



基于植物 p53 保守序列构建 RNAi 的 DNA 片段方法

高 洁, 李兴林, 张黎明, 肖天剑

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 构建 p53 基因 RNA 干涉 DNA 片段的目的是将其应用于植物悬浮培养中的细胞周期调节. 依据拟南芥 p53 基因与其他高等植物具有高度保守区域的特点, 合成其两个区域的核苷酸片段 (I 和 II) 及其相应的反向片段 (I' 和 II'), 并在 II 和 II' 端部分别引入内含子两个端部核苷酸序列. 在相互连接后进行 PCR 选择扩增, 其产物再与克隆载体连接并经过蓝白斑筛选获得重组 DNA; 在电泳和核苷酸测序鉴定后表明, 最终得到了 I-5'-内含子-II'-II-内含子-3'-I' 序列的重组 DNA 片段. 该片段两端含多克隆位点, 通过插入植物的表达载体进入细胞基因组, 在细胞中其转录产物将形成发夹结构, 经胞内酶切后可以形成短的双链 RNA 片段, 将具有干涉 p53 基因表达的功能.

关键词: 拟南芥; p53 基因; 保守序列; RNAi 片段

中图分类号: Q813.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)03-0019-04

Construction of p53 Conserved Sequence of Plant-Based RNAi Method of DNA Fragments

GAO Jie, LI Xing-lin, ZHANG Li-ming, XIAO Tian-jian

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The purpose which some DNA regions of p53 gene were constructed into RNA interfere segments was applicable to regulation of the cell cycles during the suspension culture of plant cells. According to the highly conservative regions between *Arabidopsis thaliana* p53 gene and genes of other higher plants, two regions of both nucleotide segments (I and II) and the opposite sequence segments (I' and II') of p53 gene were linked together in this research. In addition, two terminal sequences of an intron were added into the terminals of sequence II and II' respectively. The recombination DNA segments of I-5' intron-II'-II-intron 3'-I' were gained by linking of I and II', II and I', screening of PCR, cloning and filtering between blue and white spots, and identifying of the electrophoresis and the nucleotide sequencing of the recombination DNAs in turn. Because of two terminals of the recombination segment contains polyclone sites, it can be transferred into the expressed vehicles and inserted into genomes of some plants easily, and its transcription products will form some hairpin structures in the cells. When the hairpin structures are cut into short double strands RNA segments by endoenzymes in the cells, they can interfere with expression of p53 gene.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; p53 gene; conservative sequences; RNAi segments

珍稀药用植物的细胞悬浮培养为天然药物的工业化生产提供了重要手段^[1]. 但是, 与微生物相比, 植物悬浮培养的细胞增殖周期明显较长, 大大增加了产品的成本^[2-3].

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) p53 基因的表达产

物具有明显抑制细胞分裂的作用^[4-5], 它能够使植物细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期, 脱离分裂状态. p53 的突变体将会使癌细胞不断分裂、增殖^[6], 具有维持细胞分裂的效果. 在 Genbank 中, 植物的 p53 核苷酸序列具有高度保守性, 利用其保守区域设计 RNA 干涉片段

收稿日期: 2009-10-21; 修回日期: 2009-03-04

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (08JCZDTC15300)

作者简介: 高 洁 (1986—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 李兴林, 副教授, lxlszf@tust.edu.cn.

可以对这类基因表达进行抑制。

外源或内源性双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 可触发细胞 III 型 RNA 酶 Dicer 将其切成 19 ~ 23 个核苷酸(nt) 的小片段干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA); 由 siRNA 诱导形成复合物 RISC (RNA-induced silence complex). siRNA 再通过与同源 mRNA 的特异配对, 引导 RISC 特异地降解同源 mRNA, 抑制这类基因的表达^[7-8]。

目前, 利用目的基因体外转录可获得 dsRNA, 以此来转染靶细胞达到干涉的目的^[9], 或者直接利用 21 nt 的 siRNA 引发特异基因的沉默^[10]。但是, siRNA 表达载体的低转染效率是 RNAi 应用中的重要障碍^[11]。在植物中, 可以通过构建双元表达载体的方法达到 RNAi 的目的。这种方法是分别克隆一段 cDNA 及其反向片段, 连接后再导入到植物基因组, 其转录产物就形成了双链 RNA^[12-13]。如果将同一个基因的多个片段导入, 可以获得更为明显的抑制效果^[11], 但需要多次操作, 工作量明显增加。本文依据多区域保守序列设计干涉片段并将其连接, 探索了一次转化植物细胞而达到多区域抑制 p53 基因表达的目的, 并提高 RNAi 的效果。

