

分类号： Q81

学校代码： 10697

密 级： 公开

学 号： 201931943



西北大学
Northwest University

专业学位硕士学位论文

Dissertation for the Professional Degree of Master

单核苷酸多态性 rs10811660 在 2 型糖尿病发生风险 中的功能研究

专业学位类别： 工程硕士

领 域 名 称： 生物工程

作 者： 李芮

指导老师：严健

西北大学学位评定委员会

二〇二二年

**Functional study of single nucleotide
polymorphism rs10811660 in predisposing the
risk of type 2 diabetes**

A thesis submitted to
Northwest University
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master
in Bioengineering

By

Li Rui

Supervisor: Yan Jian Professor

June 2022

摘要

2 型糖尿病是一种复杂的代谢性疾病，以高血糖为特征导致各种组织慢性损害，功能障碍。糖尿病的危害巨大，治疗糖尿病不仅会花费大量金钱，并且会给病人带来精神和肉体上的痛苦，其并发症更可能会使糖尿病患者致死。目前糖尿病流行的形势严峻，认识其发病机理对于治疗和预防糖尿病必不可少。全基因组关联分析（GWAS）是揭示复杂疾病易感基因以及影响复杂性状基因变异的有效方法。在之前的研究中，全基因组关联分析已发现大量和 2 型糖尿病（T2MD）显著相关联的单核苷酸多态性（SNPs），但是这些与 2 型糖尿病风险相关的单核苷酸多态性位点多为相关性研究，缺少功能性分析。

本课题组前期用高通量 SNP-SELEX 的方法筛选出的 11079 个影响转录因子结合力的 SNPs 位点，并利用英国生物样本库中 T2DM 患者和对照人群的基因分型数据，通过回归分析在这些位点中找出了 305 个与 T2DM 显著相关的位点。本研究在收集到的陕西人群 T2DM 患者和对照人群的基因分型数据中通过卡方检验对显著性位点 SNP rs10811660 进行交叉验证，并对这个位点进行了功能研究。SNP rs10811660 有两个等位基因，分别是 A 和 G。我们发现 SNP rs10811660 的 A/G 与其位点上结合的转录因子 MAFG 结合力有明显差异，转录因子 MAFG 更倾向结合于 SNP rs10811660 的 G 等位基因。SNP 不同等位基因对转录因子结合力不同，我们猜测其不同等位基因会对下游基因的表达产生影响。双荧光素报告系统检测发现 SNP rs10811660 所在的基因组片段有增强子效果，并且当 SNP rs10811660 这个位点是 G 等位基因的时候具有更高的增强子效应。Hi-C 数据分析表明与 SNP rs10811660 在同一个拓扑结构域的基因有 *CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 等。当用转染 siRNA 的方法敲低 MAFG，发现 *CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平明显下降。用 CRISPR/Cas9 的技术将含 SNP rs10811660 基因组片段敲除后，同样发现 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平明显下降。以上结果表明 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 可能是 SNP rs10811660 所在增强子的作用靶点，这些基因可能和 2 型糖尿病的发生发展有关。

综上所述，我们确认了 rs10811660 是一个 2 型糖尿病的风险相关 SNP，其处于

增强子上，并通过影响转录因子 MAFG 的结合来调控 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 基因的表达。本研究发现了可能影响 2 型糖尿病发生的相关基因，为后续进一步研究其致病机理做了重要铺垫。本研究及后续的研究可以帮助了解 2 型糖尿病的遗传机制，解释疾病背后的生物学机理，从而为疾病早期筛查和临床诊断治疗打下基础。

关键词：2 型糖尿病，单核苷酸多态性，增强子，全基因组关联分析，*CDKN2A/2B*

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex metabolic disease characterized by hyperglycemia leading to chronic damage and dysfunction of various tissues. Diabetes not only brings a huge economic burden to patients, but also brings mental and physical pain to patients. Complications of diabetes are more likely to lead to death of people with diabetes. At present, the situation of diabetes epidemic is serious, and understanding its pathogenesis is very important for the treatment and prevention of diabetes. Genome-wide association analysis (GWAS) is an effective method to reveal complex disease susceptibility genes and genetic variations affecting complex traits. In previous studies, genome-wide association analysis has found a large numbers of single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with T2DM. However, these SNPs are merely statistically associated with the risk of T2DM, lack of functional and causal relationship.

In the early stage, our group identified 11079 SNPs that affect the binding affinity of transcription factors with the high-throughput SNP-SELEX method and revealed 305 significantly related loci with T2DM containing these SNPs through regression analysis using the genotyping data of T2DM patients and non-diabetic controls in the UK biobank. In this study, we collected genotyping data of T2DM patients and non-diabetic controls in Shaanxi Province to cross-validate the significant locus containing SNP rs10811660. Then we conducted further functional studies on this locus. SNP rs10811660 has two alleles, A and G. We found that the binding affinity of the two alleles of SNP rs10811660 to the transcription factor MAFG was significantly different. The G-allele of SNP rs10811660 was more enriched in MAFG CHIP pulldown DNA than the A-allele. This means that MAFG preferentially binds to the G allele of SNP rs10811660. We speculate that this difference will affect the expression of downstream genes. To test it, we carried out a luciferase based reporter assay and found that the genomic fragment with G-allele displayed significantly stronger signal than A-allele although both allele-containing fragments presented mild

enhancer activity. Hi-C analysis showed that *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1* genes were in the same topological associating domain as SNP rs10811660. When MAFG was knocked down by siRNA method, the transcription levels of *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1* were significantly decreased. The transcriptional levels of *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1* were also significantly decreased after the SNP rs10811660 containing fragment was deleted by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. These results suggest that *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1* may be the target of the putative enhancer harboring SNP rs10811660, and these genes may contribute to the occurrence and development of T2DM.

In summary, we confirm that SNP rs10811660 is a risk-related SNP of T2DM, which is located on the enhancer and regulates the expression of *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1* genes by affecting the binding of transcription factor MAFG. This study identified genes that might affect the occurrence of T2DM, and laid an important foundation for further study of its pathogenesis. This and the follow-up study can help understand the genetic mechanism of T2DM, and lay the foundation for early screening and clinical diagnosis and treatment.

Key words: type 2 diabetes, single nucleotide polymorphism, enhancer, Genome-wide association analysis, *CDKN2A/2B*

目录

摘要	I
ABSTRACT	III
目录	V
缩略语对照表	IX
第一章 绪论	1
1.1 糖尿病的相关研究	1
1.1.1 糖尿病的流行特点	1
1.1.2 糖尿病相关组织的作用机制	2
1.1.3 糖尿病的症状及诊断	3
1.1.4 糖尿病的并发症	4
1.1.5 糖尿病的治疗	4
1.2 SNP 相关研究	5
1.2.1 SNP 的定义及功能	5
1.2.2 SNP 与 2 型糖尿病的研究现状	7
1.3 研究背景	8
第二章 实验材料与方法	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 主要实验仪器	11
2.1.2 实验试剂及试剂盒	12
2.1.3 实验所用菌株、细胞株及载体	12
2.1.4 引物序列及其他核苷酸序列	14
2.2 收集糖尿病患者和非糖尿病患者的血样	15
2.2.1 收集血样标准	15
2.2.2 记录样品信息	15
2.2.3 提取血样的 DNA	15
2.3 DNA 样品的测序和统计分析	16

2.3.1 测序方法-SNPscan	16
2.3.2 卡方检验该位点的显著性	16
2.4 确定 rs10811660 所在位置是杂合子的细胞	17
2.4.1 提取细胞系基因组	17
2.4.2 设计引物, PCR 扩增所选 SNPs 位点片段, 送测	17
2.5 检测 TF 在 rs10811660 不同 allele 富集	18
2.5.1 染色质免疫共沉淀 (ChIP)	18
2.5.2 运用链特异性 PCR 的方法, 进行 qPCR	20
2.6 检测 rs10811660 不同等位基因是否有转录差异	21
2.6.1 构建双荧光素报告系统载体	21
2.6.2 大提无内毒素质粒	25
2.6.3 转染细胞	26
2.6.4 发光检测	27
2.7 检测敲低结合 SNP 的转录因子表达后对靶基因表达的影响	27
2.7.1 转染 siRNA	27
2.7.2 提取 RNA	28
2.7.3 RNA 反转录	28
2.7.4 RT-QPCR	29
2.8 检测含 SNP 基因组敲除前后对靶基因转录的影响	29
2.8.1 构建含有两个 sgRNA 的 CRISPR 载体	29
2.8.2 大提无内毒素质粒	33
2.8.3 转染细胞	34
2.8.4 流式分选	34
2.8.5 挑取单克隆细胞鉴定	35
2.8.6 提取细胞 RNA	36
2.8.7 RNA 反转录	37
2.8.8 RT-QPCR	37
第三章 结果分析	39

3.1 2 型糖尿病和对照组人群样品收集及统计情况	39
3.2 2 型糖尿病 SNP rs10811660 的生物信息学分析	40
3.3 2 型糖尿病风险相关位点 rs10811660 的确认.....	41
3.4 SNP rs10811660 的功能研究	41
3.4.1 鉴定细胞中 rs10811660 的基因型	41
3.4.2 rs10811660 A/G 差异结合转录因子 MAFG	42
3.4.3 rs10811660 A/G 等位基因转录活性差异检测.....	43
3.4.4 敲低 MAFG 对靶基因转录水平的影响.....	45
3.4.5 敲除 rs10811660 对靶基因转录水平的影响	47
第四章 总结和讨论	51
参考文献	55
致谢	61

缩略语对照表

缩略语	英文名称	中文对照
<i>CDKN2A/2B</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A/2B
<i>CDKN2B-AS1</i>	<i>CDKN2B</i> antisense RNA 1	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2B 反义 RNA 1
FPG	fasting plasma glucose	空腹血浆葡萄糖
GWAS	Genome-wide association studies	全基因组关联分析
HbA1c	Hemoglobin A1C	糖化血红蛋白
IDF	The International Diabetes Federation	国际糖尿病联盟
OGTT	oral glucose tolerance test	口服葡萄糖耐量试验
OR	odds ratio	比值比
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
SNP	single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
TF	transcription factor	转录因子
T2DM	type 2 diabetes mellitus	2 型糖尿病
UKB	U.K.Biobank	英国生物样本库
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

第一章 绪论

1.1 糖尿病的相关研究

1.1.1 糖尿病的流行特点

随着经济的发展，我国生活水平越来越高，糖尿病成为非常常见的一种慢性疾病。2 型糖尿病（T2DM）是由遗传和环境因素共同作用的复杂疾病，其中，遗传因素在 T2DM 的发病过程中扮演着至关重要的角色^[1]。2 型糖尿病的遗传力在 30%-70%之间^[2]，常表现为家族聚集性。当家族中有人患有糖尿病，则亲属患糖尿病的风险将大大提高，有糖尿病家族史的人群是发生糖尿病的最主要以及最高风险的人群。

2 型糖尿病具有遗传易感性，2 型糖尿病的遗传易感性还存在着地区和种族差异^[3]。国际糖尿病联盟（IDF）数据显示，各国报道的糖尿病患病率差异较大，欧洲各国白人约为 3%-10%，美国白人约为 6.1%，黑人约为 9.9%，墨西哥人约为 12.6%，而美国土著印第安人则高达 50%。根据 2017 年版的中国 2 型糖尿病防治指南数据表明，中国各民族间的糖尿病患病率也存在较大差异，截止到 2020 年，汉族的糖尿病患病率最高，其次是满族、维吾尔族、壮族以及回族^[4]。

除了遗传因素，2 型糖尿病还跟一些外部环境因素有关，不健康的生活方式，比如缺乏锻炼，不健康的饮食导致肥胖，吸烟等，都会促进 2 型糖尿病的发生。糖尿病的发生与肥胖的持续时间和最高肥胖程度密切相关，肥胖主要是通过导致胰岛素抵抗来决定 2 型糖尿病发生的危险性，肥胖会增加 2 型糖尿病的患病率及危险性^[5]。糖尿病的发生机率也随年龄的增加而增加^[6]，年龄每增加十岁，糖尿病患病率上升约 1%。如今医疗科学的发展，人均寿命普遍延长，国家进入老年化社会，这也是糖尿病逐渐成为流行趋势的一个重要因素。糖尿病的发病率逐年升高^[7]，2011 年全球有 3.66 亿例糖尿病流行病例，预计到 2030 年将有 5.52 亿例糖尿病病例^[8]。尤其是在发展中国家增加速度将更快，2020 年中国糖尿病患者人数高达 1.3 亿，以 2 型糖尿病为主，且男性高于女性^[9]。

1.1.2 糖尿病相关组织的作用机制

糖尿病涉及到多个组织器官，糖尿病的发生可能是多种器官出现问题所致。如果胰腺出现问题，发生病变，那么胰岛素的合成会出现问题，会造成糖分、脂肪、蛋白质等代谢紊乱。除了胰腺，2型糖尿病也与肠胃、肝脏等器官密切相关（图1）。当肠胃、肝脏等器官出现问题，均会影响糖分的吸收和排除，从而引发糖尿病。

当我们进食后，食物被胃肠道消化，水解成葡萄糖，这个时候需要胰腺分泌胰岛素来与葡萄糖发生反应。整个过程需要肠道与胰腺进行配合，肠道会分泌一类激素，被称为肠促胰岛素。肠促胰岛素会刺激胰腺分泌胰岛素，促进血糖分解，降低血糖。除此之外，肠道中菌群对于2型糖尿病的发生也密切相关。不同品系的小鼠在高糖高脂饮食下，对胰岛素分泌和代谢紊乱的易感性不同。当交换他们肠道菌群后，小鼠对2型糖尿病的易感性也发生了变化，说明肠道菌群在2型糖尿病发生发展过程中也有潜在作用^[10]。Prevotella copri是人类肠道中普氏菌属中的一种细菌，在之前的研究中表明，当给小鼠喂养高脂饮食与Prevotella copri可显著引发小鼠胰岛素抵抗^[11]。所以当肠道出现病变或肠道菌群失调时，会影响胰岛素分泌，导致血糖异常，增加患2型糖尿病的风险。

肝脏可以储存糖原，并参与脂肪、蛋白质等变成葡萄糖的过程，是调节血糖的重要器官之一。当我们进食后，血糖浓度逐渐增高，有一部分血糖会通过肝脏转化为肝糖原，储存在肝脏中。当我们血糖降低时，肝糖原会转化为葡萄糖，维持血糖稳定。当肝脏出现病变，会影响正常的糖代谢，导致糖耐量异常。肝脏对胰岛素不敏感时，肝糖原合成的能力出现问题，导致肝糖原合成减少，糖异生转化增加，导致血糖明显升高。血糖升高，刺激胰岛 β 细胞的分泌，长期如此会导致胰岛功能出现问题，形成恶性循环，导致糖尿病的发生。在2型糖尿病发病的早期和中期，肝脏对于胰岛素的抵抗是形成高血糖的主要原因^[12]。

肌肉组织也是使用血糖的重要组织之一。肌肉组织细胞利用血糖，需要肌肉组织细胞上的胰岛素受体与胰岛素结合，才可以使血糖进入细胞中。如果胰岛素受体发生故障，血糖不能被肌肉细胞利用，产生胰岛素抵抗，也会导致血糖浓度升高。

脂肪组织也是一种内分泌器官，可以分泌多种脂肪因子来参与身体代谢，能量平衡。比如瘦素，是由脂肪细胞产生的蛋白质类激素。瘦素可以刺激葡萄糖转化、糖原

合成、脂肪形成；也可以调节胰岛素的合成、分泌。

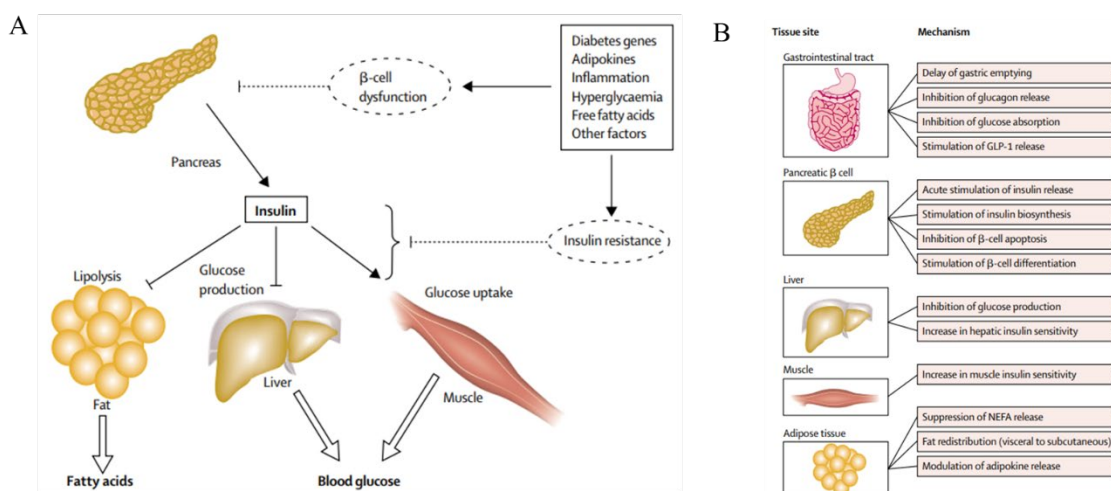


图 1 2 型糖尿病的病理生理涉及多个器官及其作用机制^[12]

附注：A：促进 2 型糖尿病的发病机制的因素会影响 β 细胞功能障碍，从而影响脂肪分解、肝糖原生成、肌细胞摄取葡萄糖，形成恶性循环。B：各组织应对高血糖的有效作用机制。

