

本文引用: 丁琼琼, 张彬彬, 张亚平, 等. 含 PR 结构域的锌指蛋白 5 特异性小干扰 RNA 载体构建及干扰效果评价[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(3): 174-177. DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2016. 03. 004.

【基础研究】

含 PR 结构域的锌指蛋白 5 特异性小干扰 RNA 载体构建及干扰效果评价

丁琼琼, 张彬彬, 张亚平, 杨海杰, 王磊, 冯志伟
(新乡医学院生命科学技术学院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 构建含 PR 结构域的锌指蛋白 5 (PRDM5) 特异性小干扰 RNA (siRNA) 干扰载体并鉴定其干扰效果。**方法** 根据小鼠 PRDM5 基因全长 cDNA 序列, 设计合成 6 条 siRNA 干扰片段 (siPRDM5-1、siPRDM5-2、siPRDM5-3、siPRDM5-4、siPRDM5-5 和 siPRDM5-6) 和 2 条对照序列 (siCTL-1 和 siCTL-2), 并将前 3 条干扰片段和 siCTL-1 克隆插入 pSilencer3.1-U6, 另 3 条干扰片段和 siCTL-2 插入 pSilencer4.1-CMV 干扰载体中, 构建小鼠 PRDM5 基因的 siRNA 真核表达载体 siPRDM5-1、siPRDM5-2、siPRDM5-3、siPRDM5-4、siPRDM5-5 和 siPRDM5-6, 2 个对照序列 siCTL-1 和 siCTL-2, 并通过双酶切和测序进行验证, 构建成功后转染小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 并采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 法检测其干扰效率。**结果** 成功构建真核 siRNA 表达载体, 并且所构建的 6 个干扰载体均可降低小鼠黑色素瘤细胞中 PRDM5 基因 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。其中 siPRDM5-2 和 siPRDM5-6 载体干扰效果最好。**结论** 成功筛选出 PRDM5 特异性 siRNA 载体, 为之后研究锌指蛋白基因 PRDM5 在小鼠黑色素瘤转移过程中功能及分子机制打下基础。

关键词: 含 PR 结构域的锌指蛋白 5; 小干扰 RNA 载体; 干扰
中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)03-0174-04

Construction and evaluation of PR domain containing 5 specificity small interfering RNA vector

DING Qiong-qiong, ZHANG Bin-bin, ZHANG Ya-ping, YANG Hai-jie, WANG Lei, FENG Zhi-wei
(College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To construct PR domain containing 5 (PRDM5) specificity small interfering RNA (siRNA) interference vector and identify its interference effect. **Methods** According to the whole coding cDNA sequence of mouse PRDM5 gene, six siRNA interference fragments (siPRDM5-1, siPRDM5-2, siPRDM5-3, siPRDM5-4, siPRDM5-5 and siPRDM5-6) and two control sequence (siCTL-1 and siCTL-2) were designed. The first three interference fragments and siCTL-1 were inserted into pSilencer3.1-U6 interference vector, and the other three interference fragments and siCTL-2 were inserted into pSliencer4.1-CMV interference vector. The six siRNA eukaryotic expression vectors (siPRDM5-1, siPRDM5-2, siPRDM5-3, siPRDM5-4, siPRDM5-5 and siPRDM5-6) of PRDM5 gene and two control sequence (siCTL-1 and siCTL-2) were constructed. The recombinant plasmid was verified by double enzyme digestion and sequencing. Then the above vectors were transfected into mouse B16F10 cells and the interference effect was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot method. **Results** The siRNA eukaryotic expression vectors were constructed successfully, and all of the six interference vectors could reduce the PRDM5 gene mRNA expression ($P < 0.05$). The interference effect of siPRDM5-2 and siPRDM5-6 vector was best. **Conclusion** This study successfully constructed efficient PRDM5 specificity siRNA vector, which provide experimental basis for further studying the function of PRDM5 gene in mouse melanoma cells B16F10.