1 材料与方法

1.1 几种常见植物 p53 序列的保守性分析

登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站, 用 Blast 程序, 搜索 nucleotide blast 数据库(其他参数都为默认值), 查询得出 p53 保守性的同源程度, 结果见表 1。

表 1 拟南芥 p53 全序列与其他物种的保守性分析

Tab.1 Conservative analysis of *Arabidopsis thaliana* p53 gene complete sequence

基因编号	物种	全序列保守性/%	I 片段保守性/%	II 片段保守性/%
AT1G17410	拟南芥	100	100	100
AK106382.1	水稻	68	-	-
AK323940.1	番茄	70	-	-
AC172887.2	芜菁	90	95	91
FN257013.1	海岸松	77	-	-

比较上述几个物种的 p53 核苷酸序列, 找出最为保守的两个区域作为构建片段, 其核苷酸序列见表 2, 其保守性结果见表 1。四种片段由上海生工生物工程有限公司合成。

表 2 p53 高度保守区域的核苷酸序列

Tab.2 Nucleotide sequence of highly conserved region of p53 gene

序列名称	核苷酸序列	备注
I :正向	TCA GGT GTT TAG GTT ATG GAG CAA GTA GTG AAG AGA GAA CAT TGG CTA TGG <u>TTG</u> <u>CAG T</u>	斜体为非 p53 序列(内含子 5'端) 下划线为 CviRI 酶切位点序列
I' :反向	CCA AGA AGC ATA GCC AAT GTT CTC TCT TCA CTA CTT GCT CCA TAA CCT AAA CAC CTGA	斜体为非 p53 序列(内含子 3'端)
II :正向	ATC TCA CCC TCA CAG CAT CAG AGC ATT ATG TGG TAA GAA CTC ACA GAA GAG <u>TTG</u> <u>CAG T</u>	斜体为非 p53 序列(内含子 5'端) 下划线为 CviRI 酶切位点序列
II' :反向	CCA AGA AGT CTT CTG TGA GTT CTT ACC ACA TAA TGC TCT GAT GCT GTG AGG GTG AGAT	斜体为非 p53 序列(内含子 3'端)

1.2 引物设计

以拟南芥 p53 序列中两段特异性较高的序列为模板, 运用 primer 5.0 软件设计引物。其中, 在正向片段的 3'端加上内含子一端的部分序列; 在反向片段的 5'端加上内含子另一端的部分序列。引物序列如下: I 的上游引物或 I' 的下游引物: GTGAATTCAG GTGTTTAGGTTATGG, 下划线为 EcoR I 酶切位点; II 的下游引物或 II' 的上游引物: GCAAGCTTATC TCACCCTCACAGCA, 下划线为 Hind III 酶切位点。

引物合成和 PCR 试剂盒, 上海生工生物工程有限公司。

1.3 二片段连接

1.3.1 连接

将 I 与 II' 进行连接。其 25 μL 反应体系中含 10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μL, 无核酸酶的水 14 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, DNA 正向片段 13 μL, DNA 反向片段 23 μL, 50% 聚乙二醇 (PEG) 4000 2 μL。

将 II 与 I' 进行连接, 反应体系同上。

T4 连接酶和限制性内切酶, Fermentas 公司。

1.3.2 PCR 扩增

通过 PCR 获得图 1 中左边 I-II' 和右边 II-I' 的两两连接片段。



图 1 四片段连接示意图

Fig.1 Diagram of linked four fragments

其25 μL 反应体系中含 2 倍反应复合液 12.5 μL , 重蒸水 8.5 μL , 两片段连接产物 2 μL , 上游引物 1 μL , 下游引物 1 μL .

PCR 扩增条件是: 92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 进行 30 个循环. 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温.