1.1.3 糖尿病的症状及诊断

糖尿病是由胰岛素绝对或相对缺乏或胰岛素抵抗引致的以高血糖为特征的代谢综合征^[13]。目前糖尿病的诊断标准是根据世界卫生组织（WHO）标准，也是国际通用的诊断标准和分类方法。首先是出现典型糖尿病症状“三多一少”，多饮、多尿、多食以及体重减少，再加上随机血糖 $\geq 11.1\text{mmol/L}$ 或空腹血糖（FPG） $\geq 7.0\text{mmol/L}$ ^[14]，或进行葡萄糖耐量试验（OGTT）2h 后血糖 $\geq 11.1\text{mmol/L}$ 或 HbA1c $\geq 6.5\%$ ^[15, 16]。两个指标联合检测，若同时达标即可诊断为糖尿病，若两个指标检测结果不一致，则需要进行复查。糖尿病的临床诊断依据的是静脉血浆血糖的检测结果^[17]。目前我国糖尿病的漏诊率较高，不能仅查空腹血糖。理想的调查是检查空腹血糖，同时检测葡萄糖耐量试验后 2h 血糖值^[18]。2011 年世界卫生组织建议采用糖化血红蛋白（HbA1c）来诊断糖尿病，诊断切点为 HbA1c $\geq 6.5\%$ ^[19]。糖基化血红蛋白是葡萄糖分子和血红蛋白 A 组分的特殊分子部位经过缓慢而不可逆的非酶促反应形成的产物。在红细胞中，葡萄糖的摄取无需胰岛素介导，红细胞内葡萄糖浓度随血糖的升高而升高，与血浆葡萄糖水平达到平衡。糖化血红蛋白的水平与红细胞暴露于高血糖的时间和高血糖的程度有关。与 FPG 相比，HbA1c 是一项更稳定的生物学指标，因为 HbA1c 反映的是慢性

血糖水平，而 FPG 反映的是急性血糖浓度，波动较大^[20]。HbA1c 更有助于 2 型糖尿病的诊断，已经成为评估长期血糖控制情况的金标准，也是临床治疗的重要依据。

1.1.4 糖尿病的并发症

糖尿病引发的高血糖是由于胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损，或两者并存所致。长期高血糖会导致各种组织，特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害、功能障碍。

糖尿病的症状分为两大类：一大类是代谢紊乱，出现“三多一少”的现象。患者血糖过高，葡萄糖不能完全被肾小管吸收，形成渗透性利尿，血糖越高，排尿就越多；高血糖使血浆渗透压增高，再加上多尿，水分流失过多，导致多饮；多食的机制尚不清楚，多数学者认为是进出组织细胞前后动静脉血中葡萄糖浓度差（葡萄糖利用率）减小，刺激了摄食中枢，产生饥饿感；患者身体不能充分利用葡萄糖，所以去分解脂肪和蛋白质来产生能量，导致体重减轻。另一大类是各种急性、慢性并发症。2 型糖尿病常见的急性并发症是糖尿病高渗非酮症昏迷；慢性并发症涉及到全身各个组织器官，慢性并发症往往是糖尿病患者致死的主要原因。慢性并发症主要有心脏病、高血压、糖尿病肾小球硬化症、糖尿病眼病、糖尿病神经病变、脑血管病等^[21]。心脏病主要包括冠心病以及糖尿病心肌病等，这些疾病的病因跟高血糖、高血压有关，还与脂质代谢异常、脉粥样硬化性、血液流变异常、胰岛素抵抗或高胰岛素血症等有关。糖尿病眼部并发症主要有糖尿病视网膜病变、糖尿病性白内障、青光眼、糖尿病性虹膜睫状体炎等。糖尿病作为系统性疾病，影响全身各个组织器官，神经系统是最容易被累及的。从中枢神经系统到周围神经都会受到影响，但其发病机制尚不明确，一般认为可能与神经缺血和压迫有关。脑血管病变的病理基础多为动脉粥样硬化，主要危险因素与高血糖、高血压、脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗及高胰岛素血症等有关。这些疾病的发病因素息息相关，归根结底是因为胰岛素抵抗或者胰岛素分泌缺陷，导致高血糖。糖尿病还会引起一些皮肤病变，目前对其作用机制尚不明确。

1.1.5 糖尿病的治疗

目前糖尿病尚不能完全治愈，属于终身疾病，需要终身治疗。所以糖尿病患者需要进行长期的药物治疗以及配合饮食治疗和运动治疗。

一般建议在发病开始病症较轻的时候可以通过饮食和运动来控制血糖。保持平衡

且有规律的健康饮食和适度的锻炼有利于血糖、血脂、血压的控制、减少发生肥胖的概率以及减少糖尿病并发症的发生。饮食治疗是一种基本的治疗方法，饮食要控制总热量，碳水化合物供给量应占总热量的 55%-65%，蛋白质摄入量应占总热量的 15%-20%，脂肪摄入量占总热量的 20%-25%。适当补充膳食纤维，维生素和微量元素，减少钠的摄入，尽量少或不饮酒和吸烟。糖尿病患者不能吃糖，可以用甜味剂来代替糖，每日用量不超过 50g。运动对于糖尿病患者是有很多益处的，但是需要根据自身情况，科学合理的运动避免剧烈运动。不宜在空腹或餐后立即运动，一般建议在餐后 30min-1h 后运动为宜，每周运动时间不少于 150min。

往往过几个月后，饮食和运动来控制血糖的效果会慢慢变得并不显著，只靠饮食和运动是不够控制的，需要开始口服抗糖尿病药物治疗或胰岛素。降糖药一般有磺酰脲类，双胍类， α -葡萄糖苷酶抑制剂，噻唑烷二酮类药物等。二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的常见药物，服用二甲双胍可以抑制肝脏的葡萄糖产生，增加肝脏胰岛素敏感性；也可调节肠道菌群。如果口服降糖药物控制不佳者、或对口服药有禁忌症者，则需要进行胰岛素治疗。

1.2 SNP 相关研究

1.2.1 SNP 的定义及功能

SNP 即单核苷酸多态性，指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种^[22]。人类所有群体中存在大约 1500 万个 SNP 位点（稀有 SNP 位点的频率至少为 1%），平均约每 300-600bp 存在一个碱基突变^[23]。在基因组 DNA 中，任何碱基均有可能发生变异。SNPs 位于基因的编码区或非编码区^[24]，是人类基因组中疾病易感基因的遗传标记，甚至是可以影响癌症、心脏病、糖尿病与其他常见病的易感性基因位点^[25]。

当 SNP 位于编码区时，当发生同义突变，不会改变蛋白质序列。但由于蛋白质翻译存在密码子偏好性，由常用的密码子变成不常用的密码子，核糖体通过 SNP 周围的 mRNA 片段时速度发生了变化，而细胞内的折叠过程与翻译一般是同步进行的，SNP 会影响蛋白质折叠和其转移到细胞膜的时间，从而改变蛋白质的空间结构和功能^[26]。当发生错义突变会直接改变氨基酸的组成；发生无义突变时，密码子变成终

止密码子，肽链合成提前结束；终止密码子发生突变，导致肽链继续延长，这些都会导致蛋白质的序列改变，从而影响其空间结构，影响蛋白质的稳定性及其行使的功能。

非编码区包含内含子、启动子、增强子等。内含子区域的 SNP 会影响 mRNA 的剪接位点活性来影响基因功能^[27]。在之前的研究中，肌萎缩蛋白（Dystrophin）基因的第 32 号内含子中 SNP 会使剪接位点失活，导致 32 号外显子 3' 末端丢失了 98bp 的碱基或者 32 和 33 号外显子之间有 28bp 的内含子残留^[28]。位于基因调控区域的 SNP，可以影响调控因子的结合位点，比如转录因子结合位点，miRNA 结合位点等。SNP 碱基的改变，导致调控因子的结合能力发生改变，从而对基因表达水平产生影响，最终影响疾病的易感性。比如在之前的研究中，位于 1p36.12 基因间的 SNP rs6426749，当 SNP rs6426749 为 G 等位基因时，招募转录因子 TFAP2A，并与其结合，提高了含有 SNP rs6426749 基因组的增强子活性，增加 *LINC00339*（长基因间非蛋白编码 RNA 339）的表达（图 2）。过表达的 *LINC00339* 反而抑制 *CDC42*（细胞分裂周期 42）的表达，当 *CDC42* 的表达水平降低，会促使骨密度降低，增加骨质疏松的发生率。反之，当 rs6426749 为 C 等位基因时，缺失与 TFAP2A 的结合，导致 *LINC00339* 的表达降低，增加 *CDC42* 的表达，降低骨质疏松症的发病风险^[29]。大多数与疾病相关的 SNP 都定位在非编码序列上^[30]。

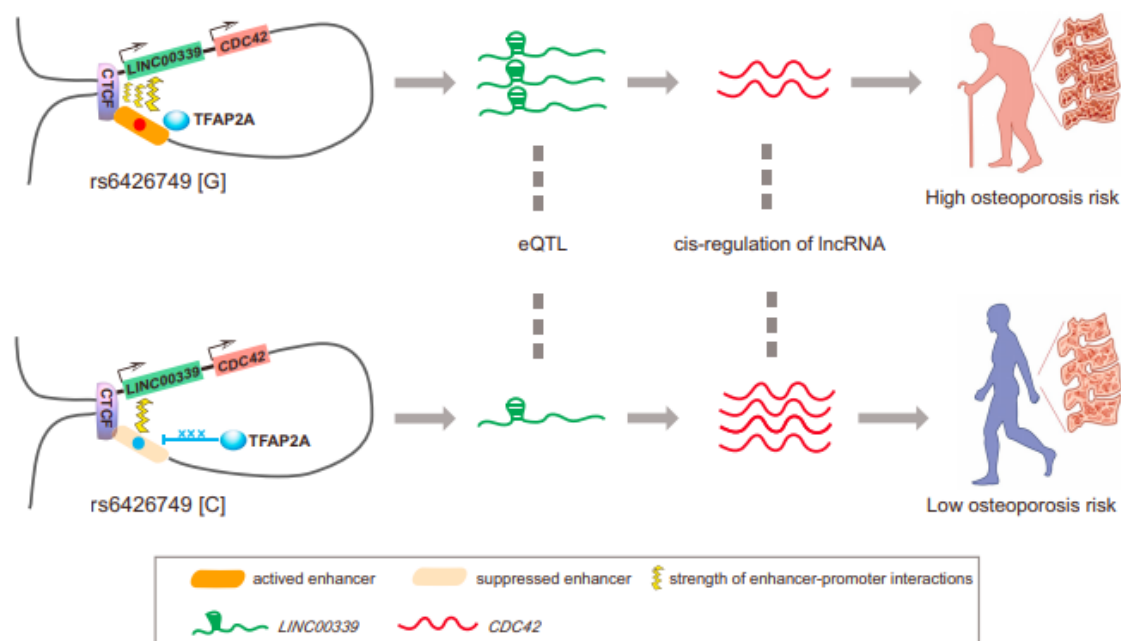


图 2 rs6426749、*LINC00339* 和 *CDC42* 之间的潜在调控模型^[29]

1.2.2 SNP 与 2 型糖尿病的研究现状

人与人之间 99%以上的 DNA 序列是一样的，但是也存在一定的差异，单核苷酸多态性就是形成差异的因素之一，所以单核苷酸多态性在遗传上的差异因素显得尤为重要。就是因为这些差异，造成了人们患某种疾病的风险不同和对药物以及环境的反应不同^[31]。遗传学中通过全基因组关联分析这个方法可以找到 SNP 与疾病之间的风险关联性。通过比较患者和正常人群的 SNPs 的频率，在频率有差异的染色体区域或者周围，就有可能包含疾病相关的基因^[32,33]。

此前，许多 2 型糖尿病的易感位点已被全基因组关联研究成功识别和复制^[34]。在过去的 20 年里，连锁分析、候选基因方法和大规模的 GWAS 已经成功地在世界主要种族人群中鉴定出了 100 多个 2 型糖尿病易感性基因，其中大部分是在欧洲人群中发现的^[35-37]。然而，这些来自欧洲的基因座中只有不到 50%在东亚人群中被成功确认^[38]。全球已经定位超过 200 个 2 型糖尿病易感位点，其中仅 30% 在中国人群中得到验证^[39]。例如，*IGF2BP2* 位点上的两个已知风险变异 SNP rs4402960 和 rs1470579 只在白种人中与 T2DM 相关^[40]，而在汉族或非裔美国人中则没有^[41-43]。复制研究的失败可能是由于不同种族的等位基因频率和效应大小的差异。由于不同人群中 SNP 最小等位基因频率的差异，来自不同种族的 GWAS 通常识别出不同的风险位点^[44]，因果突变应该在不同的人群中发挥同等的影响^[45]。

因此，有必要在其他种族人群中识别与 2 型糖尿病相关的特定基因。尽管许多基因位点已被证明与 2 型糖尿病的易感性有关，但是这些 SNPs 的机制作用仍然很不明确，特别是位于非编码区的 SNPs^[46]，所以需要找到 SNP 致病的分子机理。大多数 2 型糖尿病位点位于与 β 细胞功能相关的基因附近，对胰岛素的作用产生影响，所以 β 细胞功能障碍在 2 型糖尿病发病机制中有重要作用。例如 SNP rs7074440，这个位点与 T2DM 风险相关，并且能影响 ATF3 的结合，而 ATF3 是应激诱导的 β 细胞凋亡中激活的一种 bZIP 转录因子^[47]，被认为是糖和脂质代谢的主要调节因子^[48]。

GWAS 的发现仍存在争议，因为目前确定的关联位点只能解释了不到 10%的 T2DM 遗传性^[49]，并且 GWAS 在确定这些相关变异介导其对疾病风险影响的机制方面进展缓慢。因此需要进行深入研究，进一步确定 2 型糖尿病的因果变异、表观遗传修饰、基因与基因之间的相互作用和基因与环境的相互作用，并将新发现转化为临床

应用^[50]。

1.3 研究背景

有研究表明，在转录因子结合位点中，有 2 型糖尿病的相关变异富集。SNP-SELEX 是基于 HT-SELEX 技术进行改造，可以直接分析 SNP 对转录因子的影响。合成包含带有研究的 SNP 位点及其附近基因组序列的片段，在体外表达纯化转录因子蛋白，将纯化的转录因子蛋白与合成的片段进行结合，经过高通量测序技术，定量分析转录因子与 DNA 序列结合的特异性。

本研究组通过 SNP-SELEX 技术前期定量分析了 270 个转录因子与接近十万个非编码 SNP 结合时，发现了 11079 个影响转录因子结合力的单核苷酸多态性位点^[51]。这些 SNPs 的不同等位基因会对转录因子的结合力产生影响，进而可能影响基因的表达调控，为解释非编码 SNP 的分子机理以及疾病的机理和疾病的遗传模型提供了重要的理论依据。因此这些 SNPs 是潜在的分子水平上的“功能 SNP”位点。将这些“功能 SNP”与 2 型糖尿病风险相关位点相结合进行分析，有助于发现有生物学功能的 2 型糖尿病风险相关位点，为以转录因子为切入点研究 2 型糖尿病的分子机理奠定基础，将会推动糖尿病的分子机制研究，有助于阐明 2 型糖尿病的致病机制，对糖尿病的预防和治疗具有重要意义，而且有望为易感人群筛查及早期防治创造条件。

英国生物库是一个大规模的生物医学数据库，研究对象是英国各地大约 50 万名受试者，招募时的年龄在 40-69 岁之间，数据库含有每个受试者的健康相关信息及遗传信息^[52]。我们通过用影响转录因子结合力的 SNPs 位点数据和 UKB 中的糖尿病患者和非糖尿病对照样本，进行回归分析，得到了既影响转录因子结合力又与 2 型糖尿病相关的 305 个 SNP 位点。rs10811660 在其中是一个差异极显著的位点，并且 rs10811660 这个位点曾被报道与 2 型糖尿病相关^[53]，但是并没有其相关分子功能的研究。rs10811660 所在的序列是转录因子 MAFG 倾向结合的基序。在代谢疾病中，比如 2 型糖尿病，MAFG 是肝脏中富含能量营养状态的调节器^[5]。MAFG 在肝脏葡萄糖代谢中起负作用，MAFG 缺失可以阻止胰岛素刺激的 mTORC1 信号的激活肝细胞中的蛋白质翻译。

在之前的研究中发现 *CDKN2A/B* rs10811661 多态性与 2 型糖尿病的风险之间存在

在显著的相关性^[53, 54], rs10811661 这个位点的不同基因型携带者之间, β 细胞功能有显著差异, 同时 *CDKN2A/CDKN2B* 基因多态性与磺酰脲类药物的疗效有关, 并且在中国糖尿病患者中, *CDKN2A/B* 基因单核苷酸多态性也与冠心病相关。之前的多项研究也报道了 *CDKN2B-AS1* 与 T2DM 的风险相关^[55, 56]。在临床研究报道中, 在 2 型糖尿病和 T2DM-cad (冠心病) 患者中观察到 *CDKN2A* 和 *CDKN2B* 的 mRNA 减少, 这可能与它们在调节胰岛 β 细胞数量和代谢相关细胞类型增殖中的作用相关^[57, 58]。而位点 rs10811661 位于 rs10811660 的下游, 这两个位点完全连锁, 所以我们的研究都将围绕 rs10811660 和转录因子 MAFG 展开。

第二章 实验材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要实验仪器

表 1 仪器与amp;设备

名称	生产厂家	设备型号
常温离心机	Eppendorf	Centrifuge5425/5810
4℃离心机	Eppendorf	Centrifuge5424R/5810R
4℃冰箱	Haier	HYC-650
-20℃冰箱	Haier	DW-25L262
-80℃冰箱	Haier	DW-86L262
金属浴	Eppendorf	ThermoMixerC
恒温培养摇床	Bluepard	THZ-300C
PCR 仪	Bio-Rad	C1000Touch
凝胶成像仪	赛智	Champge16000
电泳仪	Bio-Rad	043BR64657
涡旋混匀器	Kylin-Bell	BE-1100
灭菌锅	YAMATO	SN510C
Vortex	Scientific Industries	Vortex-Genie2
电子天平	ME4002E	梅特勒
移液器	赛多利斯	Mline
超净工作台	Airtech	SW-CJ-1FD
生物安全柜	Airtech	BSC-1004IIA2
超微量分光光度计	K5800	凯奥
制冰机	MF26	Scotsman
二氧化碳培养箱	赛默飞	311
荧光定量 PCR 仪	赛默飞	QuantStudio3
超纯水机	默克	Milli-QAdvantage
水浴锅	Bluepard	BWS-5
酶标仪	赛默飞	Multiskan FC
超声破碎仪	Covaris	M220

