

狨猴 *B2m* 基因沉默位点在细胞水平的验证

邓怡晨¹, 张晨², 向志光¹, 滕永康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, 生物膜及膜生物工程国家重点实验室, 北京大学麦戈文脑研究所, 北京 100871)

【摘要】 目的 在细胞水平筛选狨猴 *B2m* 基因的有效沉默靶点, 并进行验证。方法 查询人源 *B2m* 验证过的有效 siRNA 靶位点序列, 与狨猴 *B2m* 基因序列进行同源性比较, 选择匹配靶点合成 shRNA 序列。将体外合成的 2 条干扰序列分别与慢病毒载体 FUGW-TDT 连接, 构建 FUGW-TDT-shb2m 干扰表达质粒, 在聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 介导下转染 293T 细胞, 转染后 48h, 用实时荧光定量法检测转染细胞中 *B2m* 基因 mRNA 的水平。结果 筛选出 2 个与狨猴完全同源的 *B2m* 沉默靶位点, 分别位于 *B2m* mRNA 的 290 ~ 310 bp, 665 ~ 685 bp; *B2m* 两个靶点在转录水平的沉默效率分别为 $(46.54 \pm 7.91)\%$ ($P < 0.05$) 和 $(83.22 \pm 4.37)\%$ ($P < 0.0001$), 差异有显著性。结论 成功构建 FUGW-TDT-shb2m 重组质粒; 在细胞水平筛选得到 2 个有效的 *B2m* 基因沉默靶点; 为后续有关介导狨猴 *B2m* 基因沉默的研究奠定了基础。

【关键词】 基因沉默; 狨猴; β 2-微球蛋白; 短发夹 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.010

Validation of the silencing site of marmoset *B2m* gene at the cellular level

DENG Yi-chen¹, ZHANG Chen², XIANG Zhi-guang¹, TENG Yong-kang¹, LIU Yun-bo^{1*}

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

2. State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences; PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, Peking University, Beijing 100871)

【Abstract】 **Objective** To screen and determine the effective silencing targets of β 2- microglobulin (*B2m*) gene at the cellular level in marmoset. **Methods** By homology comparison of the *b2m* gene in human and the *B2m* gene in marmoset, choose homology small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting marmoset *B2m* gene were designed, We choose homology small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting designed *B2m* gene to make homology analysis, and insert into lentivirus-based gene silencing constructs FUGW-TDT. The vectors were transfected into HEK293T cells induced by polyethylenimine (PEI). The suppression of *B2m* mRNA was detected by real-time PCR. **Results** Two gene-silencing sequences were screened that lied in 290 ~ 310 bp and 665 ~ 685 bp of the marmoset *B2m* mRNA, and have statistical significance in the silencing rate: $(46.54 \pm 7.91)\%$ ($P < 0.05$) and $(83.22 \pm 4.37)\%$ ($P < 0.0001$). **Conclusions** Two effective silencing target sequences are screened at cellular level, which can be further used in studies on gene silencing in marmoset.

【Key words】 Gene silence; Marmoset; *B2m*; shRNA

【基金项目】 国家科技支撑计划 (2014BAI03B01)。

【作者简介】 邓怡晨 (1991 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物学。E-mail: yichendeng007@126.com

【通讯作者】 刘云波, 教授, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: yunbolu@126.com

β 2-微球蛋白(β 2-microglobulin, B2M)是一种内源性低分子量血清蛋白质,广泛存在于血浆、尿液、脑脊液、唾液以及初乳中。它是人细胞表面主要组织相容性复合体 I 类分子(major histocompatibility complex class I molecule, MHC I)的 β 链,由 99 个氨基酸组成,无多态性且高度保守,是 CD8 分子的结合区域^[1]。

已有研究表明 *B2m* 基因缺陷小鼠在胸腺和外周淋巴器官几乎缺乏所有成熟的 $CD4^+8^+$ T 细胞,导致免疫功能缺陷^[2]。目前免疫缺陷疾病动物模型的研究主要是使用大鼠和小鼠作为动物平台,而非人灵长类动物模型在生物医学研究中的应用较少。与啮齿类动物相比较,非人灵长类动物与人类亲缘关系和生理生化指标更加接近,因此,研究建立非人灵长类动物模型对于相关疾病的研究有重要意义^[3]。

狨猴作为一种较小的新大陆猴,与实验室内其他常用的灵长类实验动物,如狒狒、猕猴相比较,由于其体型较小(成年体重 300 ~ 500 g)、易在实验室内笼养、便于实验操作、具有较高的繁殖率、对人类细胞因子或激素具有交叉反应性、具有独特的行为和认知特性,其在生物医药科学和神经科学方面引起广泛关注^[4, 5]。本文从细胞水平筛选及验证狨猴 *B2m* 基因的沉默靶位点,为进一步探究 *B2m* 基因在狨猴体内的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