1.4 四片段连接与克隆

1.4.1 酶切

分别对上述两种 PCR 产物进行酶切(图 1 中部). 分别取两种 PCR 产物各 5 μL , 加 10 倍缓冲液 2 μL , 限制性内切酶 Hind III 0.5 μL , 重蒸水 12.5 μL , 总体积为 20 μL . 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴, 酶切 2 h, 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.4.2 连接

将上述两种酶切产物混合连接; 连接的目标如图 1 所示. 连接体系与条件同两片段连接一致.

1.4.3 再酶切后与克隆载体连接

对四片段连接产物和克隆载体 PUC19 分别进行酶切, 酶切体系与两片段一致. 只是将限制性内切酶换成 EcoR I. 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴, 酶切 2 h.

连接反应依然是 25 μL 反应体系, 含 10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μL , 无核酸酶的水 5.5 μL , T4 DNA 连接酶 0.5 μL , 四片段酶切产物 5 μL , PUC19 酶切产物 5 μL , 50% PEG 4000 2 μL . 22 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h.

1.4.4 克隆

(1) 制备感受态细胞

从 LB 平板上挑取新活化的大肠杆菌 DH5 α 单菌落, 接种于 3~5 mL 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 12 h, 直至对数生长期, 将该菌悬液以 1:100~1:50 的比例接种于 100 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2~3 h 至 A_{600} 为 0.5 左右.

将培养液转入离心管中, 冰上放置 10 min, 然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 000 r/min 离心 10 min. 弃去上清液, 用预冷的 0.05 mol/L 的 CaCl_2 溶液 10 mL 轻轻悬浮细胞, 冰上放置 15~30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min. 弃去上清液, 加入 4 mL 预冷含 15% 甘油的 0.05 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 轻轻悬浮细胞, 冰上放置几分钟, 即成感受态细胞悬液. 感受态细胞分装成 200 μL 的小份, 贮存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中.

(2) 转化

从 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取 200 μL 感受态细胞悬液, 室温下使其解冻, 解冻后立即置冰上. 加入重组质粒 DNA 溶液(质量不超过 50 ng, 体积不超过 10 μL), 轻轻摇匀, 冰上放置 30 min. 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

5 min, 热击后迅速置于冰上冷却 3~5 min. 向管中加入 1 mL LB 液体培养基(不含氨苄青霉素), 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h, 使细菌恢复正常生长状态, 并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp^r).

将上述菌液摇匀后取 100 μL 涂布于含 Amp 的筛选平板上(含有 IPTG 和 X-gal), 正面向上放置 0.5 h, 待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~24 h.

(3) 筛选白斑

将长出的白斑挑至含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 用质粒 DNA 小量快速提取试剂盒(北京普博欣生物科技有限责任公司)提取质粒; 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.5 琼脂糖凝胶电泳

取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳. 电泳条件为 1.5%~2.5% 琼脂糖凝胶, 采用 TAE 缓冲液, 恒压, 10 V/cm, 电泳 40 min.

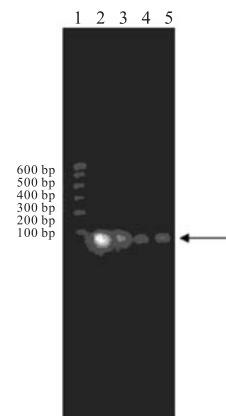
1.6 克隆片段的测序

将电泳结果符合预设大小的重组质粒送上海生物工程技术有限公司测序.

2 结果

2.1 两片段连接

通过使用 T4 连接酶, 将合成的片段 I 与 II' 相连接、II 与 I' 相连接, 连接产物分别进行 PCR 扩增. 连接和 PCR 扩增的产物分别进行电泳, 结果如图 2 所示.



1. 分子 Marker; 2. I-II' 的 PCR 产物; 3. II-I' 的 PCR 产物;
4. 片段 I 和片段 II' 的连接产物; 5. 片段 II 和片段 I' 的连接产物

图 2 两片段连接和 PCR 电泳图

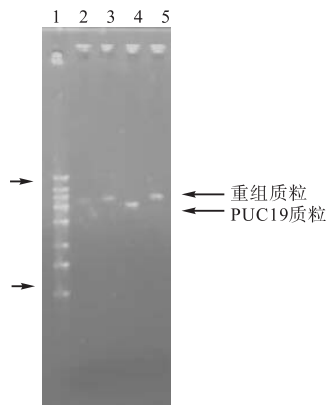
Fig.2 Electrophoregram of linked two fragments and PCR