2.1.2 实验试剂及试剂盒

1.常用试剂制备

LB 液体培养基制备：用电子天平称取 Tryptone 1g, NaCl 1g, Yeast Extract 0.5g, 加入超纯水，定容至 100mL，高温高压灭菌，冷却后置于 4℃冰箱中保存。后续根据实验要求，在超净工作台中添加相应的抗生素。

LB 固体培养基制备：用电子天平称取 Tryptone 1g, NaCl 1g, Yeast Extract 0.5g, Agar 1.5g, 加入超纯水，定容至 100mL，高温高压灭菌。室温冷却到 60℃左右时，在灭过菌的超净工作台中，根据实验要求在培养基中添加相应的抗生素，摇匀后，将培养基倒入培养皿中，每个培养皿倒入大约 15mL 培养基，待培养皿中的培养基凝固，置于 4℃冰箱中保存。

50×TAE 缓冲液：称取 Tris 242g, EDTA 37.2g, 先加入 800mL 超纯水，充分搅拌溶解，再加入 57.1mL 冰乙酸，充分混匀，再加入超纯水，定容至 1L，室温保存。配置电泳缓冲液时，需将 50×TAE 稀释成 1×TAE，取 20mL 50×TAE，加入超纯水，定容至 1L，即可用于凝胶电泳。

50%甘油：50mL 超纯水+50mL 甘油，混匀后高温高压灭菌，常温保存。

2.常用试剂盒

表 2 实验常用试剂盒

试剂盒	生产厂家	产品编号
质粒 DNA 微量提取试剂盒	Magen	P1001-02C
凝胶 DNA 小量回收试剂盒	Magen	D2111-02
低内毒素质粒大提试剂盒	Magen	P1114-02
血液基因组 DNA 提取试剂盒	TIANGEN	DP348-03
血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒	TIANGEN	DP304-03
反转录试剂盒	Vazyme	R233-01
点突变试剂盒	Vazyme	C214-01

2.1.3 实验所用菌株、细胞株及载体

菌株：大肠杆菌 DH5 α

细胞株：人肝癌细胞 BEL-7404、BEL-7402、Huh-7、SMMC-7721、HepG2、HepG3B，人结肠癌细胞 HCT116、LoVo、RKO，人正常结肠上皮细胞 NCM-460，人

正常肠上皮细胞 HIEC，人正常肝细胞 LO2，人高转移肝癌细胞 LM3、97-H，人低转移肝癌细胞 97-L，人克隆结肠腺癌细胞 Caco-2

载体：pGL4.74、pGL4.23、px333-EGFP-Puro（结构如图 3-5 所示）

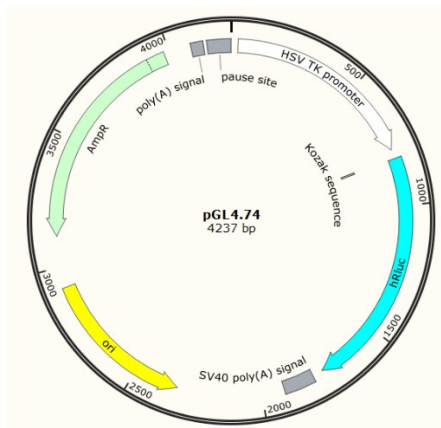


图 3 pGL4.74 载体（在双荧光素报告系统中使用）

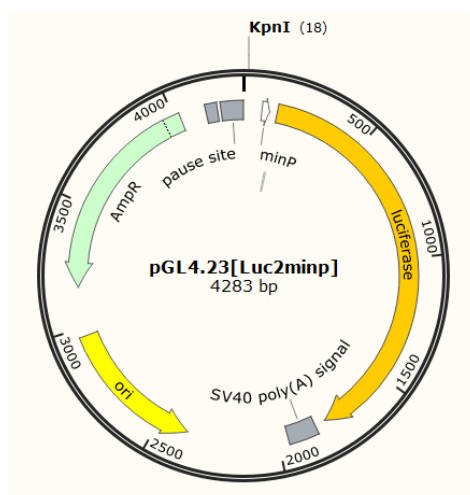


图 4 pGL4.23 载体（用于构建 pGL4.23-10811660-A/G,在双荧光素报告系统中使用）

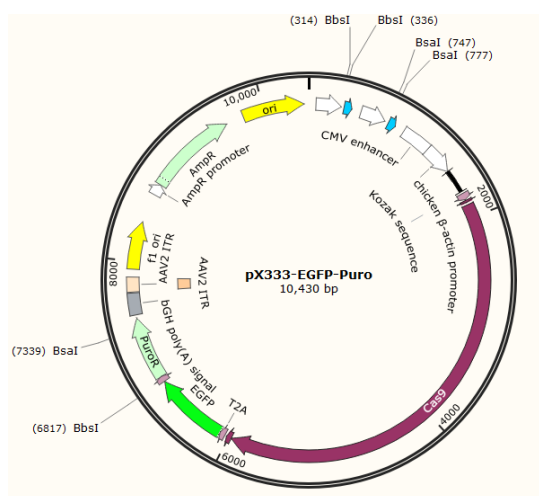


图 5 px333-EGFP-Puro（用于构建双 sgRNA 的 CRISPR 载体）

2.1.4 引物序列及其他核苷酸序列

表 3 本研究所用引序列

引物名称	核苷酸序列 (5'-3')	引物大小
rs10811660-F	ACCAACCTTCAGCCACCTCT	20
rs10811660-R	TGGGTAGGAGGAGCCAGAAG	20
rs10811660-chip-A-R	TAAAGCTGGAGGTGAGCTGA	20
rs10811660-chip-G-R	TAAAGCTGGAGGTGAGCTGG	20
pGL4.23-rs10811660-F	ctggcctaactggcc ACCAACCTTCAGCCACCTCT	35
pGL4.23-rs10811660-R	ccagatcttgatac TGGGTAGGAGGAGCCAGAAG	35
rs10811660-MUT-F	TTCTTGCCCTGTCAGCAGCTCACCTCCAGCTTTA G	35
rs10811660-MUT-R	AGCTGGTGACAGGGCAAGAACGCTTATTGACA AAG	35
rs10811660-dankelong-F	CTGTGAGAAACAGAGGTTCAAGG	23
rs10811660-dankelong-R	GATGGAGCTTCACTCTTGTCG	21
rs10811660-sgRNA1-F	caccg GTGCTTTCAAGTCTGTTAAC	25
rs10811660-sgRNA1-R	aaac GTTAACAGACTTGAAAGCAC c	25
rs10811660-sgRNA2-F	caccg GTCAAAAACCTTCCCCATCC	25
rs10811660-sgRNA2-R	aaac GGATGGGGAAGGTTTTTGAC c	25
human- MAFG-siRNA-3-F	GCUGUUGACUCUUGUCAUUTT	21
human- MAFG-siRNA-3-R	AAUGACAAGAGUCAACAGCTT	21
human- MAFG-siRNA-4-F	GCGUCAUCACAAUAGUAAATT	21
human- MAFG-siRNA-4-R	UUUACUAUUGUGAUGACGCTT	21
ACTB-qpcr-F	GTTGCTATCCAGGCTGTGCT	20
ACTB-qpcr-R	GAGGGCATACCCCTCGTAGA	20
MAFG-qpcr-F	gaggcaccatcaactgtca	22
MAFG-qpcr-R	cctgtttctccccactccga	20
CDKN2A-qpcr-F	gctgccaacgcaccgaat	19
CDKN2A -qpcr-R	cccctgcaactctgcctcc	21
CDKN2B-qpcr-F	cttaaatgtagcaatggcact	21
CDKN2B -qpcr-R	atagtaggacatcccacgag	20
CDKN2B -AS1-qpcr-F	agcctcattctgattcaacagc	22
CDKN2B -AS1-qpcr-R	tccaaatagatctccccggtt	21
CMV-enhancer-R	cccagtagatgaccttatgg	20

2.2 收集糖尿病患者和非糖尿病患者的血样

2.2.1 收集血样标准

每周携带放有冰袋的保温盒到唐都医院领取 2 型糖尿病患者血样；糖尿病空腹血糖大于 7.0mmol/L，静脉血体外两个小时最多消耗 0.96mmol/L 血糖^[59]。所以我们同时使用血糖检测仪选取当天门诊的空腹血糖正常 (<6.1mmol/L) 人群血样，作为对照。

2.2.2 记录样品信息

记录 2 型糖尿病样品受试者的年龄、性别、病历编号信息，同时记录正常对照人群血糖的年龄、性别、病历编号信息。除去信息重复样品，重新编号，录入电子文档。

2.2.3 提取血样的 DNA

使用天根生物科技有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒 (DP348)，提取样品 DNA。

- 1.将采血管上下颠倒 5 次，混匀血液，吸取 900 μ L 血液到 2mL 离心管中，加入 900 μ L 细胞裂解液 CL，上下颠倒 10 次，混匀。
- 2.10000rpm 离心 2min，弃掉多余上清。
- 3.加入 200 μ L 缓冲液 GS，涡旋振荡 15sec，再用 200 μ L 枪头反复吹打沉淀，直至沉淀成絮状散开。
- 4.加入 20 μ L Proteinase K 溶液，涡旋混匀。
- 5.加 200 μ L 缓冲液 GB，上下颠倒 10 次，混匀，56 $^{\circ}$ C 600 振/min 放置 30min，每隔 10 min 上下颠倒混匀一次。
- 6.室温放置 2-5min，加 350 μ L 缓冲液 BD，上下颠倒 10 次，混匀。
- 7.将混合液加入到吸附柱 CG2 中，12,000 rpm 离心 2min，倒掉离心下来的废液，将吸附柱 CG2 放入收集管中。糖尿病血样可将废液再倒回原管，重新离心一次。
- 8.向吸附柱 CG2 中加入 500 μ L 缓冲液 GDB，12,000rpm 离心 30sec，倒掉离心下来的废液，将吸附柱 CG2 放入收集管中。
- 9.向吸附柱 CG2 中加入 600 μ L 漂洗液 PWB，12,000rpm 离心 30sec，倒掉离心

下来的废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。

10.重复操作上一步骤。

11.12,000rpm 离心 2min，弃掉吸附柱离心下来的废液，将吸附柱放置到新 1.5ml 离心管上，室温静置 5min，彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

12.向吸附膜中间位置悬空滴加 70 μ L 洗脱缓冲液 TB，室温放置 5min，12,000 rpm，离心 2 min。

13.将离心得到的溶液再加入吸附柱 CG2 中，室温放置 2min，12,000rpm 离心 2min，收集血液 DNA 溶液。

14.取 2 μ L 跑琼脂糖凝胶进行电泳，检测 DNA 的浓度和纯度。提取后的 DNA 放置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待用。

2.3 DNA 样品的测序和统计分析

2.3.1 测序方法-SNPscan

我们把目前已收集到的 T2DM 病人血液样品 734 个和正常对照样品 984 个送到上海天昊生物科技有限公司进行 SNP 基因分型，采用的 SNPscan 技术能在一个检测流程中同时实现对多个 SNP 位点等位基因进行识别和分型^[60]。该技术的原理是通过探针末段引入不同长度的非特异序列，每个位点得到不同长度的连接产物，再利用标记荧光的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增，通过荧光毛细管电泳对不同长度的扩增产物进行分离，最后对连接产物的峰谱进行分析，确定不同位点的基因型。

2.3.2 卡方检验该位点的显著性

我们从测序公司得到每个样品的 SNP 基因型，通过卡方检验，一个 2 \times 2 列联表的独立性检验，计算每个 SNP 的两个等位碱基的数目在糖尿病患者和正常人群中是否有显著差异。计算比值比，即 OR 值，OR 值可以反映某种因素跟疾病之间的联系强度，比如我们要鉴别一个 SNP 的等位基因跟疾病之间的关系，需要分别计算出等位基因在疾病组和对照组的比值，再将计算 OR 值，若 OR 值为 1，则说明该等位基因对疾病不起作用；若 OR 值为小于 1，则说明该等位基因对于疾病来说是保护碱基；若 OR 值大于 1，则说明该等位基因对于疾病来说是风险碱基。通过计算 OR 值，确定每个 SNP 的风险碱基和保护碱基。

2.4 确定 rs10811660 所在位置是杂合子的细胞

2.4.1 提取细胞系基因组

1.首先用 PBS 清洗贴壁细胞两次，再添加胰酶，放进 37℃培养箱进行消化，待细胞变圆变亮，加入 4 倍胰酶体积的培养基吹打细胞，使细胞悬浮并且分散成单个细胞，将细胞悬浮液收集到 1.5ml 离心管中，800rpm 离心 3min，弃上清，收集细胞沉淀，加入 200μL 缓冲液 GA 重新悬浮细胞。

2.加入 20μL Proteinase K 溶液混匀，再加入 200μL 缓冲液 GB，涡旋振荡使之充分混匀，此时会有白色沉淀出现，再把样品置于 70℃金属浴中放置 10-30min，直至白色沉淀消失，溶液变清亮。

3.加入 200μL 无水乙醇，涡旋振荡，使之充分混匀。

4.把上一步混合均匀的溶液转移至 CB3 吸附柱中，12000rpm 离心 30s，弃掉吸附柱离心下来的废液。

5.向吸附柱中加入 500μL 缓冲液 GD，12000rpm 离心 30s，弃掉吸附柱离心下来的废液。

6.向吸附柱中加入 600μL 漂洗液 PW，12000rpm 离心 30s，弃掉吸附柱离心下来的废液。

7.重复操作上一步骤。

8.12000rpm 离心 2min，弃掉吸附柱离心下来的废液，将吸附柱放置到新 1.5ml 离心管上，室温静置 5min，彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

9.向吸附柱中悬空滴加 50μL 水，室温放置 2min，12000rpm 离心 2min，收集 DNA 溶液，-20℃保存。

2.4.2 设计引物，PCR 扩增所选 SNPs 位点片段，送测

在 rs10811660 这个 SNP 位点上下游各设计一条合适的引物 rs10811660-F 和 rs10811660-R，分别用 16 种细胞系的 DNA 当模板，扩增含有这个 SNP 的基因组片段，扩增出来片段长 347bp，再将扩增出来的片段送到公司测序，确定每个细胞系关于这个 SNP 位点的基因型。扩增体系如下：

细胞 DNA：100ng

引物 1 (10 μ M): 1 μ L
 引物 2 (10 μ M): 1 μ L
 2 \times Taq Master Mix : 10 μ L
 无菌水 : 补足至 20 μ L
 反应体系如下:

95 $^{\circ}$ C 5min	
95 $^{\circ}$ C 30s	} 35cycles
55 $^{\circ}$ C 30s	
72 $^{\circ}$ C 60s	
72 $^{\circ}$ C 5min	
12 $^{\circ}$ C forever	

2.5 检测 TF 在 rs10811660 不同 allele 富集

2.5.1 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

用 rs10811660 所在位置是杂合子的人肝癌细胞 BEL-7404 进行 ChIP 实验。

1.第一天, 固定细胞: 将 10cm 培养皿里的培养基弃去, 换上 8mL 新鲜的并且已经预热的 DMEM 培养基, 加入 216 μ L 的 37%甲醛, 边摇边加, 摇晃 10min。

2.再加入 500 μ L 2M Gly, 边摇边加, 摇晃 5min。

3.将培养皿中的溶液弃掉, 将培养皿放在冰上, 用预冷的 PBS 清洗两遍 (以下操作均在冰上进行)。

4.在培养皿中加入 5mL PBS, 用细胞铲刮下细胞, 用移液枪将细胞悬液转移至 15mL 离心管中 (枪头用 0.5% BSA 润洗), 4 $^{\circ}$ C离心机中 500g 离心 5min, 弃上清。

5.加入 2mL PBS, 用枪头吹打混匀细胞沉淀 (枪头用 0.5% BSA 润洗), 再添加 PBS 补足至 10mL, 4 $^{\circ}$ C离心机中 500g 离心 5min, 弃上清。

6.加入 2mL Hypotonic, 用枪头吹打混匀细胞沉淀 (枪头用 0.5% BSA 润洗), 添加 Hypotonic 补足至 10mL, 再添加 200 μ L PPI 和 10 μ L DTT, 放在 4 $^{\circ}$ C摇床上慢摇 15min, 4 $^{\circ}$ C离心机中 500g 离心 5min, 弃上清。

7.加入 RIPA 重悬细胞, 并加入 50 \times PPI, 用 covaris 超声, 超声后的产物用 4 $^{\circ}$ C

离心机中 20000g 离心 10min，取上清，先用液氮速冻，再放-80℃保存。

8.取 beads，加入 1mLRIPA，用 RIPA 清洗 beads，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转 5min 后，4℃离心机中 800rpm 离心 2min。

9.重复上一步骤三次，即用 RIPA 清洗三次 beads。

10.将超声后的样品上清转移至 2mL EP 管中，再添加 RIPA 补至 1.7-1.8mL，再加入 40μL 的 50×PPI（终体积为 2mL）。

11.再加入 30μL 洗好的 beads，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转 2-3h 后，4℃离心机中 800rpm 离心 2min。

12.离心后，取 30μL 的上清作为 Input，4℃保存。

13.剩余的上清平均分成两管，一管加入 2μL IgG 抗体，另一管加入 2μL MAFG 抗体，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转过夜。

14.剩余的 beads 添加 RIPA 补至 1.4mL，再加入 150μL 的 5% BSA，使终浓度为 0.5%BSA，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转过夜。

15.第二天，将过夜处理的 beads，4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清。

16.向 beads 中加入 RIPA，平均分装到加入两种抗体过夜处理的管子中，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转孵育 2h。

17. 4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清，加入 1mL RIPA，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转 5min。

18.重复上一步骤三次。

19. 4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清，加入 1mL RIPA+0.5M NaCl，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转 5min。

20.重复上一步骤两次。

21. 4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清，加入 1mL LiCl buffer，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器旋转 5min。

