



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113278686 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(21) 申请号 202110651752.4

G01N 21/84 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.11

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 李碧春 张晨 左其生 张亚妮
孙红艳

(74) 专利代理机构 扬州苏中专利事务所(普通合伙) 32222

代理人 许必元

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6851 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法,包括以下步骤:步骤(1)、在山中因子Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc诱导的基础上添加DNA甲基化酶抑制剂5' aza,按照山中伸弥提供的诱导方法对体细胞进行诱导,在不同诱导天数观察细胞形态;步骤(2)、当观察到出现细胞克隆时收集细胞进行荧光定量检测、间接免疫荧光检测、碱性磷酸酶染色、染色体核型分析和edu增殖检测;步骤(3)、确定5' aza的效果后,将四因子和5' aza分别进行组合处理体细胞进行诱导,检测ips克隆的形成,确定最有效的组合形式。通过本发明,通过山中因子和DNA甲基化抑制剂5' aza的不同组合诱导,探明DNA甲基化在体细胞重编程诱导中的作用。

1. 一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法,其特征是,包括以下步骤:

步骤(1)、在山中因子Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc诱导的基础上添加DNA甲基化酶抑制剂5' aza,按照山中伸弥提供的诱导方法对体细胞进行诱导,在不同诱导天数观察细胞形态;

步骤(2)、当观察到出现细胞克隆时收集细胞进行荧光定量检测、间接免疫荧光检测、碱性磷酸酶染色、染色体核型分析和edu增殖检测;

步骤(3)、确定5' aza的效果后,将四因子和5' aza分别进行组合处理体细胞进行诱导,按步骤(2)中方法检测ips克隆的形成,确定最有效的组合形式;

在此基础上,单独使用5' aza进行诱导,按步骤(2)中方法检测ips克隆形成,进一步确定DNA甲基化抑制剂的单独诱导作用;从而有效探明DNA甲基化在重编程过程中的作用。

2. 根据权利要求1所述的一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法,其特征是,步骤(2)中,荧光定量检测的方法为:收集克隆样细胞,添加Trizol 裂解液,进行RNA提取,反转录为cDNA后,实时荧光定量PCR检测Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc的表达,同时检测多能性基因的表达以及体细胞标记基因的表达;

间接免疫荧光检测方法为:去除细胞培养孔板中的培养基,添加4%的多聚甲醛对细胞固定30min,PBS清洗后,0.1%的Triton 透膜处理15min,离心清洗后,封闭2h,加入Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, 全能性标记蛋白和体细胞标记抗体,孵育过夜,清洗后,加入二抗孵育2h,清洗后加入DAPI孵育10min,荧光倒置显微镜下观察标记蛋白的表达;

碱性磷酸酶染色方法为:吸去培养基,PBS清洗干净后加入ALP固定液,固定3 min,PBS清洗后,加入ALP孵育液,避光15-20 min,PBS清洗;加入核固红染色或甲基绿染色3-5min,PBS清洗后进行镜检,观察克隆细胞能否呈现碱性磷酸酶活性;

染色体核型分析方法为:将细胞克隆按 5×10^6 的细胞接种在100mm口径培养皿中,至对数期,加入0.2ml的10 μ mol/L秋水仙酰胺,培养4h后,弃去培养基,加入胰蛋白酶孵育3min,加入10%FBS的DMEM终止消化,离心后,加入40mmol/L KCl和25mmol/L枸橼酸钠的低渗液重悬,静置后,加入等体积新鲜配制的冰冷的1:3醋酸甲醇固定液,静置10min,立新10min后,醋酸甲醇溶液重悬;用巴氏吸管吸一滴细胞悬液,从3米处滴在用冰块透凉的载玻片中;烘干后进行吉姆萨染色,5min后冲掉染液,观察染色体核型;

edu增殖检测方法为:取对数生长的细胞克隆,每孔 1×10^5 细胞接种于96孔板中,持续培养;每孔加入50 μ M Edu培养基孵育2小时,弃培养基,PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛室温孵育30min,弃固定液;加入甘氨酸孵育5min,清洗后加入0.5% TritonX-100的PBS孵育10min;清洗后加入1 $\times$ Apollo[®] 染色反应液,避光孵育10min,弃反应液,加入0.5% TritonX-100的PBS清洗2-3次,甲醇清洗1-2次,Hoechst 33342反应液孵育30min,PBS清洗后,进行观察。

