 μg/ml mitomycin C (MMC). Cells treated with 2 μmol/L MNNG, 400 μmol/L NiSO₄ and 800 ng/ml TPA transformed at the 8th, 8th and 11th week post-treatment. However, DNA repair gene deficient HEK cell lines failed to acquire transformed phenotype 20 weeks after carcinogen treatment. **Conclusion** The oncogene-overexpressing cell model is more sensitive than the DNA repair gene deficient cell models in the screening of human chemical carcinogens.

Key words: DNA damage repair gene; Oncogene; Human embryonic kidney epithelial cell; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; Nickel sulfate; 12-O-tetramethylethylenediamine; Cell transformation

细胞转化试验是致癌物筛查常用的短期试验,以往的研究多采用原代动物细胞或人体细胞株,但是动物细胞在体外培养时自发突变率高,而人体细胞在体外培养时能够保持相对稳定

基金项目 国家自然科学基金重点项目(30630055),国家杰出青年基金资助项目(30925029)、“863”计划重大专项(2008AA062504)

作者单位 中山大学公共卫生学院预防医学系(广东广州510080)

作者简介 唐石伏(1980-)男,硕士研究生,从事分子遗传毒理学研究。

通讯作者 陈雯, E-mail: wenchen1107@163.com

的性状,是较好的研究对象,但由于细胞衰老的缘故,细胞在还没转化之前就停止分裂,而毒物对细胞损伤作用通常是在细胞分裂过程中完成的,因此实验的成功率和检测的灵敏度都不高。即使得到了细胞转化的表型,由于细胞没有永生性,难以建立稳定的细胞株做进一步研究。本课题组前期研究表明,与哺乳动物细胞和人原代细胞相比,哈威鼠肉瘤病毒致癌基因 ras 人同系物 (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, H-ras)第

Acad Sci USA, 1996, 93:9821-9826.

[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999:102-104.

[7] 张莉君,王先良,孙晞,等. 改进的亚硫酸氢钠测序法检测 HepG2 RASSF1A 基因 CpG 岛甲基化状态 [J]. 华中科技大学学报, 2006, 35:411-412.

[8] Barreto G, Schaefer A, Marhold J, et al. Gadd45α promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation [J]. Nature, 2007, 445:671-675.

(收稿日期:2010-03-22 修回日期:2010-04-30)

(本文编辑:杜宇欣)