Key words: PR domain containing 5; small interfering RNA vector; interference

PR 区域蛋白基因家族 (PRDI-BF1 and RIZ domain proteins, PRDM) 属于锌指蛋白家族, 其家族蛋白产物包含 N-末端 PR 结构域和 16 个锌指序列^[1]。

DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2016. 03. 004
收稿日期: 2015-11-30
基金项目: 河南省高等学校重点科研计划项目 (编号: 15A180010)。
作者简介: 丁琼琼 (1988-), 女, 河南开封人, 硕士研究生在读, 研究方向: 肿瘤细胞生物学。
通信作者: 王磊 (1979-), 男, 河南新乡人, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤细胞生物学; E-mail: lwang0522@163.com。

PRDM 中 PR 结构域与 SET 结构域的组蛋白甲基转移酶相似度达 20% ~ 30%, 且其锌指结构域是蛋白-DNA 或蛋白-蛋白作用位点^[2]。到目前为止, 已发现 17 个 PRDM 家族成员, 该家族大多数成员为抑癌基因^[3]。研究表明, PRDM 家族成员在细胞分化和癌变中起重要作用, 且在病变组织中发生突变或失调^[4-5]。
PRDM5 (又名 PFM2) 基因定位于染色体 4q25 ~ q26, 编码 600 个氨基酸的蛋白质^[6]。PRDM5 基因在人组织中广泛存在。PRDM5 在原癌组织比如乳腺

癌、肺癌、卵巢癌和肝癌中其 mRNA 及蛋白表达水平都明显下调。在胃肠癌中 PRDM5 沉默频发,可以此作为分子诊断和治疗的依据^[7]。研究表明,在多种癌细胞中 PRDM5 沉默是由于启动子 CpG 高甲基化所致^[8]。PRDM5 过表达可抑制癌细胞系中 T 细胞因子/ β -链蛋白转录和 Wnt 下游 CDK4 表达。在多种肿瘤中 PRDM5 可通过阻碍细胞周期 G₂/M 期抑制细胞生长和增殖^[9]。另有研究发现,PRDM5 招募和指导组蛋白甲基转移酶 G9A 和组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 到靶基因启动子上通过修饰染色体来抑制基因的表达。目前对 PRDM5 的研究大多集中在表观遗传和甲基化上,但是其作用的分子机制尚未深入了解。本实验成功构建针对锌指蛋白基因 PRDM5 特异小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 真核干扰载体,且具有明显的干扰效果,为之后研究 PRDM5 在黑色素瘤转移过程中的功能及分子机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞 短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体 pSilencer3.1-U6 和 pSilencer4.1-CMV 购自美国 Invitrogen 公司,大肠杆菌 Top10 和 DH5 α 为本实验室保存,B16F10 小鼠黑色素瘤细胞由新加坡南洋理工大学惠赠。

1.2 主要试剂和仪器 T4 DNA 连接酶购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;DNA 退火溶液购自美国 Ambion 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司;限制性内切酶购自美国 Thermo Scientific 公司;PRDM5 蛋白兔多克隆抗体和蛋白 A/G 混合琼脂糖均购自德国 Sigma 公司;荧光核酸凝胶染色试剂 GelRed 购自上海开放生物科技有限公司;核酸分子量标准购自康为科技有限公司;达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司;青链霉素和蛋白酶抑制剂混合物 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 购自上海生工生物工程有限公司;转染试剂脂质体 2000、TRIzol 和反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;Eva Green 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 试剂盒购自北京启为益诚科技有限公司;细胞裂解液 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)、抗 β -actin 兔单克隆抗体购自上海碧云天生物技术研究;辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;蛋白免疫印迹化学发光显影液购自美国 Milipore 公司;核酸电泳槽购自北京君意东方电泳设备公司;电泳仪、蛋白垂直电泳槽和转膜

槽均购自美国 Bio-Rad 公司;投射防护盖紫外分析仪购自上海领成生物科技有限公司;凝胶成像系统 AmershamTM Imager 600 购自美国 GE Healthcare 公司;7500 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 系统购自赛默飞世尔科技(北京)公司。

