

恒河猴 p53 基因沉默靶点在细胞水平的验证

苏静芬¹, 张晨², 李雨函¹, 刘先菊¹, 佟巍¹, 向志光¹,
石亮¹, 石桂英¹, 刘云波¹

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 北京大学生命科学学院 100871)

【摘要】目的 为建立恒河猴 p53 基因沉默模型, 首先在细胞水平筛选和测定恒河猴 p53 基因有效沉默靶点。**方法** 测定非洲绿猴肾来源成纤维细胞 COS-7 中 p53 基因的表达水平; 对恒河猴 p53 基因做生物信息学分析, 优选靶序列设计 shRNA, 克隆入慢病毒载体 FUGW-TDT, 转染 COS-7 细胞, 以 real-time PCR 检测 p53 mRNA 抑制水平, 以 Western blot 检测 p53 蛋白水平表达变化。**结果** 在 COS-7 细胞检测到 p53 基因的表达; 生物信息学筛选到 3 个靶片段, 分别位于 p53 mRNA 的 238 ~ 258 bp, 681 ~ 701 bp, 169 ~ 189bp, 均在开放阅读框内; p53 三个靶位点的沉默效率在 mRNA 水平分别为 $(87.17 \pm 4.03)\%$, $(72.62 \pm 4.11)\%$, $(76.22 \pm 0.98)\%$; 在蛋白水平的沉默效率分别为 $(84.44 \pm 2.18)\%$, $(71.04 \pm 1.18)\%$, $(74.17 \pm 0.95)\%$ 。**结论** 在细胞水平筛选得到 3 个有效的 p53 基因沉默靶点, 可用于后续的恒河猴基因沉默研究。

【关键词】 基因沉默; p53 基因; 恒河猴

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.002

Rhesus monkey P53 gene silencing at the cellular level

SU Jing-fen¹, ZHANG Chen², LI Yu-han¹, LIU Xian-ju¹, TONG Wei¹, XIANG Zhi-guang¹,
SHI Liang¹, SHI Gui-ying¹, LIU Yun-bo¹

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;
2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

【Abstract】Objective In order to establish a rhesus monkey model of p53 gene silencing, firstly we screened and determined the effective silencing targets of p53 gene at the cellular level in rhesus monkey. **Methods** The expression of p53 gene was detected in COS-7 cells (derived from the kidney of the African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*). Three small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting rhesus monkey p53 gene were designed, analysed by bioinformatics, and inserted into lentivirus-based gene silencing constructs FUGW-TDT. The plasmids of p53-RNAi and control vector were transfected into the COS-7 cells, respectively. The suppression of p53 mRNA was detected by real-time PCR, and the changes of p53 protein expression were detected by Western blot assay. **Results** p53 gene expression was detected in COS-7 cells. Bioinformatics analysis showed that three gene-silencing sequences were screened which lied in the open reading frame (ORF) region and targeted 238 – 258bp, 681 – 701bp, 169 – 189bp of the rhesus monkey p53 mRNA. At 48 hrs after transfection of the three silencing constructs, p53 mRNA was suppressed by $(87.17 \pm 4.03)\%$, $(72.62 \pm 4.11)\%$ and $(76.22 \pm 0.98)\%$, and p53 protein was suppressed by $(84.44 \pm 2.18)\%$, $(71.04 \pm 1.18)\%$ and $(74.17 \pm 0.95)\%$, respectively. **Conclusions** We obtained three effective target sequences showing high efficiency in p53 silencing, which can be

[基金项目] 国家科技支撑计划 (No. 2014BAI03B01)。

[作者简介] 苏静芬 (1987 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物学。E-mail: jingfensu@126.com。

[通讯作者] 刘云波, E-mail: yunbolu@126.com。

used in further studies on gene silencing in rhesus monkey.