22. 4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清，加入 1mL TE buffer，放在 4℃冰柜里，在涡旋混匀器上旋转 5min。

23.重复上一步骤两次。

24. 4℃离心机中 800rpm 离心 2min，弃上清。依次加入 150μL Extraction，

12 μ L 5M NaCl, 1 μ L RNaseA, 放在金属浴上 37 $^{\circ}$ C 900 振/min 孵育 1h。

25.取出 Input, 在实验组和 Input 中依次加入 150 μ L Extraction, 12 μ L 5M NaCl, 1 μ L RNaseA, 放在金属浴上 37 $^{\circ}$ C 900 振/min 孵育 1h。

26.取出孵育的样品加入 2 μ L Protein K, 放在金属浴上 65 $^{\circ}$ C 900 振/min 孵育过夜。

27. 第三天, 取出过夜的样品, 短暂离心, 加入 300 μ L phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 涡旋振荡混匀。

28. 4 $^{\circ}$ C离心机中 20000g 离心 10min, 吸 150 μ L 上清, 依次加入 550 μ L EtOH, 5 μ L Glycogen, 75 μ L 3M NaAc, 并且加入一种试剂立即混匀后再加入下一个试剂。

29. -80 $^{\circ}$ C冰箱放置 30min 以上。

30. 4 $^{\circ}$ C离心机中 20000g 离心 20min, 弃掉上清, 加入 1mL 预冷的 75%无水乙醇, 上下颠倒, 悬浮沉淀。

31.4 $^{\circ}$ C离心机中 20000g 离心 10min, 弃掉上清。

32.室温静置, 直至 EP 管底部白色沉淀变透明, 加入 30 μ L DEPC 水溶解底部透明沉淀。

33.取 1 μ L 样品测浓度, 其余放置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

2.5.2 运用链特异性 PCR 的方法, 进行 qPCR

1.设计 qPCR 引物, rs10811660-chip-A-R 和 rs10811660-chip-G-R, 分别和 rs10881160-F 进行 qPCR。

2.qPCR 反应体系如下:

2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix: 10 μ L

Primer1 (10 μ M): 0.4 μ L

Primer2 (10 μ M): 0.4 μ L

Template DNA : 3 μ L

无菌水: 补足至 20 μ L

反应程序如下:

95°C 30s
 95°C 10s } 40cycles
 60°C 30s }
 95°C 15s
 60°C 1min
 95°C 15s

2.6 检测 rs10811660 不同等位基因是否有转录差异

2.6.1 构建双荧光素报告系统载体

从公司购买双荧光素报告系统所需要的载体 pGL4.23 和 pGL4.74，对 pGL4.23 进行改造，将含有 rs10811660 位点的片段插入到 pGL4.23 中。

1.用 KpnI、XhoI酶切 pGL4.23，37°C酶切 1h，酶切体系如下：

载体：1μg

KpnI酶：1μL

XhoI酶：1μL

10×cutsmart Buffer：5μL

无菌水：补足至 50μL

2.将酶切产物全部进行胶回收，使用浓度为 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳，随后把目的条带切割下来，使用 Magen 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。

3.称取凝胶重量，每 100mg 凝胶加入 100μL Buffer GDP，放入 55°C的金属浴中，让凝胶完全溶解。

4.将溶胶液转移至柱子中，12000g 离心 30s。

5.倒掉废液，加入 300μL Buffer GDP 至柱子中，静置 1min，12000g 离心 30s。

6.倒掉废液，加入 600μL Buffer DW2 至柱子中，12000g 离心 30s。

7.倒掉废液，加入 300μL Buffer DW2 至柱子中，12000g 离心 2min。

8.将吸附柱放置到新 1.5ml 离心管上，室温静置 5min，彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

9.向吸附柱中悬空滴加 20μL 水，室温放置 2min，12000g 离心 2min，收集溶

液，样品可于-20℃保存（若要提高产量可以重复第9步骤进行第二次洗脱）。

10. 设计含有载体 pGL4.23 序列的同源臂引物 pGL4.23-rs10811660-F 和 pGL4.23-rs10811660-R，将含有 rs10811660 的片段扩增出来。

11. 扩增插入片段的模板用的是 NCM460 细胞的 DNA，扩出来的片段上 SNP rs10811660 的碱基是 A，接下来进行点突变，将 A 碱基换成 G 碱基。

12. 将扩增的片段全部进行电泳，然后用 Magen 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。

13. 将扩增出来的片段与酶切过的载体进行同源重组，同源重组反应体系如下：

线性化载体：30ng

插入片段：10ng

2×ClonExpress Mix：5μL

无菌水：补足至 10μL

14. 用移液枪将液体轻轻吹打混匀，放入 PCR 仪中 50℃反应 5min 后立即置于冰上冷却。

15. 将 DH5α 感受态细胞置于冰上解冻。

16. 将重组产物进行转化，把 10μL 重组产物加入到 100μL DH5α 感受态细胞中，冰上静置 30min。

17. 42℃热激 60 秒，立即置于冰上冷却 2-3min。

18. 加入 800μL LB 培养基（不含任何抗生素），37℃摇床上摇 1h。

19. 将菌液离心，8000rpm 离心 3min，弃掉大部分上清，留约 100μL 上清将菌体重新悬浮。

20. 将重新悬浮的菌液涂在具有氨苄抗性的固体 LB 培养基中，放进 37℃培养箱倒置培养过夜。

21. 次日挑取长出来的单克隆，溶于 10μL 水中，取 5μL 菌液进行菌落 PCR，菌落 PCR 体系如下：

模板菌液：5μL

引物 1（10μM）：1μL

引物 2（10μM）：1μL

2×Taq Master Mix : 10μL

无菌水 : 补足至 20μL

扩增反应体系如下:

95°C 5min
95°C 30s
55°C 30s
72°C 60s
72°C 5min
12°C forever

} 35cycles

22.取 5μL 扩增溶液进行电泳, 取条带大小正确的扩增溶液送去公司进行测序, 查看序列有无问题, 取测序正确的菌液进行摇菌、保菌以及提取质粒。

23.将构建好的 pGL4.23-10811660-A 进行点突变, 设计相应的点突变引物 rs10811660-MUT-F 和 rs10811660-MUT-R, 将质粒进行反向 PCR 扩增, 将 rs10811660 的 A 等位基因突变成 rs10811660 的 G 等位基因。

24.用诺唯赞的 Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 试剂盒将质粒 pGL4.23-10811660-A 进行反向扩增, 反应体系如下:

2×Max Buffer : 25μL

dNTP Mix (10mM): 1μL

模板 DNA : 10ng

引物 1 (10μM): 2μL

引物 2 (10μM): 2μL

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase : 1μL

无菌水 : 补足至 50μL

PCR 反应程序如下:

95°C 30s
 95°C 15s
 60°C 15s
 72°C 60s/kb
 72°C 5min

} 30cycles

25.反应结束后，取 5 μ L 的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，若目的条带大小正确，则进行下一步实验。

26.因为扩增产物中包含原始模板质粒，为防止其在转化后形成假阳性转化子，所以在进行重组环化之前进行 DpnI 消化，去除模板质粒。反应体系如下：

DpnI : 1 μ L

扩增产物 : 45 μ L

27.将液体轻轻吹打混匀，置于 37°C 恒温反应 1-2h。

28.将反应液全部使用浓度为 1% 的凝胶进行电泳，再进行胶回收。

29.将扩增消化后的产物进行重组，实现线性 DNA 的体外环化。反应体系如下：

DpnI 消化产物 : 50-200ng

5 \times CE II Buffer : 4 μ L

Exnase II : 2 μ L

无菌水 : 补足至 20 μ L

30.用移液枪将液体轻轻吹打混匀，放入 PCR 仪中 37°C 反应 30min 后立即置于冰上冷却。

31.将重组产物进行转化。

32.将 DH5 α 感受态细胞置于冰上解冻，10 μ L 重组产物加入到 100 μ L DH5 α 感受态细胞中，冰上静置 30min。

33.42°C 热激 60 秒，立即置于冰上冷却 2-3min。

34.加入 800 μ L LB 培养基（不含任何抗生素），37°C 摇床上摇 1h。

35.将菌液离心，8000rpm 离心 3min，弃掉大部分上清，留约 100 μ L 上清将菌体重新悬浮。

36.将重新悬浮的菌液涂在具有氨苄抗性的固体 LB 培养基中，放进 37°C 培养

箱倒置培养过夜。

37.次日挑取长出来的单克隆，溶于 10 μ L 水中，取 5 μ L 菌液进行菌落 PCR，再取 5 μ L 扩增溶液进行电泳，取条带大小正确的扩增溶液送去公司进行测序查看序列有无问题，选取测序正确的菌液，进行摇菌、保菌以及后续提取质粒。

2.6.2 大提无内毒素质粒

将上述构建好的 pGL4.23-10811660-A、pGL4.23-10811660-G 以及 pGL4.23 和 pGL4.74 进行质粒大提。由于细胞比较脆弱，因此在转染之前需要提取对细胞无害的无内毒素质粒。

1.摇菌：在 15mL 离心管中加入 4-5mL LB 培养基（氨苄抗性），然后把构建好的双荧光素载体的菌液加进去，放在 37 $^{\circ}$ C 摇床上摇 12h。

2.在灭过菌的三角锥形瓶中加入 100mL LB 培养基（氨苄抗性），然后从摇了 12h 的菌液中取 1mL 菌液加进去，过夜摇菌使之扩大培养。

3.培养 14-16h 后，用 50mL 离心管 12000g 离心 5min 后弃上清，收集菌体。

4.加入 10mL 的溶液 P1 涡旋振荡，重悬菌体，室温放置 10min。

5.向混匀后的离心管中加入 10mL 的溶液 P3 温和地上下颠倒 8-10 次，离心管中溶液变得清亮粘稠。

6.加入 10mL 的溶液 P3 后立即缓慢上下颠倒 8-10 次，此时离心管中应会出现白色絮状的沉淀，12000g 离心 10min。

7.把上清液转移至过滤器中，慢慢推动推柄过滤，将滤液收集在干净的 50mL 离心管中。

8.向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的 P4，上下颠倒混匀后将溶液转移至吸附柱中。

9.12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液，每次转移 15mL 溶液，分 2-3 次过柱。

10.向吸附柱中加入 10mL 的 P5 溶液，12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液。

11.向吸附柱中加入 10mL 的 PW 溶液，12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液。

12.重复上一步骤操作。

- 13.把吸附柱重新再放回到收集管中，12000g 离心 10min。
- 14.将吸附柱放入 50°C 烘干箱中烘干 10min。
- 15.将吸附柱置于一个干净的 50mL 离心管中，向吸附柱中加入 1.5mL 水，室温放置 2min，然后 12000g 离心 3min。
- 16.将收集管中的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，然后 12000g 离心 3min。
- 17.将收集管中的溶液全部转移至 2mL 离心管中，-20°C 保存。
- 18.取 1 μ L 样品测浓度后，可将质粒进行浓缩。
- 19.取 500 μ L 大提的质粒，加入 710 μ L 异丙醇，再加入 210 μ L 5M NaCl，混匀后放置 5min，然后 8000rpm 离心 10min。
- 20.弃上清，加入 1mL 75%乙醇上下颠倒，洗涤沉淀，然后 8000rpm 离心 5min。
- 21.重复上一步骤。
- 22.弃掉上清，室温静置，直至 EP 管底部白色沉淀变透明，加入适量无菌水溶解底部透明沉淀使质粒浓度达到 1 μ g/ μ L 左右。

2.6.3 转染细胞

- 1.铺细胞，将 10cm 培养皿中的人肝癌细胞 BEL-7404 消化下来，800rpm 离心 3min，弃去上清，再用培养基重悬，铺到 24 孔板中，使之细胞密度第二天达到 70%-80%。
- 2.次日给 24 孔板换上新鲜培养基。
- 3.将 pGL4.23-10811660-A、pGL4.23-10811660-G、pGL4.23 分别和 pGL4.74 共转染，每个实验组做四个重复，共 12 个孔。
- 4.配置转染复合物。取 240 μ L Opti-MEM (Reduced Serum Medium) 培养基加入 2.4 μ g 的 pGL4.23 和 48ng 的 pGL4.74 (每个孔实验组质粒与内参质粒的质量比是 50: 1) 再加入 6 μ L 的 Attractene 转染试剂，轻轻吹打混匀，室温孵育 15min。
- 5.按上述方法再分别配置 pGL4.23-10811660-A 和 pGL4.23-10811660-G 与 pGL4.74 共转染的转染复合物。
- 6.把 24 孔板从培养箱中拿出来，将上述配置好的三种转染复合物，每种转染复合物平均分配加入四个孔中，轻轻晃动使转染复合物在细胞 24 孔板中分布均匀。

7.再把加入转染复合物的 24 孔板放入培养箱中培养，培养 72h 后进行发光检测。

2.6.4 发光检测

本实验采用 Promega E1910 试剂盒检测

1.配制试剂：（1）细胞裂解缓冲液 PLB：将 5×PLB 稀释成 1×PLB，现配现用，5×PLB 母液在-20℃保存。（2）荧光素酶检测底物 LAR II：将 LAS 冻干粉溶于 LA buffer II中，避光与-80℃保存。（3）将 50×Stop&Glo Reagent 用 Stop&Glo buffer 稀释成 1×Stop&Glo Reagent，需先计算好检测所用量再进行稀释，现配现用，50×Stop&Glo Reagent 母液于-20℃保存。

2.裂解细胞：细胞转染 72h 后，吸弃孔中培养液，每个孔用 500μLPBS 洗一遍，再向每个孔中加入 100μL 细胞裂解缓冲液 PLB，在室温条件下放在摇床上 500 振/min，裂解 10-15min，收集细胞裂解液，12000rpm 离心 1min。

3.检测萤火虫荧光素酶活性：在 96 孔酶标板上每孔加入 50μL 荧光素酶检测底物 LARII，再向每孔中加入 10μL 待测样品，放入酶标仪中检测并记录数据。

4.检测海肾荧光素酶活性：上一步骤完成之后，再在孔中加入 50μL 稀释好的 1×Stop&Glo Reagent，再次用多功能酶标仪检测并记录数据。

5.数据分析。内参是海肾荧光素酶活性，用统计学方法分析萤火虫荧光素酶的相对活性，从而确定含有 SNP 的基因片段对否具有增强子效果。

2.7 检测敲低结合 SNP 的转录因子表达后对靶基因表达的影响

2.7.1 转染 siRNA

1.从公司订购转录因子 MAFG 的 siRNA。

2.铺细胞，将 10cm 培养皿中的人肝癌细胞 BEL-7404 消化下来后，800rpm 离心 3min，弃去上清，使用不添加任何抗生素的 DMEM 培养基重悬细胞，铺到 12 孔板中，使之细胞密度第二天达到 30%-40%。

3.次日先给 12 孔板换上 900μL 新鲜的 DMEM 培养基（不添加任何抗生素）。

4.配置转染复合物，取 100μL Opti-MEM 加入 4μL **RFect 转染试剂**用移液枪轻轻吹打混匀，室温孵育 5min。

5. 孵育 5min 后, 加入 10 μ L 的浓度为 5 μ M/ μ L 的 siRNA (siRNA 的终浓度为 50nM), 室温孵育 20min。

6. 把细胞 12 孔板从培养箱中拿出来, 加入孵育好的转染复合物, 轻轻晃动使转染复合物在 12 孔板中分布均匀。

7. 再把加入转染复合物的 12 孔板放入培养箱中培养, 培养 72h 后提取 RNA。

2.7.2 提取 RNA

1. 从细胞培养箱中取出 12 孔板细胞, 移液枪吸弃培养基, 每孔中加入 500 μ L Trizol 溶液, 反复吹打裂解细胞, 室温放置 5min, 使细胞充分裂解。□

2. 吸取细胞裂解液移至 RNase-free 的 EP 管中, 加入 100 μ L 的氯仿, 涡旋振荡, 室温放置 2min 后, 4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000g 离心 15min (上层为水相, 含有 RNA、下层为 Trizol、中层为蛋白质和 DNA)。

3. 吸取 240 μ L 上层水相至新的 RNase-free EP 管中, 加入相同体积的异丙醇, 上下颠倒。涡旋振荡, 使之充分混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 20min 以上。

4. 放置 20min 以上后, 从冰箱里把 EP 管拿出来, 4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000g 离心 10min, 弃掉上清, 此时底部有白色沉淀。

5. 加入 1mL 用 DEPC 水提前配置好的 75% 无水乙醇, 上下颠倒, 清洗底部白色沉淀, 4 $^{\circ}$ C 离心机中 7000g 离心 5min, 弃掉上清。

6. 室温静置, 直至 EP 管底部白色沉淀变透明, 加入 30 μ L DEPC 水溶解底部透明沉淀。

7. 取 1 μ L 样品测浓度后, 立即进行反转录, 合成 cDNA, 剩余 RNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.7.3 RNA 反转录

1. 使用诺唯赞 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒, 首先去除基因组 DNA, 反应体系如下:

模板 RNA: 1 μ g

4 \times gDNA wiper Mix: 4 μ L

DEPC 水: 补足至 16 μ L

2. 用移液器轻轻吹打混匀, 放入 PCR 仪器中 42 $^{\circ}$ C 2 min。

3.进行反转录，反应体系如下：

5×HiScript II qRT SuperMix II：4μL

第1步的反应液：16μL

反应程序如下：

50°C 15min

85°C 5s

4.将反转录的cDNA加入80μL的DEPC水进行稀释，放在冰上，或放置于-20°C冰箱保存。

2.7.4 RT-QPCR

1.设计β-Actin、MAFG、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2B-AS1的RT-qPCR引物，进行qPCR。