1.3 方法

1.3.1 siRNA 设计 利用在线工具 www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html, 将小鼠 PRDM5 编码区输入,选择最适条件,从软件生成的 siRNA 中选取 6 条干扰序列 (siPRDM5-1、siPRDM5-2、siPRDM5-3、siPRDM5-4、siPRDM5-5 和 siPRDM5-6), 2 条对照序列 (siCTL-1 和 siCTL-2), 前 3 条干扰序列和 siCTL-1 插入 pSilencer3.1-U6, 后 3 条干扰序列和 siCTL-2 插入 pSilencer4.1-CMV, 并运用 BLAST 软件与小鼠 PRDM5 进行比对,以确保其特异性。引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。设计合成 siRNA 引物序列如下。siPRDM5-1 正义链:5'-GATCCGCTGAAGCGTCACATGATTTTCAAGAGAAATCATGTGACGCTTCAGCTTTTTTGGAAA-3', 反义链:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGCTGAAGCGTCACATGATTTCTCTTGAAAATCATGTGACGCTTCAGCG-3'; siPRDM5-2 正义链:5'-GATCCGGATACATTAAACGTTTCATTTCAAGAGAATGAACGTTTAATGTATCCTTTTTTGGAAA-3', 反义链:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGATACATTAAACGTTTCATTCTCTTGAAAATGAACGTTTAATGTATCCG-3'; siPRDM5-3 正义链:5'-GATCCGCTAACGGAATCCGTGTTTTTCAAGAGAAAACACGGATTCCGTTAGCTTTTTTGGAAA-3', 反义链:5'-AGTTTCTCCAAAAAGCTAACGGAATCCGTGTTTTCTCTTGAAAAACACGGATTCCGTTAGCG-3'; siCTL-1 正义链:5'-GATCCGATACGCAATATTGATCATTTCAAGAGAATGATCAATATTGCGTATCTTTTTTGGAAA-3', 反义链:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGATACGCAATATTGATCATCTCTTGAAAATGATCAATATTGCGTATCG-3'; siPRDM5-4 正义链:5'-GATCCGCAGTTGATGATATAGAAATCAAGAGATTTCTATATCATCAACTGCCAA-3', 反义链:5'-AGCTTTGGCAGTTGATGATATAGAAATCTTGAATTTCTATATCATCAACTGCG-3'; siPRDM5-5 正义链:5'-GATCCCCACTGTGATGCCACATTTTCAAGAGAAAATGTGGCATCACAGTGGTGA-3', 反义链:5'-AGCTTACCACCTGTGATGCCACATTTCTCTTGAAAATGTGGCATCACAGTGGG-3'; siPRDM5-6 正义链:5'-GATCCGCTGTGCAATAAGGCCTTTTTCAAGAGAAAGGCCTTATTGCACAGCTCA-3', 反义链:5'-AGCTTGAGCTGTGCAATAAGGCCTTTTCTCTTGAAAGGCCTTATTGCACAGCG-3'; siCTL-2 正义链:5'-GATCCGCTAACGGAATCCGTGTTTTTCAAGAGAAAACACGGATTCCGTTAGCTTTTTTGGAAA-3', 反义

链: 5'-AGCTTGAGCTAACGGAACCTCGTGTCTTCTCT-TGAAAAACACGAGTTCCGTTAGCG-3'。

1.3.2 siRNA 干扰载体的构建及鉴定

1.3.2.1 退火 将合成好的 6 条 siRNA 引物用无核酸酶水稀释至 1 g · L⁻¹, 建立 50 μL 退火体系: 稀释后的 siRNA 正、反义链各 2 μL, DNA 退火溶液 46 μL。将上述 6 份混合物在 90 ℃ 加热 3 min, 之后 37 ℃ 水浴 1 h 形成 DNA 双链。