【Key words】 Gene silence; p53 gene; Rhesus monkey

啮齿类动物与人类亲缘关系较远,物种间的种属差异使得啮齿类动物的肿瘤模型在应用中受到诸多因素的限制^[1]。恒河猴等非人灵长类动物在亲缘关系上和人最接近,因此建立肿瘤的非人灵长类动物模型对于相关疾病的研究具有重要的意义。

恒河猴等非人灵长类动物存在一定的自发肿瘤,以消化系统肿瘤为多^[2],但肿瘤发生率,尤其是肌肉骨骼和呼吸系统肿瘤发生率较低^[3],因此较难使用恒河猴的自发肿瘤来建立动物肿瘤模型。随着转基因等技术在非人灵长类动物的操作成功^[4],通过基因修饰来改变恒河猴等非人灵长类动物的肿瘤易感性,从而最终建立有效的肿瘤动物模型已经成为一个热点领域。

p53 基因是十分重要的抑癌基因,p53 基因缺失或基因突变在肿瘤的发病机制中起到重要的作用。在原发性肿瘤中 p53 突变发生率近 50%^[5]。在恒河猴等非人灵长类动物抑制 p53 基因的表达水平有可能提高其肿瘤发生率,从而建立可用的肿瘤模型。基于 RNA 干扰技术的日臻成熟,而 p53 异常与肿瘤的发生关系密切,为建立恒河猴 p53 基因沉默模型,本文将首先在细胞水平筛选和测定恒河猴 p53 基因有效沉默靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

COS-7 细胞来自中国医学科学院基础研究所细胞中心,Vero, Vero-E6 细胞来自 ATCC 细胞库。细胞所用培养液为 DMEM (Hyclone),含 10% 胎牛血清(Gibco)。在含 5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱中培养。

1.2 p53-RNA 干扰慢病毒载体的构建

慢病毒载体 FUGW-TDT 含有 ubiquitin promoter (Ubi promoter) 调控的红色荧光蛋白 tandem dimer Tomato (tdt) 报告基因,与 U6 启动子调控的 RNA 干扰片段共表达。

根据恒河猴 p53 基因的序列,依照 shRNA 的设计原则和 Life Technology 在线设计工具,选择了 3 个靶点设计了 shRNA 序列。将目的片段连至经 Xho I 和 Xba I 双酶切后的线性化慢病毒载体 FUGW-TDT 中,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞(全式金公司),挑单菌落培养后进行菌液鉴定及测序(菌

液 PCR 及测序引物均为 F:5'-AGGAAGATGGCT GTGAGG-3'; R:5'-GCCTTGATCGTATAAGC-3'),挑取阳性克隆菌液进行质粒抽提并且命名为 FUGW-TDT-shP53,本实验的阴性对照为不含 shRNA 的 FUGW-TDT 空质粒。

1.3 慢病毒质粒转染细胞

第 1 天在六孔板中按 $(6 \sim 8) \times 10^5$ 细胞/孔接种细胞,第 2 天细胞密度达 60% ~ 80% 时进行转染。本实验所用转染试剂为 polyethylenimine (Polysciences),简称 PEI。按质粒:PEI = 1:3 的比例配制转染混合物,震荡混匀静置 30 min 后滴入六孔板中,避免震荡。每个质粒做 3 个复孔。48 h 后观察荧光并进行流式分选。

1.4 用荧光激活细胞分选仪 (FACS) 分选红色荧光细胞

收取转染 48 h 后细胞,PBS 洗 3 遍,离心去除上清液,用 200 μ L PBS 重悬,用 200 目尼龙膜过滤后,上机(BD, Aria I)分选。

1.5 普通 PCR 和 SYBR-Green 法实时荧光定量 PCR

按照 Invitrogen Trizol Reagent 说明书抽提细胞总的 RNA,逆转录及 PCR 反应按照试剂盒说明书操作。p53 基因所用引物为 F:5'-CCCTTCCCAGAAACCTACC-3', R:5'-CTCCGTCATGTGCTGTGACT-3' 预计扩增出 223 bp 左右的目的片段。内参 GAPDH 的引物选自文献^[6],F:5'-ACATCATCCCTGCCTCTACTGG-3', R:5'-AGTGGGTGTCGCTTTGAGATC-3', 预计扩增出 261bp 左右的目的片段。PCR 反应程序:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 20 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环,72℃ 延伸 10 min。