一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 细胞重编程是逆分化的一种过程,通过体细胞核移植、转录因子诱导、细胞融合、细胞质孵育等手段,可以将分化完全的体细胞重编程为全能性细胞。体细胞核移植通过收集体细胞核注入去核的卵母细胞中,将融合后的细胞进行体外培养至胚胎进而植入母体,获得克隆动物。这种方法切实有效且能真实产生后代,但其在一定程度上违反了伦理道德,无法在人类上利用。细胞融合手段主要在植物育种和制备单克隆抗体时应用广泛,而在动物中仍涉及伦理道德问题。而自2006年山中伸弥发现体细胞导入四个转录因子(Oct4, Sox2, Klf4及c-Myc),可重编程为诱导性多能干细胞后,转录因子诱导技术不断发展。其无需使用卵细胞和胚胎,而仅适用人体其他细胞即可获得多能干细胞的优点免除了伦理争议,因此广受关注。而其仅从转录因子的角度研究了体细胞重编程的因素,大量调控因子尚未被挖掘。研究表明,添加组蛋白去乙酰化酶抑制剂VPA后,显著提高重编程过程,仍有相当多的表观遗传因子有待挖掘。

发明内容

[0003] 本发明的目的就是针对上述现有问题,DNA甲基化作为表观遗传修饰的一种,广泛存在于各个生命过程中。在体细胞中多能性基因往往处于高甲基化状态,表达抑制以维持体细胞稳定,而多能干细胞中DNA甲基化水平大多处于低甲基化状态,多能性基因活跃。因此DNA甲基化无疑决定着体细胞重编程的命运,然而目前尚未有报道系统地研究DNA甲基化对体细胞重编程的调控,仍需进一步研究。通过本发明,提供一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法。

[0004] 本发明的技术方案是:一种研究DNA甲基化调控重编程过程的方法,其特征是,包括以下步骤:

步骤(1)、在山中因子Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc诱导的基础上添加DNA甲基化酶抑制剂5' aza,按照山中伸弥提供的诱导方法对体细胞进行诱导,在不同诱导天数观察细胞形态;

步骤(2)、当观察到出现细胞克隆时收集细胞进行荧光定量检测、间接免疫荧光检测、碱性磷酸酶染色、染色体核型分析和edu增殖检测;

步骤(3)、确定5' aza的效果后,将四因子和5' aza分别进行组合处理体细胞进行诱导,按步骤(2)中方法检测ips克隆的形成,确定最有效的组合形式;

在此基础上,单独使用5' aza进行诱导,按步骤(2)中方法检测ips克隆形成,进一步确定DNA甲基化抑制剂的单独诱导作用;从而有效探明DNA甲基化在重编程过程中的作用。

[0005] 步骤(2)中,荧光定量检测的方法为:收集克隆样细胞,添加Trizol 裂解液,进行

RNA提取,反转录为cDNA后,实时荧光定量PCR检测Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc的表达,同时检测多能性基因的表达以及体细胞标记基因的表达;

间接免疫荧光检测方法为:去除细胞培养孔板中的培养基,添加4%的多聚甲醛对细胞固定30min,PBS清洗后,0.1%的Triton 透膜处理15min,离心清洗后,封闭2h,加入Oct4,Sox2,Klf4,c-Myc,全能性标记蛋白和体细胞标记抗体,孵育过夜,清洗后,加入二抗孵育2h,清洗后加入DAPI孵育10min,荧光倒置显微镜下观察标记蛋白的表达;

碱性磷酸酶染色方法为:吸去培养基,PBS清洗干净后加入ALP固定液,固定3 min,PBS清洗后,加入ALP孵育液,避光15-20 min,PBS清洗;加入核固红染色或甲基绿染色3-5min,PBS清洗后进行镜检,观察克隆细胞能否呈现碱性磷酸酶活性;

染色体核型分析方法为:将细胞克隆按 5×10^6 的细胞接种在100mm口径培养皿中,至对数期,加入0.2ml的 $10 \mu\text{mol/L}$ 秋水仙酰胺,培养4h后,弃去培养基,加入胰蛋白酶孵育3min,加入10%FBS的DMEM终止消化,离心后,加入 40mmol/L KCl和 25mmol/L 枸橼酸钠的低渗液重悬,静置后,加入等体积新鲜配制的冰冷的1:3醋酸甲醇固定液,静置10min,立新10min后,醋酸甲醇溶液重悬;用巴氏吸管吸一滴细胞悬液,从3米处滴在用冰块透凉的载玻片中;烘干后进行吉姆萨染色,5min后冲掉染液,观察染色体核型;

edu增殖检测方法为:取对数生长的细胞克隆,每孔 1×10^5 细胞接种于96孔板中,持续培养;每孔加入 $50 \mu\text{M}$ Edu培养基孵育2小时,弃培养基,PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛室温孵育30min,弃固定液;加入甘氨酸孵育5min,清洗后加入0.5% TritonX-100的PBS孵育10min;清洗后加入 $1 \times$ Apollo® 染色反应液,避光孵育10min,弃反应液,加入0.5% TritonX-100的PBS清洗2-3次,甲醇清洗1-2次,Hoechest 33342反应液孵育30min,PBS清洗后,进行观察。