1.3.2.2 载体线性化 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切干扰载体 pSilence3.1-U6 和 pSilencer4.1-CMV 使其线性化^[10], 胶回收线性产物以备。

1.3.2.3 连接和转化 用 45 μL 无核酸酶水稀释 5 μL 退火的双链 DNA 至终浓度 8 × 10⁻³ g · L⁻¹, 建立 2 个 10 μL 连接体系, 1 个加退火产物, 1 个加无插入物的阴性对照。反应体系: 退火产物 1 μL, 无核酸酶水 6 μL, 10 × T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μL, T4DNA 连接酶 1 μL, 线性化干扰载体 pSilencer3.1-U6 和 pSilencer4.1-CMV 各 1 μL。16 ℃ 过夜连接。连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 将转化细胞接种到 Luria-Bertani broth (LB) 固体培养基 (含氨卡青霉素 0.1 g · L⁻¹), 37 ℃ 过夜培养。

1.3.2.4 阳性克隆载体筛选和鉴定 每组挑选 4 个单菌落接种到 3 mL LB 培养基, 37 ℃ 摇床振荡培养过夜, 小量提取质粒后 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切并对酶切产物进行琼脂糖电泳鉴定并测序。

1.3.3 干扰效应评价

1.3.3.1 细胞培养 用含体积分数 1% 双抗和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养小鼠黑色素瘤细胞 B16F10, 取对数生长期细胞接种至 6 孔板, 待细胞融合至 70% ~ 80% 时用脂质体 2000 转染干扰载体, 小鼠 PRDM5 基因 siRNA 重组质粒转染小鼠黑色素瘤细胞 B16F10, 每组重复 3 次, 转染 48 h 后提取细胞总 RNA 和总蛋白。

1.3.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 PRDM5 mRNA 表达情况 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 应用 Eva Green qPCR mastermix 试剂盒, 以 β-actin 作为内参基因进行实时荧光定量 PCR, 计算 PRDM5 基因 mRNA 相对表达量。

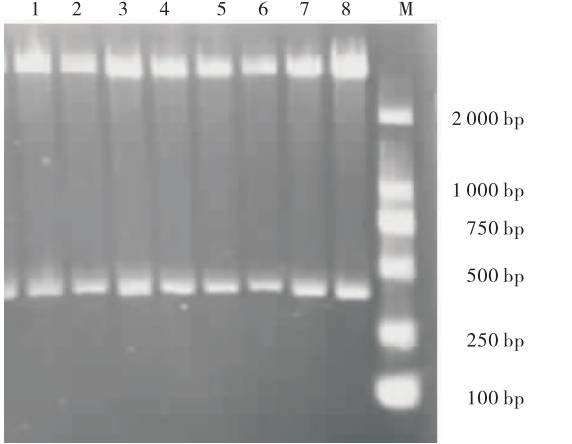
1.3.3.3 Western blot 检测 PRDM5 蛋白表达情况 转染 48 h 后, 用 RIPA 裂解细胞提取细胞总蛋白; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白样品; 垂直湿式转移法将蛋白样品转至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上; 立即将蛋白膜放置到三羟甲基氨基甲烷盐酸吐温缓冲液 (Tris-HCl buffered saline with Tween 20, TBST) 中漂洗 1 ~ 2 min; 然后将膜浸泡于质量分数为 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 中室温封闭 2 h 或 4 ℃ 过夜; 一抗 (体积分数 0.1%

PRDM5, 体积分数 0.02% β-actin) 室温孵育 2 h 或 4 ℃ 过夜; TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 室温孵育二抗 (体积分数 0.02% 山羊抗兔) 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 使用凝胶成像系统加入化学发光显影液自动曝光, 显示蛋白条带^[11]。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验, 检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 阳性克隆质粒双酶切鉴定 挑取所构建的干扰载体和 siCTL 阳性克隆提取质粒, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定可以观察到酶切 siRNA 产物 (300 bp) (图 1), 将所购载体送金唯智测序, DNA 测序结果与所设计序列完全吻合, 表明小鼠 PRDM5 基因的 siRNA 干扰载体构建成功。