1.6 Western Blot

将细胞培养液弃掉,用 PBS 洗细胞 2 次,然后弃掉,加入蛋白裂解液,吹打均匀后吸入 1.5 mL EP 管,离心弃沉淀,测定浓度。总蛋白上样量为 20 μ g。取适量上清液与 sample buffer 混合。沸水煮变性后离心。SDS-PAGE 电泳,转膜加一抗(mouse anti-monkey p53, Santa Cruz),二抗,然后 X-胶片曝光,暗室显影。最后用 Image J 软件对图像进行灰度扫描分析。

表 1 恒河猴 p53 基因沉默靶点
Tab. 1 The gene silence sites of rhesus monkey p53

靶点 Sites	序列(5' - 3') Sequences	区域 Regions	位置 Positions
shRNA 1	GATCTTGCACAATGGTTAACT	ORF	238 - 258 bp
shRNA 2	GCGCACAGAGGAAGAGAATTT	ORF	681 - 701 bp
shRNA 3	GCCTTCCTGCATTCTGGAACA	ORF	169 - 189 bp

1.7 统计学方法

采用 Student's *t* 检验。

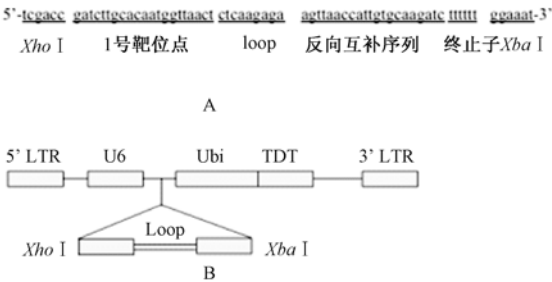
2 结果

2.1 生物信息学分析

根据恒河猴 p53 基因序列,依照 shRNA 的设计原则和 Life Technology 网站 (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=261946071111563135>) 选择了 3 个靶点设计了 shRNA 序列,具体序列和在恒河猴 p53 mRNA 中的位置见表 1。3 个靶点均与非洲绿猴 p53 基因 100% 同源。

2.2 p53-RNA 干扰慢病毒载体构建

首先将针对靶位点的 21 nt 寡核苷酸的以正反向组合,中间添加 loop 环结构(序列为 CTCAAGAGA),使寡核苷酸可以形成发夹结构。另添加转录终止子 TTTTTT。并且在正义链模板的 5' 端添加 XhoI 酶切位点,在反义链模板的 5' 端添加 XbaI 酶切位点。由此合成靶序列的 oligoDNA (图 1A)。之后将 oligoDNA 连接在 U6 启动子的下游,成功构建 FUGW-TDT-p53shRNA 载体(图 1B)。



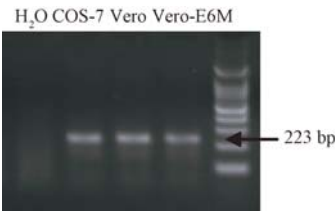
注:A:针对恒河猴 p53 的特异的 shRNA-1 的双链寡核苷酸 DNA 序列的正义链;
B:FUGW-TDT-shp53 慢病毒载体
图 1 结构示意图

Fig. 1 The frame of FUGW-TDT-shp53

2.3 p53 细胞丰度检测

我们选取了 COS-7、Vero、Vero-E6 三种细胞检测 p53 丰度,提取 RNA 后逆转录为 cDNA,普通 PCR

后电泳(图 2)。结果显示三种细胞 p53 的丰度均较高,我们选取 COS-7 用于基因抑制效率检测。



注:图示为 p53 在 COS-7、Vero、Vero-E6 三种细胞的丰度。H₂O 为阴性对照。

图 2 p53 细胞丰度检测

Note. There is the abundance of three types of cells: COS-7, Vero, and Vero-E6 cells. H₂O is the negative control.