2.RT-qPCR反应体系如下：

2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix：10μL

Primer1（10μM）：0.4μL

Primer2（10μM）：0.4μL

cDNA：3μL

DEPC水：补足至20μL

反应程序如下：

95°C 30s

95°C 10s

60°C 30s

} 40cycles

95°C 15s

60°C 1min

95°C 15s

2.8 检测含SNP基因组敲除前后对靶基因转录的影响

2.8.1 构建含有两个sgRNA的CRISPR载体

1.在<https://chopchop.cbu.uib.no/>网站输入rs10811660上下游各500bp序列，在

rs10811660 上下游各设计一个 sgRNA, 分别为 sgRNA1 和 sgRNA2 将序列送到公司进行合成。

2.每个 sgRNA 有两条 oligos, 分别将两个 sgRNA 的两条 oligos 进行退火, 形成双链结构, 反应体系如下:

Oligo1 (100 μ M): 1 μ L

Oligo2 (100 μ M): 1 μ L

10 \times T4 ligation Buffer : 1 μ L

无菌水 : 补足至 10 μ L

反应程序如下:

37 $^{\circ}$ C 30min

95 $^{\circ}$ C 5min

Ramp down to 25 $^{\circ}$ C by 6 $^{\circ}$ C/min (0.1 $^{\circ}$ C/s)

3.取 1 μ L 退火后的产物, 稀释到 100 μ L 的水里, 待用。

4.用 BbsI 酶切 px333-EGFP-puro, 37 $^{\circ}$ C 酶切 1h, 反应体系如下:

载体 : 1 μ g

酶 : 1 μ L

10 \times cutsmart Buffer : 5 μ L

无菌水 : 补足至 50 μ L

5.将酶切产物全部进行胶回收, 使用浓度为 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳, 使用 Magen 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。

6.将目的条带切割下来, 称取凝胶重量, 每 100mg 凝胶加入 100 μ L Buffer GDP, 放入 55 $^{\circ}$ C 的金属浴中, 让凝胶完全溶解。

7.将溶胶液转移至柱子中, 12000g 离心 30s。

8.倒掉废液, 加入 300 μ L Buffer GDP 至柱子中, 静置 1min, 12000g 离心 30s。

9.倒掉废液, 加入 600 μ L Buffer DW2 至柱子中, 12000g 离心 30s。

10.倒掉废液, 加入 300 μ L Buffer DW2 至柱子中, 12000g 离心 2min。

11.将吸附柱放置到新 1.5ml 离心管上, 室温静置 5min, 彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

12.向吸附柱中悬空滴加 20 μ L 水，室温放置 2min，12000g 离心 2min，收集溶液，样品可于-20 $^{\circ}$ C保存（若要提高产量可以重复第 9 步骤进行第二次洗脱）。

13.将之前稀释的退火产物 sgRNA1 与用 BbsI酶切好的载体用 T4 酶进行连接，连接体系如下：

酶切后的载体：50ng

退火后的 sgRNA：2 μ L

10 \times T4 ligation Buffer：1 μ L

NEB T4 ligase：1 μ L

无菌水：补足至 10 μ L

14.室温放置反应 1h。

15.将重组产物进行转化。将 DH5 α 感受态细胞置于冰上解冻，把 10 μ L 重组产物加入到 100 μ L DH5 α 感受态细胞中，冰上静置 30min。

16.42 $^{\circ}$ C热激 60 秒，立即置于冰上冷却 2-3min。

17.加入 800 μ L LB 培养基（不含任何抗生素），37 $^{\circ}$ C摇床上摇 1h。

18.将菌液离心，8000rpm 离心 3min，弃掉大部分上清，留约 100 μ L 上清将菌体重新悬浮。

19.将重新悬浮的菌液涂在具有氨苄抗性的固体 LB 培养基中，放进 37 $^{\circ}$ C培养箱倒置培养过夜。

20.次日挑取长出来的单克隆，溶于 10 μ L 水中，取 5 μ L 菌液当模板，进行菌落 PCR，所用引物为：CMV-enhancer-R 和 rs10811660-sgRNA1-F，再取 5 μ L 扩增溶液进行电泳，取条带大小正确的扩增溶液送去公司进行测序查看序列有无问题，取测序正确的菌液进行摇菌、保菌以及提取质粒。

21.提取连接正确的 px333-EGFP-puro-sgRNA1 的质粒，再次进行酶切，用 BsaI酶切，37 $^{\circ}$ C酶切 1h，酶切体系如下：

载体：1 μ g

酶：1 μ l

10 \times cutsmart Buffer：5 μ L

无菌水：补足至 50 μ L

22.将全部的酶切产物使用浓度为 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳, 使用 Magen 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。

23.把目的条带切割下来, 称取凝胶重量, 每 100mg 凝胶加入 100 μ L Buffer GDP, 放入 55 $^{\circ}$ C的金属浴中, 让凝胶完全溶解。

24.将溶胶液转移至柱子中, 12000g 离心 30s。

25.倒掉废液, 加入 300 μ L Buffer GDP 至柱子中, 静置 1min, 12000g 离心 30s。

26.倒掉废液, 加入 600 μ L Buffer DW2 至柱子中, 12000g 离心 30s。

27.倒掉废液, 加入 300 μ L Buffer DW2 至柱子中, 12000g 离心 2min。

28.将吸附柱放置到新 1.5ml 离心管上, 室温静置 5min, 彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

29.向吸附柱中悬空滴加 20 μ L 水, 室温放置 2min, 12000g 离心 2min, 收集溶液, 样品可于-20 $^{\circ}$ C保存(若要提高产量可以重复第 9 步骤进行第二次洗脱)。

30.将之前稀释的退火产物 sgRNA2 与用 BsaI酶切好的载体用 T4 酶进行连接, 连接体系如下:

酶切后的载体: 50ng

退火后的 sgRNA: 2 μ L

10 \times T4 ligation Buffer: 1 μ L

NEB T4 ligase: 1 μ L

无菌水: 补足至 10 μ L

31.将连接体系室温放置反应 1h。将重组产物进行转化。

32.将连接产物进行转化。DH5 α 感受态细胞置于冰上解冻, 10 μ L 重组产物加入到 100 μ L DH5 α 感受态细胞中, 冰上静置 30min。

33.42 $^{\circ}$ C热激 60 秒, 立即置于冰上冷却 2-3min。

34.加入 800 μ L LB 培养基(不含任何抗生素), 37 $^{\circ}$ C摇床上摇 1h。

35.将菌液离心, 8000rpm 离心 3min, 弃掉大部分上清, 留约 100 μ L 上清将菌体重新悬浮。

36.将重新悬浮的菌液涂在具有氨苄抗性的固体 LB 培养基中, 放进 37 $^{\circ}$ C培养箱倒置培养过夜。

37.次日挑取长出来的单克隆，溶于 10 μ L 水中，取 5 μ L 菌液当模板，进行菌落 PCR，再取 5 μ L 扩增溶液进行电泳，取条带大小正确的扩增溶液送去公司进行测序查看序列有无问题，选取测序正确的菌液，进行摇菌、保菌。

2.8.2 大提无内毒素质粒

将 px333-EGFP-puro-sgRNA1+2 进行质粒大提。

1.摇菌：在 15mL 离心管中加入 4-5mL LB 培养基（氨苄抗性），然后把正确连接的载体单克隆菌点进去，过夜摇菌。

2.次日，取 500 μ L 菌液加入 500 μ L 50%甘油，混合均匀，放-80 $^{\circ}$ C保存。在三角锥形瓶中加入 100mL LB 培养基（氨苄抗性），然后从过夜培养的菌液中取 1mL 菌液加进去，过夜摇菌使之扩大培养。□

3.培养 14-16h 后，用 50mL 离心管 12000g 离心 5min 后吸弃上清，收集菌体。

4.加入 10mL 的溶液 P1 涡旋振荡，重悬菌体，室温放置 10min。

5.向混匀后的离心管中加入 10mL 的溶液 P3 温和地上下颠倒 8-10 次，离心管中溶液变得清亮粘稠。

6.加入 10mL 的溶液 P3 后立即缓慢上下颠倒 8-10 次，此时离心管中应会出现白色絮状的沉淀，12000g 离心 10min。

7.把上清液转移至过滤器中，慢慢推动推柄过滤，将滤液收集在干净的 50mL 离心管中。

8.向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的 P4，上下颠倒混匀后将溶液转移至吸附柱中。

9.12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液，每次转移 15mL 溶液，分 2-3 次过柱。

10.向吸附柱中加入 10mL 的 P5 溶液，12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液。

11.向吸附柱中加入 10mL 的 PW 溶液，12000g 离心 3min，弃掉离心下来的废液。

12.重复上一步骤操作。

13.把吸附柱重新再放回到收集管中，12000g 离心 10min。

14.将吸附柱放入 50 $^{\circ}$ C烘干箱中烘干 10min。

15.将吸附柱置于一个干净的 50mL 离心管中，向吸附柱中加入 1.5mL 水，室温放置 2min，然后 12000g 离心 3min。

16.将离心下来的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，然后 12000g 离心 3min。

17.将收集管中的溶液全部转移至 2mL 离心管中，-20°C保存。

18.取 1 μ L 样品测浓度后，可将质粒进行浓缩。

19.取 500 μ L 大提的质粒，加入 710 μ L 异丙醇，再加入 210 μ L 5M NaCl，混匀后放置 5min，然后 8000rpm 离心 10min。

20.弃上清，加入 1mL 75%乙醇上下颠倒，洗涤沉淀，然后 8000rpm 离心 5min。

21.重复上一步骤。

22.弃掉上清，室温静置，直至 EP 管底部白色沉淀变透明，加入适量无菌水溶解底部透明沉淀使质粒浓度达到 1 μ g/ μ L 左右。

2.8.3 转染细胞

1.铺细胞，将 10cm 培养皿中的人结肠癌细胞 HCT116 消化下来，800rpm 离心 3min，弃去上清，再用 McCoy's 5A 培养基重悬，铺到六孔板中，使之细胞密度第二天达到 40%-50%，进行转基因。

2.次日给六孔板换上新鲜 McCoy's 5A 培养基。

3.配置转染复合物，配方如下：

1) 125 μ L Opti-MEM + 7.5 μ L lip3000，混匀；

2) 125 μ L Opti-MEM + 2.5 μ g 质粒 DNA + 5 μ L P3000，混匀；

3) 将 1) 和 2) 混合混匀后，室温静置 10-15min。

4.把细胞六孔板从培养箱中拿出来，吸弃原有培养基，加入新鲜的培养基，再将孵育好的转染复合物滴加到六孔板中，轻轻前后左右倾斜使转染复合物在六孔板中分布均匀，24h 后换液（如期间培养基变黄时换液）。

5.转染 48h 后进行流式分选。

2.8.4 流式分选

1.将六孔板中的细胞消化下来，离心后弃去上清，用 3ml 培养基重新悬浮，将悬浮液用 40 μ m 尼龙膜（FALCON，352340）过滤至 5ml 流式管中（注意过滤前先

用培养基润膜，再过滤细胞悬浮液）。

2.使用美国 BD 公司流式分选仪器（YQ2018000651 FACS Ari3），向流式管中加入 1mL 培养基，每管收集 2000 个 HCT116 细胞（流式筛选时 gate 选择要严格，这样发光较强的细胞才会分选出来）。

3.将流式管从机器中拿出来后，轻轻晃动培养基，将流式管壁上的细胞及时清洗至培养基中。

4.为防止细胞沉淀，用枪头轻轻吹打后，将流式管中的细胞悬浮液转移至 10cm 细胞培养皿中，再用 1mL 新鲜培养基清洗流式管壁，再次加入到 10cm 细胞培养皿中。整个过程要轻柔，流式分选后，细胞有损伤。

5.将细胞放入培养箱，培养 5 天后更换新鲜培养基，期间静置勿动。更换培养基时要轻柔，防止吹起细胞。

6.之后每隔三天换一次液，直到细胞长到适合挑取单克隆，对于 HCT116 细胞，大概在 10cm 培养皿中长 14 天即可。

2.8.5 挑取单克隆细胞鉴定

1.先在光镜下观察单克隆，将长势良好的单克隆（大小适中，近似圆形，边缘平滑）。用马克笔在培养皿底部标出来，待单克隆细胞长到肉眼可见就可以进行挑取。

2.将 10cm 培养皿中原培养基换为 5mL PBS。

3.提前将 96 孔 PCR 板进行灭菌，向 96 孔板每孔中加入 10uL 胰酶，用枪头将单克隆细胞挑起，并吸入枪头，再加入到胰酶中，吹打混匀。

4.将 96 孔板放入到培养箱中消化 4min 后，用 50μL 培养基吹打混匀后，全部转移至加了 400ul 培养基的 48 孔板中。

5.待 48 孔板中的细胞长到 80%左右时，弃上清，用 200μL PBS 清洗细胞，加入 70μL 胰酶消化 4min，然后加入 250μL 培养基进行中和，吹打细胞使细胞分散，再全部转移至添加了 700μL 培养基的 12 孔板。

6.待 12 孔板中的细胞长到 80%左右时，弃上清，用 500μL PBS 清洗细胞，加入 250μL 胰酶消化 4min，然后加入 1mL 培养基中和，吹打细胞使细胞分散，取 1mL 悬浮液出来，提取 DNA 鉴定敲除效果；其余细胞留在 12 孔板中加 800μL 培

培养基继续培养。

7.提取单克隆细胞 DNA，设计单克隆细胞鉴定引物，用提取的单克隆细胞 DNA 作为模板，进行 PCR，引物为 rs10811660-dankelong-F 和 rs10811660-dankelong-R，正常细胞 DNA 作为对照，反应体系如下：

细胞 DNA：100ng

引物 1（10 μ M）：2 μ L

引物 2（10 μ M）：2 μ L

2 \times Taq Master Mix：25 μ L

无菌水：补足至 50 μ L

反应体系如下：

95 $^{\circ}$ C 5min		
95 $^{\circ}$ C 30s		
55 $^{\circ}$ C 30s		}
72 $^{\circ}$ C 60s		
72 $^{\circ}$ C 5min		
12 $^{\circ}$ C forever		35cycles

8.取 5 μ L PCR 扩增产物进行电泳，若细胞基因组受到剪切，则扩增出来的片段会比正常扩增出来的片段小 200bp 左右，将片段小的剩余扩增产物送到公司进行测序。

2.8.6 提取细胞 RNA

1.将 rs10811660 所在基因组敲除并测序验证过的细胞扩大培养，一部分细胞进行冻存，一部分细胞转移至 12 孔板进行后续实验。

2.从细胞培养箱中取出 12 孔板细胞，吸弃培养基，每孔中加入 500 μ L Trizol 溶液，反复吹打，室温放置 5min，使细胞充分裂解。□

3.吸取细胞裂解液移至 RNase-free 的 EP 管中，加入 100 μ L 的氯仿，涡旋振荡，室温放置 2min 后，4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000g 离心 15min（上层为水相，含有 RNA、下层为 Trizol、中层为蛋白质和 DNA）。

4.吸取大约 240 μ L 上层水相至新的 RNase-free EP 管中，加入相同体积的异丙

醇，上下颠倒，涡旋振荡，充分混匀，-20℃放置 20min 以上。

5.放置 20min 以上后，从冰箱里把溶液拿出来，4℃离心机中 12000g 离心 10min，弃掉上清，此时底部有白色沉淀。

6.加入 1mL 用 DEPC 水提前配置好的 75%无水乙醇，上下颠倒，清洗底部白色沉淀，4℃离心机中 7000g 离心 5min，弃掉上清。

7.室温静置，直至 EP 管底部白色沉淀慢慢变透明，再加入 30μL DEPC 水溶解底部的透明沉淀。

8.取 1μL 的样品，对其浓度进行检测，然后立即进行反转录，合成 cDNA，剩余 RNA 放置于-80℃冰箱保存。

2.8.7 RNA 反转录

1.使用诺唯赞 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒，首先去除基因组 DNA，反应体系如下：

模板 RNA：1μg

4×gDNA wiper Mix：4μL

DEPC 水：补足至 16μL

2.用移液器轻轻吹打混匀，放入 PCR 仪器中，42℃反应 2 min。

3.进行反转录，反应体系如下：

5×HiScript II qRT SuperMix II：4μL

第 1 步的反应液：16μL

反应程序如下：

50℃ 15min

85℃ 5s

4.将反转录的 cDNA 加入 80μL 的 DEPC 水进行稀释，置于冰上，或放置于-20℃冰箱保存。

2.8.8 RT-QPCR

用 *β-Actin*、*MAFG*、*CDKN2A*、*CDKN2B*、*CDKN2B-AS1* 的 RT-qPCR 引物，进行 qPCR。

RT-qPCR 反应体系如下：

2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix : 10μL

Primer1 (10μM): 0.4μL

Primer2 (10μM): 0.4μL

cDNA : 3μL

DEPC 水 : 补足至 20μL

反应程序如下:

95°C 30s

95°C 10s

60°C 30s

} 40cycles

95°C 15s

60°C 1min

95°C 15s

第三章 结果分析

3.1 2 型糖尿病和对照组人群样品收集及统计情况

将唐都医院的血样拿回实验室提取 DNA，并保存于-80°C冰箱。目前已收集到 2 型糖尿病病人血液样品 734 个，对照样品 984 个。所有样品经琼脂糖凝胶电泳显示 DNA 的浓度和纯度符合下游测序要求（图 6）。2 型糖尿病患者中，患者集中分布于 40-70 岁，男性占 67%，女性占 33%，且男性多于女性（图 7A, B）。糖尿病患者的性别和年龄的统计结果与中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）中的统计结果是一致的，说明我们采集的样品符合实际情况，具有代表性。同时使用血糖检测仪选取当天门诊的空腹血糖正常（ $<6.1\text{mmol/L}$ ）人群血样，作为对照。为了保证后续关联分析结果的可靠性，我们在采集对照人群血样时，将对照人群的年龄和 2 型糖尿病患者做了匹配（图 7C, D）。