M: DNA 分子量标准; 1、2、3、4: 插入 pSilencer3.1-U6 载体的 siPRDM5-1、siPRDM5-2、siPRDM5-3 和 siCTL-1 干扰载体酶切鉴定; 5、6、7、8: 插入 pSilencer4.1-CMV 载体的 siPRDM5-4、siPRDM5-5、siPRDM5-6 和 siCTL-2 的酶切鉴定。

图 1 PRDM5 的 siRNA 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant siRNA plasmids of PRDM5 with double enzyme digestion

2.2 干扰载体对小鼠 PRDM5 基因表达的影响 结果见表 1。转染干扰载体后细胞 PRDM5 基因表达量均小于转染对照载体, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05), 且 qPCR 结果显示 siPRDM5-2 和 siPRDM5-6 有显著干扰效果。

表 1 各组 PRDM5 mRNA 相对表达量比较

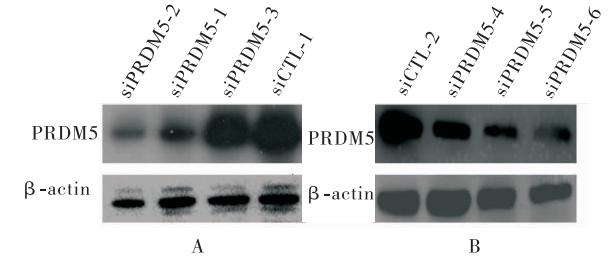
Tab. 1 Comparison of relative expression of PRDM5 mRNA in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	PRDM5 mRNA 相对表达量
siCTL-1	1.000 ± 0.000
siPRDM5-1	0.735 ± 0.039 ^a
siPRDM5-2	0.436 ± 0.040 ^a
siPRDM5-3	0.872 ± 0.050 ^b
siCTL-2	1.000 ± 0.000
siPRDM5-4	0.767 ± 0.050 ^c
siPRDM5-5	0.615 ± 0.020 ^d
siPRDM5-6	0.414 ± 0.020 ^d

注: 与 siCTL-1 比较^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.05; 与 siCTL-2 比较^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.001。

2.3 干扰载体对小鼠 PRDM5 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, siPRDM5-2 和 siPRDM5-6 有显著干扰效果(图2)。



A:PRDM5 抗体检测转染 pSilencer3.1-U6 干扰载体后 PRDM5 蛋白的表达; B:PRDM5 抗体检测转染 pSilencer4.1-CMV 干扰载体后 PRDM5 蛋白的表达。

图2 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 中 PRDM5 蛋白的表达
Fig.2 Expression of PRDM5 protein in mouse melanoma cells B16F10

3 讨论

PRDM5 是一种表观遗传调节因子,被公认为重要的抑癌基因。在多种肿瘤中均发现了由于启动子高甲基化引起的 PRDM5 基因沉默^[12]。目前对 PRDM5 基因抑制肿瘤发生的分子机制及其作用均无深入的报道。黑色素瘤是一种来源于黑色素细胞的恶性肿瘤,其一旦发生转移,无有效的治疗方法。因此,进一步研究并阐明 PRDM5 与黑色素瘤转移的关系对提高黑色素瘤的治疗效率有重要意义。

目前,siRNA 最常用的获得方法是人工化学合成和载体表达,化学合成法成本较高,获得的 siRNA 在体外很容易被降解且效果不稳定。许多研究者在大量实验基础上总结了详细的 siRNA 设计原则,然而大多数情况下,所设计的 siRNAs 中,一般只有 20% 能有效沉默目的基因。因此,如何设计高干扰效率的 siRNA 对后续实验的开展至关重要。本研究使用 abmin 在线软件设计 siRNAs,以 pSilence3.1-U6 和 pSilencer4.1-CMV 为 siRNA 载体,成功构建小鼠 PRDM5 基因的特异性 siRNA 表达载体,将其转染至小鼠黑色素瘤细胞 B16F10,结果表明所设计的 6 条 siRNA 均有明显的干扰效果,并显著降低了 PRDM5 基因在 B16F10 细胞中的表达。