Fig. 2 Detection of the p53 abundance

2.4 p53 mRNA 水平沉默效率检测

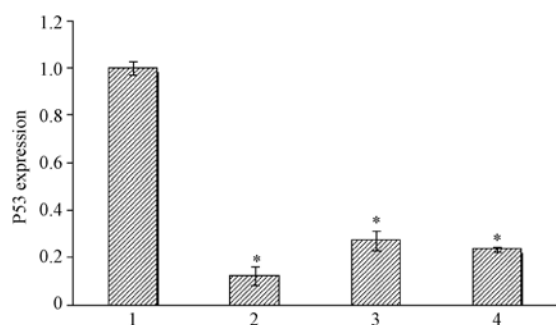
为了确定 3 个 shRNA 质粒的沉默效率,在转染 48 h 之后,trizol 法分别抽提 RNA,逆转录后进行 real-time PCR,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。如图 3 所示,与对照 FUGW-TDT 相比,3 个 shRNA 对应的 P53 基因 mRNA 表达量均明显降低 ($P < 0.05$)。其中 FUGW-TDT-shp53-1 的沉默效率为 $(87.17 \pm 4.03)\%$, FUGW-TDT-shp53-2 的沉默效率为 $(72.62 \pm 4.11)\%$, FUGW-TDT-shp53-3 的沉默效率为 $(76.22 \pm 0.98)\%$ 。三个靶位点在 p53 mRNA 水平的沉默效率均很明显。

2.5 p53 蛋白水平沉默效率检测

Western Blot 检测 p53 基因蛋白的表达,结果表明转染了 p53shRNA 的细胞,蛋白表达量明显低于转染了 FUGW-TDT 的对照组(图 4 A)。其中 FUGW-TDT-shp53-1 的沉默效率为 $(84.44 \pm 2.18)\%$, FUGW-TDT-shp53-2 的沉默效率为 $(71.04 \pm 1.18)\%$, FUGW-TDT-shp53-3 的沉默效率为 $(74.17 \pm 0.95)\%$ (图 4 B)。三个靶位点在 p53 蛋白水平的沉默效率均很明显。Western Blot 的结果和 real-time PCR 保持一致。

3 讨论

p53 基因是人类研究的最多的抑癌基因。据文

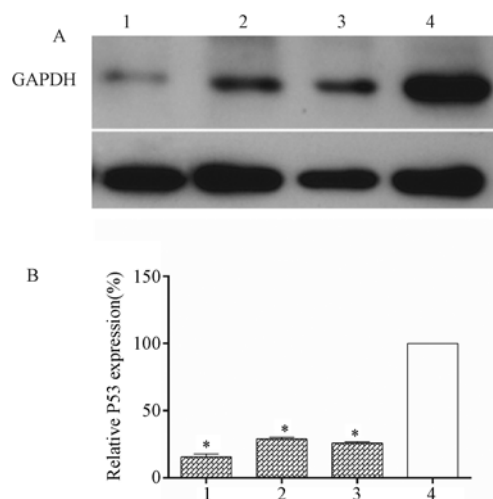


注:1:对照组 FUGW-TDT;2:FUGW-TDT-shp53-1;
3: FUGW-TDT-shp53-2;4: FUGW-TDT-shp53-3;
n=3, * 代表 $P < 0.05$ vs 对照组 FUGW-TDT

图 3 SYBR-Green 法 Real-time PCR 检测 p53 基因 mRNA 的表达

Note. 1. Control group FUGW-TDT; 2. FUGW-TDT-shp53-1;
3: FUGW-TDT-shp53-2; 4: FUGW-TDT-shp53-3;
n=3, * means $P < 0.05$ vs. control group FUGW-TDT.