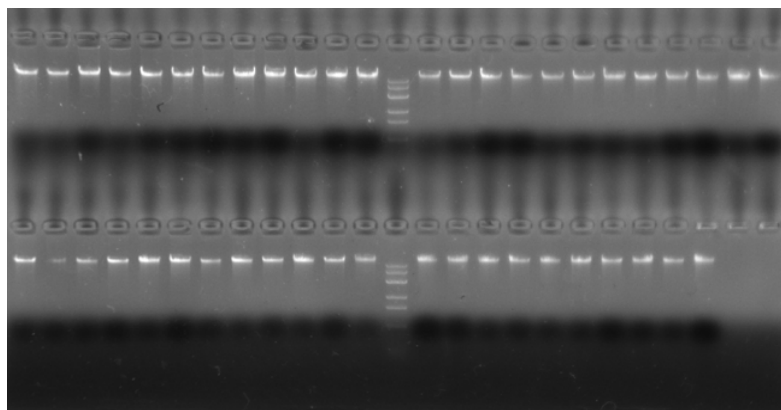


图 6 部分样品 DNA 凝胶电泳图

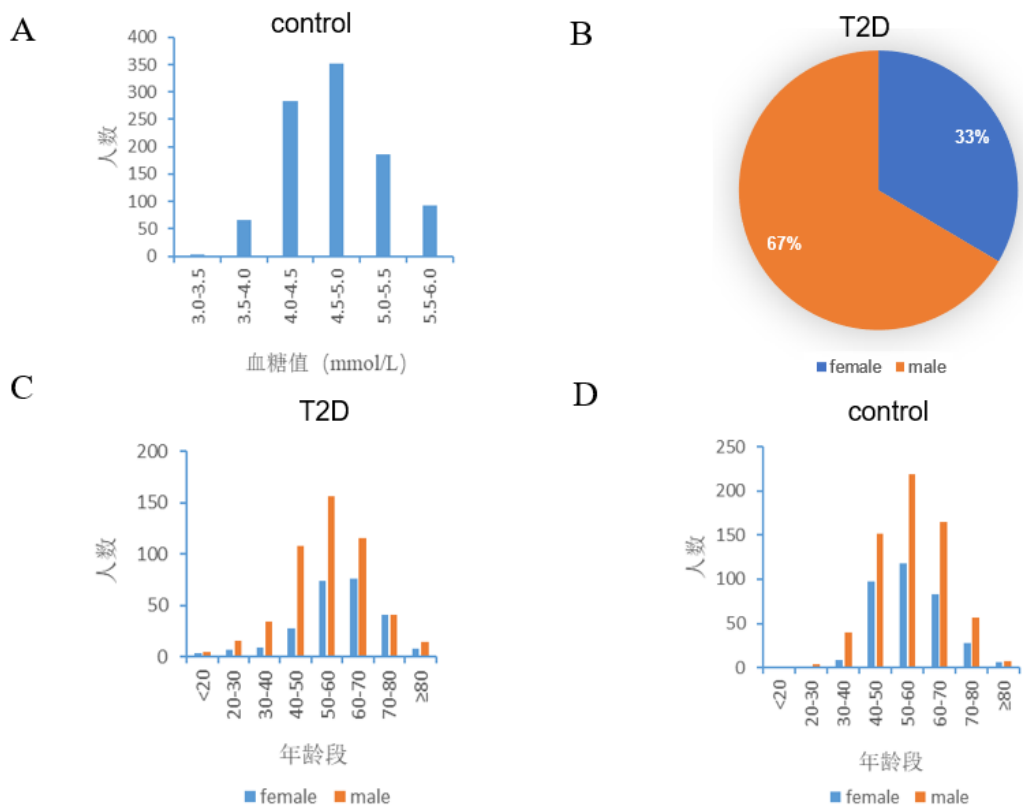


图 7 收集到的血液样品信息

附注：A：正常人群样品血糖值分布；B：糖尿病病人样品男女比例；C：糖尿病病人样品年龄分布；D：正常人群样品年龄分布。

3.2 2 型糖尿病 SNP rs10811660 的生物信息学分析

实验室前期利用 UKB 数据进行回归分析得到了 305 个 SNP 位点影响转录因子结合并与 2 型糖尿病显著相关。在 UCSC 上我们发现 rs10811660 这个位点在乳腺癌、前列腺癌和视网膜组织中处于 DNaseI 敏感区域（图 8）。DNaseI 敏感性与基因转录相关，转录调控元件通常位于这个区域内或者周围，来参与基因表达的调控，而转录因子也通过与 DNaseI 敏感区域结合来控制基因转录活性，转录因子与转录调控元件的结合，可以有较强的增强子作用。我们推测 rs10811660 这个位点所在位置有增强子的效果，所以我们选择 rs10811660 位点进行进一步研究。

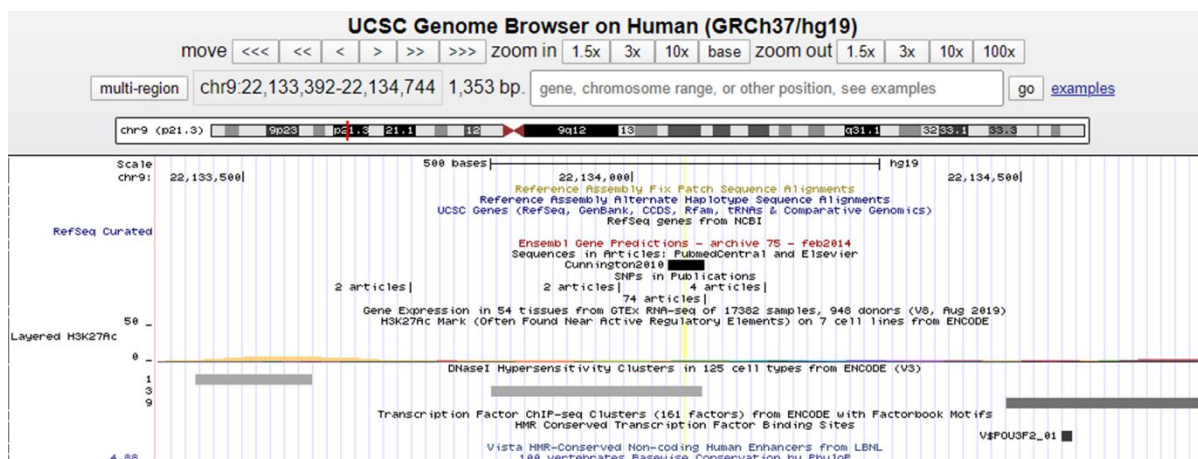


图 8 rs10811660 位于 DNaseI 敏感区域

附注：UCSCs 上基因组浏览器表示的 rs10811660 位点附近的 DNaseI 敏感区（灰色），黄色竖线为 rs10811660 在基因组上的位置。

3.3 2 型糖尿病风险相关位点 rs10811660 的确认

因为大部分因果变异应该不依赖于种族差异，所以我们在陕西本地人群对这个 SNP 进一步进行验证。在收集到的陕西人群 T2DM 患者和对照人群的基因分型数据中通过卡方检验对 rs10811660 进行交叉验证。测序结果发现收集到的 2 型糖尿病患者样品中，基因型是 A/A 的有 119 个，A/G 有 373 个，G/G 有 241 个；对照组样品中，基因型是 A/A 的有 239 个，A/G 有 458 个，G/G 有 287 个。卡方检验表明 rs10811660 是一个显著的位点，P 值为 0.000677，风险等位基因为 G，保护碱基为 A，OR 值为 1.27。说明 rs10811660 是一个不依赖于种群的 2 型糖尿病风险位点，是一个可能的因果变异，下面对其进行功能研究。

3.4 SNP rs10811660 的功能研究

3.4.1 鉴定细胞中 rs10811660 的基因型

为了在同一个细胞内分析 rs10811660 不同等位基因型对转录因子结合的影响，需要找出 rs10811660 位点是杂合子的细胞系。由于与 2 型糖尿病相关的组织有肝脏、小肠、结肠、肌肉等，所以我们选用实验室现有的肝肠来源的 16 个细胞株的基因组当模板，用 rs10811660-F 和 rs10811660-R 对 SNP rs10811660 进行扩增，扩增产物

347bp, 用每个细胞株的基因组当模板, 分别进行扩增, 将扩增片段送到测序公司测序, 确定每个细胞系的基因型, 三种基因型如图 9 所示, 测序完进行对比, 每种细胞系基因型结果如下:

表 4 16 种细胞关于 rs10811660 的基因型

基因型	A/A	A/G	G/G
细胞系	BEL-7402 (肝癌)		HepG2 (肝癌)
	NCM-460 (结肠上皮)		HepG3B (肝癌)
	SMMC-7721 (肝癌)	BEL-7404 (肝癌)	HCT116 (结肠癌)
	LM3 (肝癌)	HIEC (肠上皮)	LOVO (结肠癌)
	Caco-2 (结肠腺癌)	LO2 (正常肝)	RKO (结肠癌)
	97-H (肝癌)		Huh-7 (肝癌)
	97-L (肝癌)		

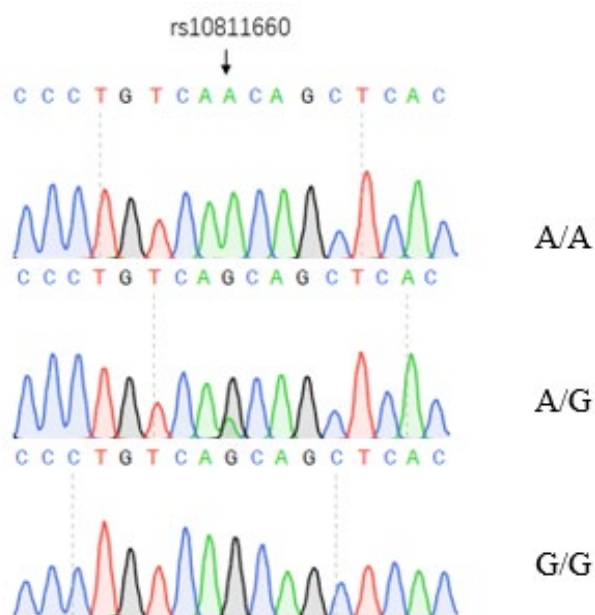


图 9 rs10811660 的三种不同基因型的测序峰图

附注: 将扩增产物进行一代测序, 图中为 rs10811660 附近的三种基因型的原始测序峰图。

3.4.2 rs10811660 A/G 差异结合转录因子 MAFG

为了探究 rs10811660 A/G 等位基因对转录因子 MAFG 的偏好性结合, 使用转录因子 MAFG 的抗体, 运用 ChIP 的方法, 在杂合子细胞 BEL-7404 中富集 MAFG 结合

的 DNA。合成引物，运用链特异性 PCR 的方法，检测转录因子 MAFG 在 SNP rs10811660 正常变异和风险变异基因组上富集是否有差异。我们发现 rs10811660 A/G 与转录因子 MAFG 结合有明显差异，SNP 不同等位基因对转录因子结合力是不同的，转录因子 MAFG 倾向结合于 rs10811660 的 G 等位基因（图 10）。

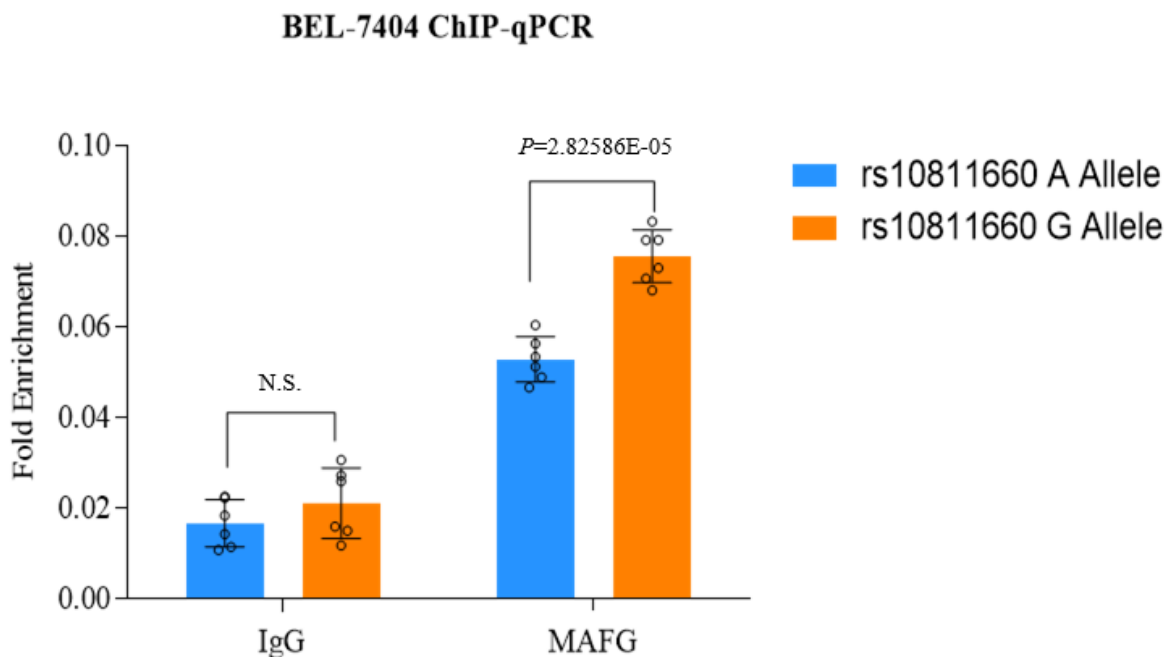


图 10 MAFG 倾向于结合含 rs10811660 的 G 等位基因片段

附注：在 BEL7404 细胞系中，用 MAFG 抗体进行染色质免疫共沉淀，将富集下来的片段运用链特异性 PCR 的方法进行定量分析，IgG 抗体为阴性对照。

3.4.3 rs10811660 A/G 等位基因转录活性差异检测

生物信息学分析表明 rs10811660 处于增强子片段内，那么其不同的等位基因对增强子活性有没有影响呢？为此我们用双荧光素酶报告系统对其活性进行了检测，检测 rs10811660 A/G 等位基因是否有转录差异。扩增含 rs10811660 这个 SNP 的基因组片段，大约 350bp，克隆到增强子报告载体 pGL4.23（表达萤火虫荧光素酶）中，构建 pGL4.23-rs10811660-A 载体，然后进行点突变，构建 pGL4.23-rs10811660-G 载体。每一步都会将构建的载体的单克隆菌落进行 PCR（图 11）。以 pGL4.23 空载体作为阴性对照，将构建的载体分别和内参载体 pGL4.74（表达海肾荧光素酶）共转染到人肝癌细胞 BEL-7404。使用酶标仪分别检测两种荧光素酶的活性，计算每个样品中萤火虫荧光素酶的发光强度与海肾荧光素酶的发光强度比值，将数据进行归一化处理并绘

制柱状图。含 rs10811660 这个 SNP 的基因组片段有增强子效果，可促进转录，并且 rs10811660 A/G 等位基因存在转录差异，rs10811660 的 G 等位基因的增强效果比 A 等位基因强（图 12）。

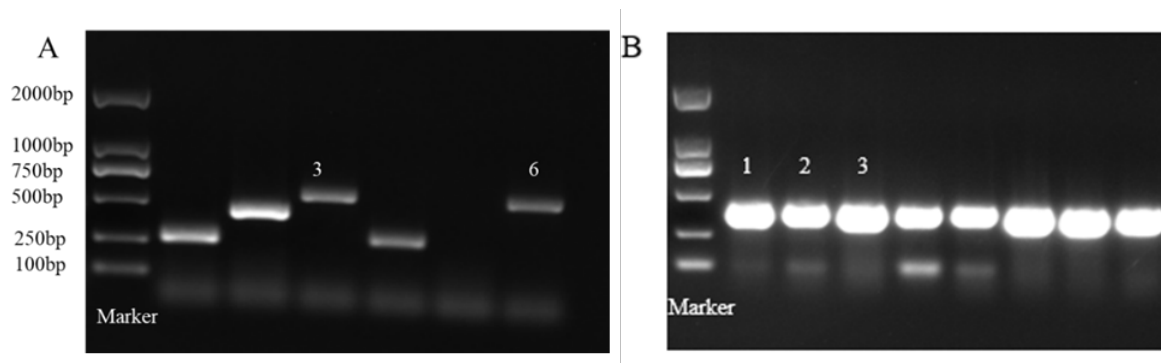


图 11 双荧光素酶报告载体的构建

附注：A：pGL4.23-rs10811660-A 的单克隆进行菌液 PCR 扩增产物的电泳结果。用 pGL4.23-rs10811660-A 为模板进行 PCR，目的条带大约 400bp，选择第 3 和第 6 泳道的单克隆进行摇菌提质粒，再送去测序。B：pGL4.23-rs10811660-G 的单克隆进行菌液 PCR 扩增产物的电泳结果。用 pGL4.23-rs10811660-G 为模板进行 PCR，目的条带大约 400bp，选择第 1-3 泳道的单克隆进行摇菌提质粒，再送去测序。Marker 表示 Trans2K DNA Marker。

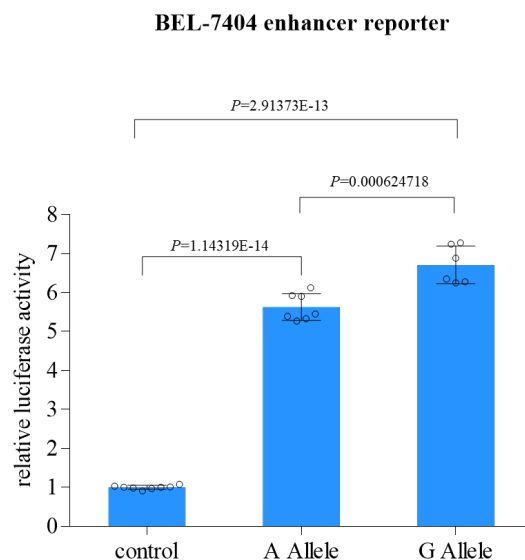


图 12 rs10811660 A/G 等位基因转录活性实验

附注：先检测样品萤火虫荧光素酶的活性，然后加入试剂，淬灭萤火虫荧光，检测海参荧光素酶的活性，作为内参，计算相对荧光强度，与空载对照比较，来反映增强效果。

3.4.4 敲低 MAFG 对靶基因转录水平的影响

ChIP 实验表明 MAFG 可结合 rs10811660 所在的染色体片段，而双荧光素酶报告系统检测表明 rs10811660 片段具有增强子活性。转录因子参与了增强子的作用发挥，敲低增强子上结合的转录因子，增强子作用的靶基因也会收到影响。