本研究采用双酶切和基因测序的方法检测重组干扰载体。插入 siRNA 之前, pSilencer3.1-U6 和 pSilencer4.1-CMV 应先双酶切后回收备用,每次连接尽量使用新鲜的酶切载体以免影响连接效果。通过多次实验,连接条件选择 16℃ 过夜, 4℃ 放置 2 h 能够显著提高连接效率。

细胞转染 48 h 后 TRIzol 法提取细胞 mRNA,反转录生成 cDNA 后用 qPCR 的方法实时监测 PRDM5 基因表达量,结果显示,小鼠 B16F10 细胞中存在

PRDM5 基因且转染干扰载体细胞中 PRDM5 基因表达下调。用 RIPA 裂解转染重组干扰质粒的细胞,提取总蛋白用 Westren blot 分析,结果显示所构建的 6 条干扰载体均明显抑制了细胞中 PRDM5 蛋白的表达,这些结果说明了构建的 siRNA 特异性干扰载体是成功的,从中挑选出 2 条干扰效果最好的载体(插入 pSilencer3.1-U6 载体的 siPRDM5-2 和插入 pSilencer4.1-CMV 载体的 siPRDM5-6),为之后共转筛选稳转细胞系提供基础。

参考文献:

[1] KINAMERI E,INOUE T,ARUGA J,*et al.* Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis[J]. *PLoS One*,2008 ,3 (12) :e3859.

[2] GALLI G G,HONNENS DE LICHTENBERG K,CARRARA M,*et al.* PRDM5 regulates collagen gene transcription by association with RNA polymerase II in developing bone[J]. *PLoS Genet* ,2012 ,8(5) :e1002711.

[3] SHU X S,GENG H,LI L,*et al.* The epigenetic modifier PRDM5 functions as a tumor suppressor through modulating WNT/ β -catenin signaling and is frequently silenced in multiple tumors[J]. *PLoS One* ,2011 ,6(11) :e27346.

[4] WATANABE Y,TOYOTA M,KONDO Y,*et al.* PRDM5 identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res* ,2007 ,13(16) :4786-4794.

[5] NISHIKAWA N,TOYOTA M,SUZUKI H,*et al.* Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancers[J]. *Cancer Res* ,2007 ,67(20) :9649-9657.

[6] SHIVAPURKAR N,MAITRA A,MILCHGRUB S,*et al.* Deletions of chromosome 4 occur early during the pathogenesis of colorectal carcinoma[J]. *Hum Pathol* ,2001 ,32(2) :169-177.

[7] DENG Q,HUANG S. PRDM5 is silenced in human cancers and has growth suppressive activities [J]. *Oncogene* ,2004 ,23(28) :4903-4910.

[8] BOND C E,BETTINGTON M L,PEARSON S A,*et al.* Methylation and expression of the tumour suppressor, PRDM5, in colorectal cancer and polyp subgroups[J]. *BMC Cancer* ,2015 ,15:20.

[9] GALLI G G,MULTHAUPT H A,CARRARA M,*et al.* PRDM5 suppresses Apc-driven intestinal adenomas and regulates monoacylglycerol lipase expression[J]. *Oncogene* ,2014 ,33(25) :3342-3350.

[10] YANG H J,XIA Y Y,WANG L,*et al.* A novel role for neural cell adhesion molecule in modulating insulin signaling and adipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Sci* ,2011 ,124(Pt 15) :2552-2560.

[11] 王磊,张亚平,杨海杰,等. 含 MYND 结构域的锌指蛋白 10 的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *新乡医学院学报* ,2015 ,32(9) :821-825.

[12] TAN S X,HU R C,TAN Y L,*et al.* Promoter methylation-mediated downregulation of PRDM5 contributes to the development of lung squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol* ,2014 ,35(5) :4509-4516.