从图中箭头位置的 DNA 分子大小在 100 bp 左右, 其中连接结果为多种两两连接的产物; 而 PCR 的结果只能分别是 I-II' (第 2 泳道) 和 II-I' (第 3 泳

道),符合设计要求。

2.2 四片段连接与克隆

取上述 PCR 产物 I-Ⅱ'和Ⅱ-I'混合后用限制性内切酶 HindⅢ酶切,再用 T4 连接酶连接;连接产物和 PUC19 再用限制性内切酶 EcoR I 酶切、T4 连接酶连接;转化大肠杆菌感受态细胞;在选择培养基中筛选白斑;摇菌提取质粒;电泳鉴定。结果如图 3 所示。图 3 表明,2、3、5 泳道是连接后重组质粒。



1. 分子 Marker; 2、3、5. 白斑质粒(重组质粒); 4. PUC19 质粒

图 3 四片段与 PUC19 连接电泳图

Fig.3 Electrophoregram of linked four fragments and PUC19

对其中的一个质粒用 HindⅢ酶切作进一步的鉴定,结果如图 4 所示。由于 I-Ⅱ'和Ⅱ-I'是通过 HindⅢ酶切后的黏性末端连接,其产物未连接的两端又同 PUC19 经另一内切酶酶切连接(如图 1 所示),所以由图 4 判定该质粒是四片段重组质粒。



1. 重组质粒; 2. 酶切重组质粒

图 4 重组质粒酶切图

Fig.4 Enzyme cutting map of recombination plasmid

2.3 克隆的四片段测序

对上述重组质粒进行测序,其核苷酸序列同设计的 I-5'-内含子-Ⅱ'-Ⅱ-内含子-3'-I'完全一致。由此表明,利用上述 DNA 重组方法可以获得干涉 p53 基因翻译的 DNA 片段。

3 讨论

构建植物 RNAi 的 DNA 片段的主要方法是将目的基因的某个片段与其反向片段连接而成^[14-15];为了提高干涉效果,在其目的基因中引入另外一个序列作为第二个干涉片段^[16],这样就增加了构建载体的工作量和植物细胞的转化与筛选的难度。

本文将两段保守 DNA 及其各自反向的片段分别进行连接,并分别在 I-Ⅱ'和Ⅱ-I'片段中间引入了内含子序列,构建一种 I-5'-内含子-Ⅱ'-Ⅱ-内含子-3'-I'的 DNA 序列,并将连接在 PUC19 上进行大量扩增;经过酶切后,该 DNA 片段再连接到植物表达载体 pCambia 2300 或 pCambia 1300 质粒上;通过农杆菌介导转化的方法,侵染植物细胞,使其插入到植物基因组。插入到植物基因组的该 DNA 片段,无论是哪条链为转录模板,其产物 mRNA 也无论是链内还是链间,均可形成双链 RNA;又因该双链 RNA 含有真核细胞所能识别的内含子序列,所以它们在未配对区形成的突环能被胞内相关酶所切除^[17-18],继而形成小的 siRNA,能有效干涉 p53 基因的翻译。这种方法减少了转化等操作环节,也将显著地提高 RNAi 的效果。进一步的验证正在甘草细胞中进行。

参考文献:

- [1] 谢静. 生物技术与药用植物次生代谢产物[J]. 西南军医,2007,9(3):89-90.
- [2] 方文娟,韩烈保,曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因素研究[J]. 生物技术通报,2005(5):11-15.
- [3] 崔堂兵,郭勇,林炜铁. 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法[J]. 植物生理学通讯,2001,37(5):479-481.
- [4] Oren M. p53:the ultimate tumor suppressor gene?[J]. The FASEB Journal,1992,6(13):3169-3176.
- [5] YIN Yu-xin,Tainsky M A,Bischoff F Z,et al. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles[J]. Cell,1992,70(6):937-948.
- [6] 邓成国,杨虹,陕声国,等. Cyclin G1 与 p53 基因在血管瘤组织中的表达及关系[J]. 中国现代医学杂志,2008,18(18):2665-2669.
- [7] Bernstein E,Caudy A A,Hammond S M,et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature,2001,409(6818):363-366.

(下转第 26 页)