为了找出该 rs10811660 的靶基因，我们在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/download/?acc=GSE104333>) 网站下载了人结肠癌细胞 HCT116 的 Hi-C 数据，发现 *CDKN2B-ASI*、*CDKN2A* 和 *CDKN2B* 与 rs10811660 位于一个同拓扑关联域 (TAD) 内 (图 13)。

CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) 可以调控细胞周期，并且其在肿瘤中经常发生突变或缺失，是一种抑癌基因。*CDKN2B* (cyclin dependent kinase inhibitor 2B) 编码的蛋白可作为细胞生长调节剂，控制细胞周期 G1 进程。TGF β 能显著诱导该基因表达，说明其在 TGF β 诱导的生长抑制中发挥作用。*CDKN2B-ASI* (*CDKN2B* antisense RNA 1) 位于人类染色体 9p21，处于 *CDKN2B-CDKN2A* 基因簇中，其编码产物是一种功能性 RNA 分子，可导致该集群中其他基因的表现遗传沉默。该区域是心血管疾病的重要遗传易感位点，比如冠心病，也与许多其他疾病，比如癌症、颅内动脉瘤、2 型糖尿病等有关。

从公司订购了转录因子 MAFG 的 siRNA，使用 ReFect 转染试剂将 siRNA 转入 BEL-7404 细胞，72h 后提取 RNA，RT-qPCR 检测敲低结合 SNP 的转录因子表达后对靶基因表达的影响。当用 siRNA-MAFG-3 和 siRNA-MAFG-4 转染，能把 MAFG 敲低 80%-90% 左右，*CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-ASI* 的转录水平明显相比于阴性对照 NC 明显下降 (图 14)。说明 *CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-ASI* 可能是 rs10811660 所在增强子的作用靶点。

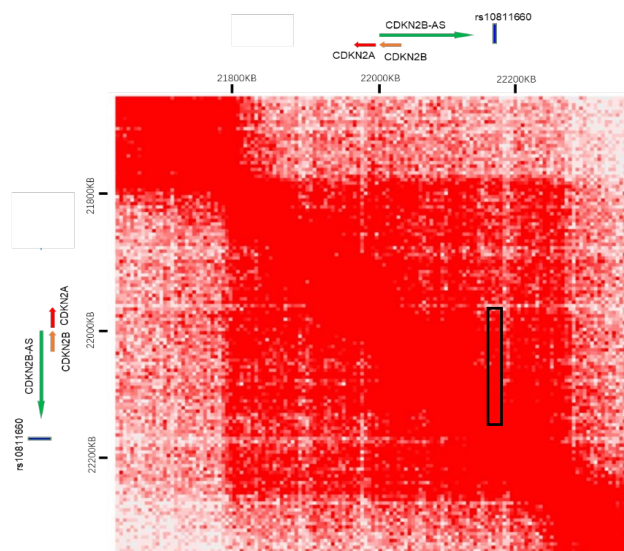


图 13 *CDKN2B-AS1*、*CDKN2A* 和 *CDKN2B* 与 rs10811660 位于一个拓扑关联域内

附注：图上的每一个红点代表相互作用位点，红色越密集表示相互作用越强。蓝色竖线为 rs10811660 所在位置，红色箭头为 *CDKN2A*，橙色箭头为 *CDKN2B*，绿色箭头为 *CDKN2B-AS1* 箭头的方向代表转录方向，箭头的长度代表基因的大小。基因和 SNP 位点的交点用黑色线条框起来。

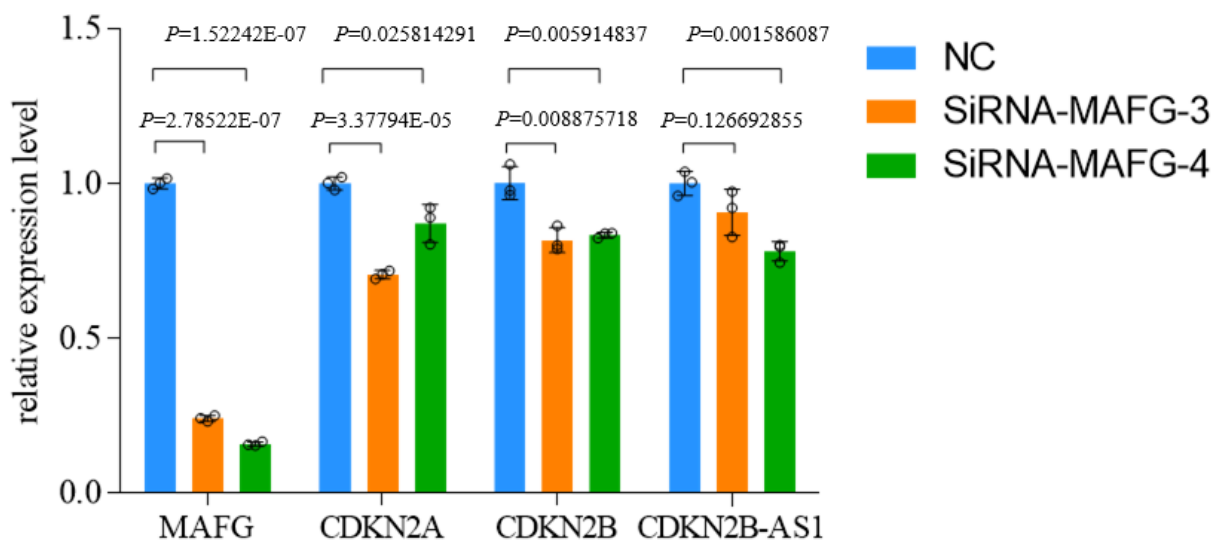


图 14 敲低 MAFG 后 *CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平下降

附注：在肝癌细胞 BEL-7404 中转染 siRNA 后，72 小时后提取 RNA，RT-qPCR，检测目的基因的表达水平。

3.4.5 敲除 rs10811660 对靶基因转录水平的影响

为了进一步验证 rs10811660 所在增强子的靶基因，我们将 rs10811660 片段敲除，检测敲除后哪些基因的表达受到影响。选择 rs10811660 上下游各 100-150bp 左右的 sgRNA1 和 sgRNA2，先后将 sgRNA1 和 sgRNA2 克隆到 CRISPR 载体 px333 中，每一步都会将构建的载体的单克隆菌落进行 PCR（图 15）。将构建好的含有双 sgRNA 的载体转入到人结肠癌细胞 HCT116 中，转染 48h 后再进行流式分选，挑取细胞，提取 DNA 进行 PCR 扩增，然后进行电泳鉴定以及测序鉴定。6 号细胞的 PCR 产物电泳条带比其它细胞系小（图 16），说明 6 号细胞系可能有片段敲除。我们将 6 号细胞系的 PCR 产物用一代测序后发现缺失的片段刚好位于两个 gRNA 的中间，与我们初始设计的一致（图 17）。这些结果表明 6 号单克隆细胞为敲除了 SNP 位点基因组的细胞系。我们又对 6 号单克隆细胞和野生型未敲除的细胞提取 RNA，RT-qPCR 检测敲除含有 SNP 片段的细胞系、未敲除含有 SNP 片段的细胞系中靶基因转录水平的变化。当基因组上含有 SNP rs10811660 的片段敲除后，*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平明显下降。表明 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 是其靶基因（图 18）。

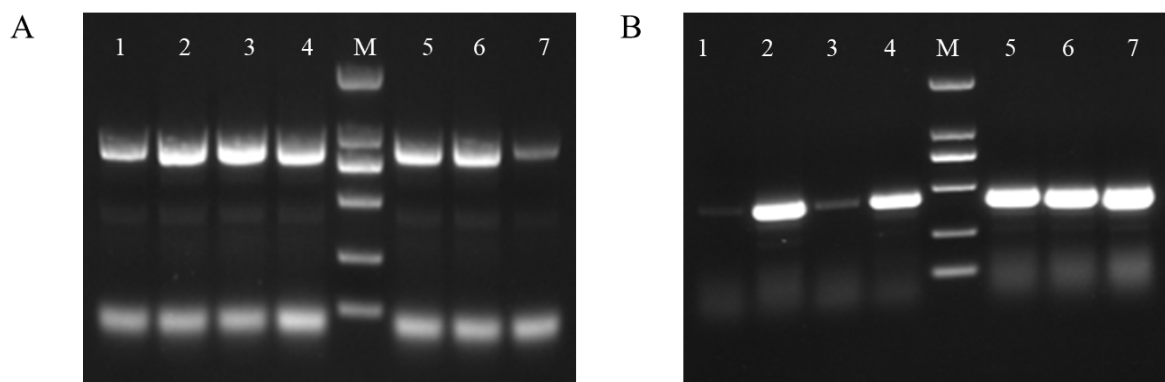


图 15 含 rs10811660 片段 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建

附注：A：px333-EGFP-puro-sgRNA1 单克隆进行菌液 PCR 扩增产物的电泳结果用 px333-EGFP-puro-sgRNA1 为模板进行 PCR，目的条带大约 840bp，选择第 2 和第 3 泳道的单克隆进行摇菌提质粒测序，检查 sgRNA1 插入是否正确。B：px333-EGFP-puro-sgRNA1+2 的单克隆进行菌液 PCR 扩增产物的电泳结果用 px333-EGFP-puro-sgRNA1+2 为模板进行 PCR，目的条带大约 400bp，选择第 2 和第 4 泳道的单克隆进行摇菌提质粒，再送去测序，检查 sgRNA2 插入是否正确。M 表示 Trans2K DNA Marker。

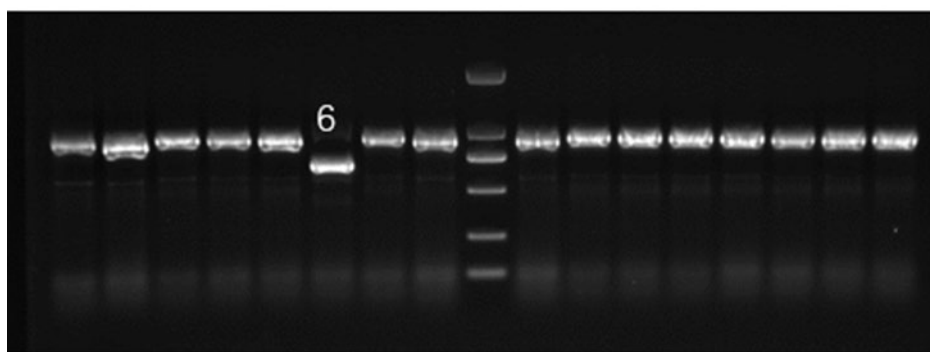


图 16 单克隆细胞电泳鉴定

附注：转染 CRISPR/Cas9 载体，会敲除大约 200bp，选择第 6 泳道的单克隆细胞，进行测序，检测是否把目的片段正确敲除。



图 17 单克隆 6 号细胞的测序结果

附注：将 6 号单克隆基因组扩增的产物进行一代测序，敲除的片段在两个 sgRNA 之间，成功把含有 rs10811660 的基因组片段敲除。

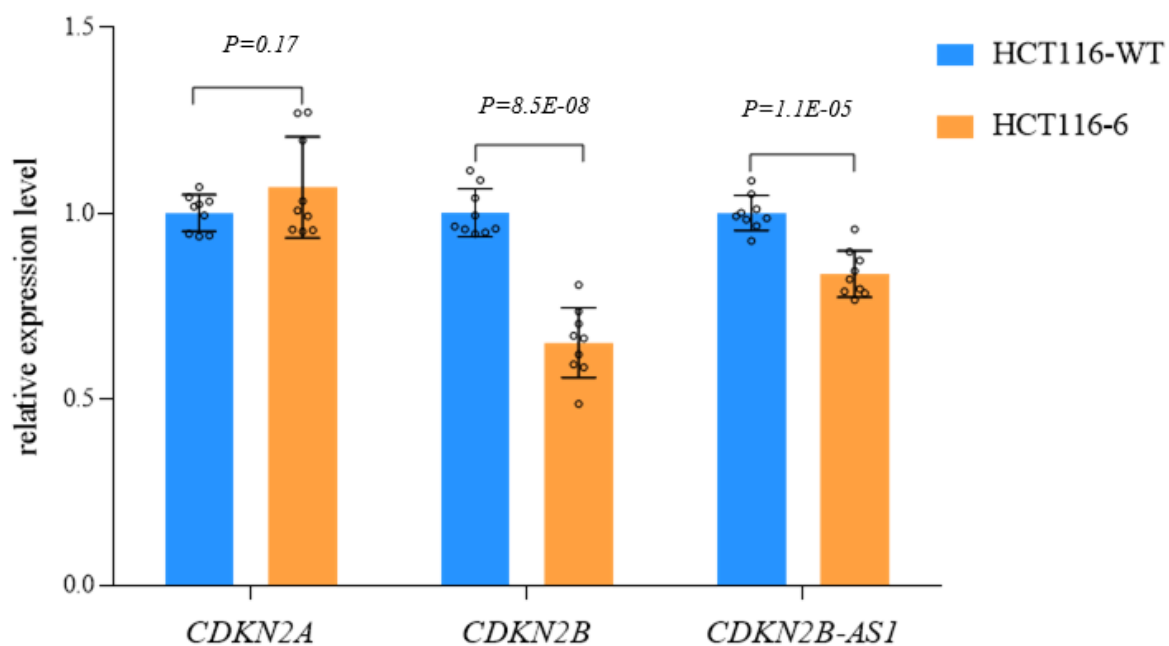


图 18 敲除含有 rs10811660 片段后 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平下降

附注：提取 6 号单克隆细胞和 WT 细胞的 RNA，进行反转录，RT-qPCR，检测目的基因的表达水平。

第四章 总结和讨论

糖尿病是危害人类健康最大的一种内分泌疾病，有必要对其致病机理深入研究。本文从关联分析确定的影响转录因子结合力的 SNP 位点中与 2 型糖尿病风险相关的 SNP 位点 rs10811660 入手，用收集到的陕西人群 T2DM 患者和对照人群的基因分型数据对该 SNP 位点进行交叉验证。我们在 UCSC 人类基因组上发现 rs10811660 处于 DNaseI 超敏感区域，转录调控元件通常位于这个区域周围，参与基因表达的调控，所以我们推测 rs10811660 这个位点所在位置具有转录调控元件的特征，可能通过与转录因子结合来达到增强子的效果。最终选取 rs10811660 这个位点进行研究。

SNP-SELEX 研究表明 rs10811660 会影响 MAFG 的结合，SNP-SELEX 是体外实验，所以我们先是用肝癌细胞 BEL-7404 进行了 ChIP 实验，探究细胞内的结合性。将与 MAFG 结合的 DNA 片段纯化出来，进行 qPCR 检测相对富集量，从 DNA 的富集程度可以检测 SNP rs10811660 A 和 G 两个碱基对转录因子的结合力。结果显示转录因子 MAFG 倾向结合与 G 等位基因，这与 SNP-SELEX 的结果一致，说明该位点具有影响基因转录的潜力。生物信息学分析表明 rs10811660 位于增强子区域，我们通过构建 pGL4.23-rs10811660-A 和 pGL4.23-rs10811660-G 载体进行双荧光素报告系统的实验，探究两个等位基因增强作用的差异。结果显示 SNP rs10811660 的 G 等位基因增强下游报告基因表达的效果比 A 等位基因强。我们推测 SNP rs10811660 对其周围的基因应该也有增强其转录水平的作用，通过 Hi-C 数据找到 SNP rs10811660 周围的基因有 *CDKN2A*、*CDKN2B* 和 *CDKN2B-AS1*。之前有研究报道，*CDKN2A/2B* 基因过表达可导致胰腺发育不全和糖尿病。*CDKN2B-AS1* 基因位点上的 SNP rs10757274 的 A 碱基具有增加 2 型糖尿病和高脂血症疾病风险发生的概率^[55]。我们通过在肝癌细胞 BEL-7404 转染 siRNA 把 MAFG 沉默以及构建 CRISPR/Cas9 载体转染到人结肠癌细胞 HCT116 把 SNP rs10811660 这个位点敲除来看对周围基因的表达情况是否有影响。当转染 siRNA 把 MAFG 敲低后以及把含 SNP rs10811660 基因组片段敲除后，*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平明显下降，表明转录因子 MAFG 及 SNP rs10811660 参与周围基因的表达调控。

2 型糖尿病的复杂性在于其涉及到多个组织器官，包括胰脏、肝脏、肌肉、脂肪、肠道等。肝脏通过血液中胰岛素水平和胰岛素敏感性来调节血糖。当正常人进食之后，血糖水平升高，胰岛素会向肝脏发出信号，肝脏会将葡萄糖转化为肝糖原，储存在肝脏中。而 2 型糖尿病患者胰岛素分泌缺陷或肝脏胰岛素不敏感时，体内的葡萄糖不能被吸收，导致葡萄糖转变成脂肪，形成脂肪肝。这样就进一步加重了胰岛素抵抗，使糖代谢和脂质代谢发生紊乱，形成恶性循环。可见肝脏在 2 型糖尿病的发生发展中起着重要作用。脂肪肝与 2 型糖尿病的关系密切，2 型糖尿病患者中脂肪肝的发生率高达 68%^[61]。所以我们选取肝脏组织来源细胞，研究在糖尿病患者和非糖尿病患者中有显著差异的位点 rs10811660。我们在人肝癌细胞系 BEL-7404 中验证了 rs10811660 不同等位基因对转录因子 MAFG 的结合力差异、对增强子增强转录的差异以及敲低结合其上的转录因子表达后对下游基因表达的影响