[0006] 本发明方法先进科学,通过本发明,本研究操作简单方便,实验思路清晰,可行性较高,具有很强的适用性和延展性。通过山中因子和DNA甲基化抑制剂5' aza的不同组合诱导,探明DNA甲基化在体细胞重编程诱导中的作用。本研究应用广泛,在不同物种的体细胞中均可适用。

[0007] 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进一步进行描述。但本发明的保护范围并不仅限于此:

1. DNA甲基化抑制剂联合山中因子诱导重编程;

将逆转录病毒包裹的Oct4,Sox2,Klf4及c-Myc过表达载体联合DNA甲基化酶抑制剂5' aza对体细胞进行诱导,在不同诱导天数观察细胞状态,同时进行拍照记录。

[0008] 2. ips细胞的鉴定;

当观察到出现克隆样细胞时,收集细胞进行鉴定。

[0009] 荧光定量检测:收集克隆样细胞,添加Trizol 裂解液,进行RNA提取,反转录为cDNA后,实时荧光定量PCR检测Oct4,Sox2,Klf4及c-Myc的表达,同时检测多能性基因的表达以及体细胞标记基因的表达。

[0010] 间接免疫荧光:去除细胞培养孔板中的培养基,添加4%的多聚甲醛对细胞固定30 min,PBS清洗后,0.1%的Triton 透膜处理15min,离心清洗后,封闭2h,加入Oct4,Sox2,Klf4,c-Myc,全能性标记蛋白和体细胞标记抗体,孵育过夜,清洗后,加入二抗孵育2h,清洗

后加入DAPI孵育10min,荧光倒置显微镜下观察标记蛋白的表达。

[0011] 碱性磷酸酶染色:吸去培养基,PBS清洗干净后加入ALP固定液,固定3 min,PBS清洗后。加入ALP孵育液,避光15-20 min,PBS清洗。加入核固红染色或甲基绿染色3-5min,PBS清洗后进行镜检。观察克隆细胞能否呈现碱性磷酸酶活性。

[0012] 染色体核型分析:将细胞克隆按 5×10^6 的细胞接种在100mm口径培养皿中,至对数期,加入0.2ml的 $10 \mu\text{mol/L}$ 秋水仙酰胺,培养4h后,弃去培养基,加入胰蛋白酶孵育3min,加入10%FBS的DMEM终止消化,离心后,加入 40mmol/L KCl和 25mmol/L 枸橼酸钠的低渗液重悬,静置后,加入等体积新鲜配制的冰冷的1:3醋酸甲醇固定液,静置10min,立新10min后,醋酸甲醇溶液重悬。用巴氏吸管吸一滴细胞悬液,从约3米处滴在用冰块透凉的载玻片中。烘干后进行吉姆萨染色,5min后冲掉染液,观察染色体核型。

[0013] Edu增殖检测:取对数生长的细胞克隆,每孔 1×10^5 细胞接种于96孔板中,持续培养。每孔加入 $50 \mu\text{M}$ Edu培养基孵育2小时,弃培养基,PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛室温孵育30min,弃固定液。加入甘氨酸孵育5min,清洗后加入0.5% TritonX-100的PBS孵育10min。清洗后加入 $1 \times$ Apollo® 染色反应液,避光孵育10min,弃反应液,加入入0.5% TritonX-100的PBS清洗2-3次,甲醇清洗1-2次,Hoechest 33342反应液孵育30min,PBS清洗后,进行观察。

[0014] 3. 确定DNA甲基化对细胞重编程的调控作用;

将四因子分别与5' aza进行组合诱导体细胞,按当观察到出现细胞克隆时收集细胞进行荧光定量检测、间接免疫荧光检测、碱性磷酸酶染色、染色体核型分析和edu增殖检测的方法鉴定获得的细胞克隆,确定最有效的组合形式。在此基础上,单独使用5' aza进行细胞诱导,利用当观察到出现细胞克隆时收集细胞进行荧光定量检测、间接免疫荧光检测、碱性磷酸酶染色、染色体核型分析和edu增殖检测的方法进行细胞鉴定,以此确定DNA甲基化对细胞重编程的调控作用。