Fig. 3 Detection of p53 mRNA by real-time PCR



注:图 A:Western Blot 图 B:灰度扫描图像分析结果

图 4 Western Blot 检测 p53 蛋白的表达

1:FUGW-TDT-shp53-1;2: FUGW-TDT-shp53-2;
3: FUGW-TDT-shp53-3;4:FUGW-TDT;
n=3, * 表示 $P < 0.05$ vs. 对照组 FUGW-TDT

Fig. 4 Detection of p53 protein by Western blot

献报道, $p53^{+/-}$, $p53^{-/-}$ 高度肿瘤易感,早期自发成瘤,而以淋巴瘤和肉瘤占主体。 $p53^{mutant/+}$, $p53^{mutant/-}$ 上皮组织来源的瘤比例大幅提高,肿瘤转移率较高^[7,8]。但目前还没有利用 p53 基因沉默来诱发肿瘤的报道,更没有人在非人灵长类上利用 p53 基因沉默来诱发肿瘤的报道。为建立恒河猴 p53 基因沉默诱导的肿瘤模型,首先在细胞水平筛选和测定恒河猴 p53 基因有效沉默靶点。本实验利用 RNA 干扰技术在 COS-7 细胞中实现了 p53 基因沉默。通过设计针

对非人灵长类 p53 基因的干扰序列,构建 FUGW-TDT-shRNA 载体,转染 COS-7 细胞。实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 分析 RNA 干扰的 COS-7 细胞中 p53 mRNA 水平和蛋白表达量均比对照组显著降低。Western Blot 和实时荧光定量 PCR 结果完全吻合,说明这三个 p53 沉默位点都是有效的,均适用于后续的恒河猴胚胎和个体水平上的实验。可以进行病毒包装后在恒河猴胚胎和个体水平继续验证,以期建立非人灵长类动物肿瘤模型。

质粒的转染效率对实验结果影响很大。原本具有沉默效率的靶点可能因为转染效率较低而无法在 mRNA 和蛋白水平显示,呈假阴性。为此可采用药物筛选得到稳定转染细胞系,也可瞬时转染后流式分选转染成功的细胞。本实验采用了流式细胞仪分选红色荧光细胞,从而使三个靶位点在 mRNA 和蛋白水平的沉默效率得以充分显示。

致谢:感谢中国医学科学院医学实验动物研究所的张连峰教授,宋铭晶副教授在实验思路上的指导,感谢张丽芳老师、常慧老师在实验方法上的帮助,感谢同学马元武、修晶辉、鲍丹、陈巍、隋小龙、马婧及北京大学生命科学学院的同学汪霞、贾漠野在具体实验操作或数据分析整理上的帮助。

参考文献:

- [1] Daniels TR, Martínez-Maza O, Penichet ML. Animal models for IgE-mediated cancer immunotherapy [J]. Cancer Immunol Immunother. 2012,61(9):1535-1546.
- [2] Beniashvili DS. An overview of the world literature on spontaneous tumors in nonhuman primates [J]. J Med Primatol, 1989,18:423-437.
- [3] Cianciolo RE, Butler SD, Eggers JS, et al. Spontaneous neoplasia in the baboon [J]. J Med Primatol. 2007,36(2):61-79.
- [4] Anthony W, Chan S. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research [J]. ILAR J, 2013,54(2):211-223.
- [5] Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome [J]. Nat Rev Cancer, 2001,1(3):233-240.
- [6] Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16^{INK4a}-specific siRNA in vitro [J]. Rheumatology, 2004,43:555-568.
- [7] Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome [J]. Cell, 2004,119(6):847-860.
- [8] Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome [J]. Cell, 2004, 119(6):861-872.

[修回日期]2014-06-20