当我们在做敲除含 SNP rs10811660 基因组片段的细胞系时发现，BEL-7404 对于转染 CRISPR/Cas9 载体的效率非常低，并且经过流式分选的 BEL-7404 细胞的单克隆细胞很难存活。所以将这个实验更换为实验室经常使用的结肠癌细胞系 HCT-116 里进行，因为肠道也影响 2 型糖尿病的发生发展。早在上个世纪，就在肠道中发现了肠促胰岛素，可以促进胰岛细胞分泌胰岛素。肠促胰岛素在胰岛素分泌过程中起决定性作用，所以口服葡萄糖比静脉输注葡萄糖起效更快，对胰岛素分泌的促进作用更为强烈。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是肠促胰岛素系统的一种激素，当 GLP-1 进入血液，刺激胰岛细胞分泌胰岛素^[62]。在 2 型糖尿病患者中这些功能受损，需要服用药物来抑制胰高血糖素释放、抑制葡萄糖吸收、刺激 GLP-1 释放。

除了 HCT116 是结肠癌细胞系这个 2 型糖尿病的相关组织细胞系外，我们选择 HCT116 还有一个原因，那就是 HCT116 中 SNP rs10811660 位点的基因型是 G/G。我们之前的实验验证了转录因子 MAFG 更倾向结合于 rs10811660 的 G 等位基因，并且 G 等位基因有更高的增强子效应。理论上讲，将 HCT116 中含 SNP rs10811660 基因组片段敲除，对 *CDKN2A*、*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的表达影响应该比杂合子细胞更强。选取两种细胞系做实验的缺点在于两种细胞系不好统一，在肝脏细胞中结果不一定适用于肠道细胞。但在构建的 HCT116 敲除含 SNP rs10811660 基因组片段的细胞系中，*CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的转录水平也明显下降，说明 rs10811660

调控 *CDKN2B* 以及 *CDKN2B-AS1* 的表达在肝脏和肠道细胞中是一致的。

本研究中所有实验均建立在细胞模型上，在本课题的深入研究中，我们将会引入小鼠模型，构建敲除确定与 2 型糖尿病相关基因的敲除小鼠。与基因未敲除的小鼠作比较，在正常饮食下或者在高糖高脂饮食诱导下，检测小鼠空腹血糖、血脂、胰岛素水平、糖化血红蛋白等生理生化的指标，体重的变化，进行葡萄糖耐量和胰岛素耐量试验，探索在动物模型中这些基因的功能，以及这些基因如何去影响 2 型糖尿病，在 2 型糖尿病的发生发展中起到什么样的作用。

GWAS 提供了令人信服的遗传关联，但也有局限性^[63]，通常不能解释疾病的分子机制^[64]。所以出现的问题是，越来越多的风险位点能否在功能层面上提供与疾病相关的证据^[36]。在许多情况下，疾病表型可以与特定的细胞类型或转录因子相关^[65]。多数与疾病相关 SNP 位于转录因子密集结合的非编码调控元件中^[66, 67]。一些 SNPs 通过调节增强子中的转录因子结合，参与调控组织特异性基因表达和疾病易感性^[68]。转录因子识别特定的 DNA 序列来控制染色质和转录，形成一个复杂的系统来指导基因组的表达，转录因子和转录因子结合位点的突变是许多人类疾病的基础^[69]。通过改变转录因子结合位点，导致增强子功能异常，而增强子功能异常往往导致癌基因异常调控或者患病的关键^[70]。

我们通过以影响转录因子结合力的 SNP 位点为切入点，与 2 型糖尿病风险相关位点相结合，以此来找到影响 2 型糖尿病并且具有功能性的 SNP 位点。筛选出具有生物学功能的且与 2 型糖尿病相关的 SNP，为以后的实验提供候选数据，并且通过分子生物学研究，初步确定与 2 型糖尿病风险相关 SNP 的分子功能，为后续深入研究 2 型糖尿病的致病机理打下基础。

参考文献

- [1] 肖珊, 阿勒滕齐齐格, 姚华等. CDKAL1、CDKN2A/2B、FTO 基因多态性与维吾尔族 2 型糖尿病的关联以及基因间交互作用研究 [J]. 中国医药导报. 2017, 14(09): 16-21+30.
- [2] Jason F, C F J. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. [J]. Nature reviews. Genetics. 2016, 17(9):
- [3] Transferability and fine mapping of type 2 diabetes loci in African Americans: the Candidate Gene Association Resource Plus Study. [J]. Diabetes. 2013, 62(3): 965.
- [4] 单忠艳. 根据 2018 年美国糖尿病学会标准诊断中国糖尿病患病率: 全国横断面研究 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2020, v.40; No.05(05): 314-314.
- [5] Pradas-Juni M, Hansmeier N R, Link J C, et al. A MAFG-lncRNA axis links systemic nutrient abundance to hepatic glucose metabolism [J]. Nature communications, 2020, 11(1). 2020, 11(1): 644.
- [6] Zhang Y, Lazzarini P A, Mcphail S M, et al. Global Disability Burdens of Diabetes-Related Lower-Extremity Complications in 1990 and 2016 [J]. Diabetes Care, 2020, 43(5): dc191614.
- [7] 张绍维, 李鹏飞, 孙文娟等. 2 型糖尿病患者遗传性病例对照研究 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(12): 1463-1464.
- [8] Wang X, Strizich G, Hu Y, et al. Genetic markers of type 2 diabetes: Progress in genome-wide association studies and clinical application for risk prediction [J]. Journal of Diabetes, 2016, 8 (1).
- [9] 廖晓玲. 硫化氢通过调节 Ihh/Gli1 通路保护人脐静脉内皮细胞对抗高糖引起的损伤 [D]; 南方医科大学, 2018.
- [10] Kreznar J H, Keller M P, Traeger L L, et al. Host Genotype and Gut Microbiome Modulate Insulin Secretion and Diet-Induced Metabolic Phenotypes [J]. Cell Reports, 2017, 18(7): 1739-1750.
- [11] Pedersen H K, Gudmundsdottir V, Nielsen H B, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity [J]. Nature, 2016, 535(7612): 376-381.
- [12] Stumvoll M, Goldstein B J, Haeften T J L. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [J]. Lancet, 1900, 365(9467): 1333-1346.

- [13] 李超, 潘建明, 罗新根等. 桑叶提取物对糖尿病小鼠糖耐量的影响 [J]. 海南医学, 2012, 23(3):3.
- [14] Alberti K, Zimmet P Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation original articles [J]. Diabetic Medicine, 1998, 15(7):539-553.
- [15] Zheng C, Man C D, Cobelli C, et al. A common variant in the MTNR1b gene is associated with increased risk of impaired fasting glucose (IFG) in youth with obesity [J]. Obesity, 2015, 23(5):
- [16] Saxena R, Hivert MF, Langenberg C, et al. Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge [J]. Nature Genetics. 2010, 42(2): 142-148.
- [17] 刁雪. 2 型糖尿病患者认知功能障碍的影响因素分析 [D]; 吉林大学, 2019.
- [18] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4):95.
- [19] 张民. 糖化血红蛋白测定在糖尿病诊断中的临床意义[J]. 吉林医学, 2014, 06(6):28-29.
- [20] 王丽娟, 纪立农. 国际专家委员会关于糖化血红蛋白检测在糖尿病诊断中的作用的报告[J]. 中国糖尿病杂志, 2009(8):6.
- [21] 鞠晓妮. 银杏叶片联合左卡尼汀对糖尿病性视网膜病变激光治疗后的保护作用 [D]; 青岛大学, 2016.
- [22] 王娜, 海荣, 俞东征. 鼠疫菌全基因组单核苷酸多态性研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2):4.
- [23] Jaing R, Duan J, Windemuth A, et al. Genome-wide evaluation of the public SNP databases [J]. Pharmacogenomics, 2003, 4(6): 779-789.
- [24] 解方. 遗传性全白甲家系 KLF7,CPO,LOC389071,CREB1 基因突变分析 [D]; 中国人民解放军军医进修学院, 2007.
- [25] 李婧, 潘玉春, 李亦学等. 人类基因组单核苷酸多态性和单体型的分析及应用 [J].遗传学报, 2005, 032(008): 879-889.
- [26] Komar A A . Genetics. SNPs, silent but not invisible[J]. Science, 2007, 315(5811):466-467.
- [27] 于美娟, 秦兵, 石奕武等. 癫痫伴热性惊厥附加症患者 SCN2A 基因突变的筛查 [J]. 山东大学学报; 医学版, 2010, 48(7): 4.
- [28] Tran H, Takeshima Y, Surono A, et al. A G-to-A transition at the fifth

- position of intron-32 of the dystrophin gene inactivates a splice-donor site both in vivo and in vitro [J]. *Molecular Genetics & Metabolism*, 2005, 85(3): 213-219.
- [29] Chen X F, Zhu D L, Yang M, et al. An Osteoporosis Risk SNP at 1p36.12 Acts as an Allele-Specific Enhancer to Modulate LINC00339 Expression via Long-Range Loop Formation - ScienceDirect [J]. *The American Journal of Human Genetics on SciVerse ScienceDirect*, 2018, 776-793.
- [30] Mahajan A, Taliun D, Thurner M, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps [J]. *Nature Genetics*, 2018, 50(11):
- [31] 钟英强, 朱兆华. 人类基因组单体型图在人类常见病相关性基因研究中的应用与展望[J]. *国际内科学杂志*, 2007, 34(4):4.
- [32] 赵春霞, 石先哲, 吕申等. 人类基因组的单核苷酸多态性及其研究进展 [J]. *色谱*, 2003, 21(2): 5.
- [33] 耿茜, 蒋玮莹. 人类基因组单体型图计划及其意义[J]. *国外医学(遗传学分册)*, 2005, 28(1): 1-5.
- [34] 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing [J]. *Nature*, 2010, 467(7319):1061-73.
- [35] Flannick J, Florez J C. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(9).
- [36] Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Nature Genetics*, 2012,44(9):981-90.
- [37] Xue A, Wu Y, Zhu Z, et al. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1):
- [38] Hu C, Jia W J D. Diabetes in China: Epidemiology and Genetic Risk Factors and Their Clinical Utility in Personalized Medication [J]. *Diabetes*, 2018, 67(1): 3-11.
- [39] 杨雪. 热量限制治疗 2 型糖尿病的代谢组学研究及其保护胰岛 β 细胞功能的分子机制 [D]; 南京中医药大学, 2019.
- [40] Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, et al. Evaluation of the Association of IGF2BP2 Variants With Type 2 Diabetes in French Caucasians [J]. *Diabetes*, 2008, 57(7): 1992-1996.

- [41] Rao P, Wang H, Fang H, Gao Q, Zhang J, Song M, Zhou Y, Wang Y, Wang W. Association between IGF2BP2 Polymorphisms and Type 2 Diabetes Mellitus: A Case-Control Study and Meta-Analysis [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2016, 13(6):574.
- [42] Cui B, Zhu X, Min X, et al. A Genome-Wide Association Study Confirms Previously Reported Loci for Type 2 Diabetes in Han Chinese [J]. Plos One, 2011, 6(7): e22353.
- [43] Lewis, JP, Palmer, et al. Association analysis in African Americans of European-derived type 2 diabetes single nucleotide polymorphisms from whole-genome association studies [J]. Diabetes, 2008, 2008,57(8)(-): 2220-2225.
- [44] Sirugo G, Williams S M, Tishkoff S A J C. The Missing Diversity in Human Genetic Studies [J].Cell, 2019, 177(1): 26-31.
- [45] Marigorta U M, Navarro A, Williams S M J P G. High Trans-ethnic Replicability of GWAS Results Implies Common Causal Variants [J]. PLoS Genetics, 2013, 9(6): e1003566.
- [46] A prostate cancer susceptibility allele at 6q22 increases RFX6 expression by modulating HOXB13 chromatin binding[J]. Nature Genetics. 2014, 46(2): 126-135.
- [47] Hartman M G, Lu D, Kim M L, et al. Role for Activating Transcription Factor 3 in Stress-Induced β -Cell Apoptosis [J]. Molecular & Cellular Biology, 2004, 24(13): 5721-5732.
- [48] Ku H C, Cheng C F. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer [J]. Frontiers in endocrinology, 11:556.
- [49] A M T, S C F, J C N, et al. Finding the missing heritability of complex diseases [J].Nature. 2009, 461(7265):747-53.
- [50] 岳一军. 恩格列净二甲双胍片制备工艺的研究 [D]; 浙江工业大学, 2020.
- [51] Yan J, Qiu Y, Santos A, et al. Systematic analysis of binding of transcription factors to noncoding variants [J]. Nature. 2021,591(7848):147-151.
- [52] Sudlow C, Gallacher J, Allen N, et al. UK Biobank: An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex

- Diseases of Middle and Old Age [J]. PLOS Medicine, 2015, 12(3):e1001779.
- [53] Hu C, Zhang R, Wang C, et al. PPAR γ , KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A-CDKN2B, IDE-KIF11-HHEX, IGF2BP2 and SLC30A8 Are Associated with Type 2 Diabetes in a Chinese Population [J]. PLoS ONE, 2009, 4(10): e7643.
- [54] Kong Y, Sharma R B, Ly S, et al. CDKN2A/B T2D Genome-Wide Association Study Risk SNPs Impact Locus Gene Expression and Proliferation in Human Islets [J]. Diabetes, 2018, 67(5):872-884.
- [55] 刘志科, 李建平, 张岩等. 冠心病易感基因 CDKN2B-AS1 位点 rs10757274 基因型对 2 型糖尿病、高脂血症的多效性作用 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(02): 93-97.
- [56] Vujkovic M, Keaton J M, Lynch J A, et al. Discovery of 318 new risk loci for type 2 diabetes and related vascular outcomes among 1.4 million participants in a multi-ancestry meta-analysis [J]. Nature Genetics, 2020, 1-12.
- [57] Salas E, Rabhi N, Froguel P, et al. Role of Ink4a/Arf Locus in Beta Cell Mass Expansion under Physiological and Pathological Conditions [J]. Journal of Diabetes Research, 2014, 2014:873679.
- [58] Krishnamurthy J, Ramsey M, Ligon K, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential [J]. Nature, 2006, 443(7110): 453.
- [59] 管丽红, 陈卓敏, 王占科等. 全血标本红细胞浓度对不同放置时间后血糖测定结果影响研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12):4.
- [60] Li H, Wang B, Liu D, et al. SNPscan as a high-performance screening tool for mutation hotspots of hearing loss-associated genes [J]. Genomics, 2015, 106(2):83-7.
- [61] Younossi Z M, Golabi P, Avila L D, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis [J]. J Hepatol. 2019 Oct;71(4):793-801.
- [62] Brunton S A, Wysham C. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes: role and clinical experience to date [J]. Postgraduate Medicine, 2020, 132(sup2):3-14.
- [63] Tam V, Patel N, Turcotte M, et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies [J]. Nature Reviews Genetics, 2019, 20(8):467-

484.

- [64] Hindorff L A, Sethupathy P, Junkins H A, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(23): 9362-9367.
- [65] Dunham I, Kundaje A. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome [J]. *Nature*, 2012, 489(7414).
- [66] Stacey L, Edwards, Jonathan, et al. Beyond GWASs: Illuminating the Dark Road from Association to Function[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2013, 7;93(5):779-97.
- [67] Yan J, Enge M, Whittington T, et al. Transcription Factor Binding in Human Cells Occurs in Dense Clusters Formed around Cohesin Anchor Sites [J]. *Cell*, 2013, 154(4): 801-813.
- [68] Ping G, Xia J H, Csilla S, et al. Biology and Clinical Implications of the 19q13 Aggressive Prostate Cancer Susceptibility Locus [J]. *Cell*, 2018, 174(3): 576-589.e518.
- [69] Lambert S A, Jolma A, Campitelli L F, et al. The Human Transcription Factors [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 650-665.
- [70] Sur I, Taipale J J N R C. The role of enhancers in cancer [J]. *Nature reviews Cancer*, 2016, 16(8):483-93.

致谢

时光飞逝，日月如梭，转眼间三年的研究生生活就要结束了。这三年来，收获了很多，成长了很多。回首这三年的生活，百感交集，但心中充盈最多还是感激。

首先，感谢西北大学给我继续学习的机会，提供给我高等教育的资源支持。感谢学院里的每一位老师为我们排忧解难，不管是在刚入学懵懂无知的时期还是在即将毕业的迷茫困惑时期，甚至是疫情期间，我们需要待在宿舍隔离，老师们也会给我们精神上的鼓励以及提供物质上的支持，老师们始终给我们无微不至的照顾。

其次，我要感谢严健老师课题组，从选择课题到完成论文，都是在老师们的一步一步耐心指导和支持下完成的。本人的学位论文离不开严健老师和宁永强老师，在课题进行阶段中，严老师耐心听取我们的阶段汇报，分析解决实验的问题并提出相应的修改措施。严老师开阔的视野，严谨的科学态度深深的激励着我，是我以后学习的榜样，以及对我们的严格要求和悉心指导，使我终生受益匪浅。感谢宁永强老师平时在生活和实验上对我的关心和指导，宁老师仔细认真的科研精神和卓有成效的科研方法给我留下深刻印象，不管科研上遇到的小问题还是大问题，每一次跟老师沟通完都能解决我的疑问困惑和实验上的难题。还要感谢董靖老师、孙文举老师、樊立刚老师以及陈尔飞老师对我的帮助，让我对专业知识有了更深刻的了解，你们深厚的学术底蕴也使我终生受益。同时感谢吴楠师兄和李晓雨师姐在科研上给我的帮助，解决我的困惑，感谢师弟师妹们在平时科研工作中的支持和帮助，感谢师妹陈仪欣给予我的帮助鼓励以及跟我分享快乐，感谢侯荣荣师妹在我生病时期的悉心关怀。感谢老师们和师兄师姐师弟师妹们，一起创造了一个优越的科研和学习环境，跟你们在一起学习，一起实验的日子我会终生难忘。还要感谢我的舍友在生活上给予我的关心，特别感谢舍友赵小红在论文写作和校对过程中对我的帮助。感谢陪我一起度过这几年的每一位老师和同学们，正是有了你们的帮助，我才能克服困难，解决问题，直到最后顺利完成学业。

还要感谢我的家人们，多年来始终如一的支持我完成我的学业，感谢我的母亲在生活上给我细心地照顾。

最后，感谢百忙之中参与审阅、评价以及论文答辩的老师们。这段人生中的美好时光，我将好好珍惜。感谢所有帮助过我的人，祝你们身体健康一切顺利！