293T 细胞来至 ATCC 细胞库; *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自北京全式金公司;细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶为 Invitrogen-Gibco 公司产品;无内毒素质粒小提试剂盒购自康为世纪公司;逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;shRNA 合成由 Invitrogen 公司提供;引物合成由北京擎科新业生物技术有限公司提供;Trizol 试剂由 Invitrogen 公司提供;Xho I 和 Xba I 购自 New England Biolabs 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 序列设计

从 broad institute 网站中(<http://www.broadinstitute.org/ma/ma/public/>)查询人源 *B2m* 基因有效 siRNA 靶位点序列,通过与狨猴 *B2m* 基因序列进行同源比对,选择完全匹配的两条 siRNA 序列,设计 shRNA 序列^[6, 7],由 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 B2m-RNA 干扰慢病毒载体的构建和鉴定

慢病毒载体 FUGW-TDT 含有 Ubi 启动子(Ubiquitin promoter)调控的红色荧光蛋白(tandem dimer tomato, TDT)报告基因,可与 U6 启动子调控的 RNA 干扰片段共表达^[8]。FUGW-TDT 载体经 Xho I 和 Xba I 双酶切线性化后回收,将两条 shRNA 分别连入载体 FUGW-TDT 的 U6 启动子下游,即构建重组质粒^[9]。连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,涂布于 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,挑取单菌落,接种至含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养不超过 16 h,进行菌液鉴定(菌液 PCR 及测序引物均为 F: 5'-AGGAAGATGGCTGTGAGG-3'; R: 5'-GCCTTGATATCGTATAAGC-3')。选择阳性克隆菌液进行质粒抽提,经过质粒测序(北大仪器中心),将成功插入目的片段的质粒命名为 FUGW-TDT-shb2m。本实验的阴性对照为未导入 shRNA 的 FUGW-TDT 空质粒。

1.2.3 细胞培养及转染

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 6 孔板中培养 293T 细胞,每孔加入 5×10^5 个细胞,置 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 常规培养。24 h 内细胞密度达 70%~80% 时进行转染。在转染试剂聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)的介导下,按 PEI: 质粒 = 3: 1 的比例配制转染混合物,将重组质粒和空载质粒转进细胞^[10]。实验设为重组质粒组和空载质粒组,其中,重组质粒组包括 FUGW-TDT-shb2m-1 和 FUGW-TDT-shb2m-2 两个,空载质粒组为阴性对照,每个质粒做 3 个复孔。48 h 后观察荧光并进行流式分选,收集带有红色荧光的细胞。

1.2.4 RT-PCR 法检测 *B2m* 基因 mRNA 表达水平

采用实时荧光定量 PCR 法分析各组转染细胞中 *B2m* 基因 mRNA 的表达情况^[11]。按照 Invitrogen Trizol Reagent 说明书分别提取每组细胞总 RNA,然后进行逆转录反应,逆转录条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s,得到的 cDNA 用于进行实时荧光定量 PCR 反应。*B2m* 基因引物为:上游 5'-GGCTATCCAGC GTACTCCAAA-3' 下游 5'-CACGGCAGGCATACTC ATCTT -3',扩增长度为 248 bp。内参 GAPDH 的引物为:上游 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA -3', 下游 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA -3',扩增长度为 121 bp。两条引物均由 primer5 软件设计得来。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 狨猴 *B2m* 基因 shDNA 寡核苷酸序列

根据狨猴 *B2m* 基因序列,依照 shRNA 的设计原则和 broad institute 网站中的人源 *B2m* 基因有效 siRNA 靶位点序列,与狨猴 *B2m* 基因序列进行同源性比较,选择完全匹配的两个靶点(图 1)合成

shRNA 序列,共两条核苷酸序列见表 1。

2.2 B2M 慢病毒沉默载体构建

在靶点序列的正反向组合中间添加一个 loop 环结构(序列为 CTCAAGAGA)以便形成 shRNA 发夹结构。另外在正义链模板的 5' 端添加 tcga,可与 XhoI 酶切后的粘性末端互补,在反义链模板的 5' 端添加 ctag,可与 XbaI 酶切后的粘性末端互补,使其能与空的干扰质粒连接,由此合成靶序列的 oligoDNA(图 2A)。之后将 oligoDNA 连接在 U6 启动子的下游,成功构建 FUGW-TDT-b2m 的 shRNA 载体(图 2B)。

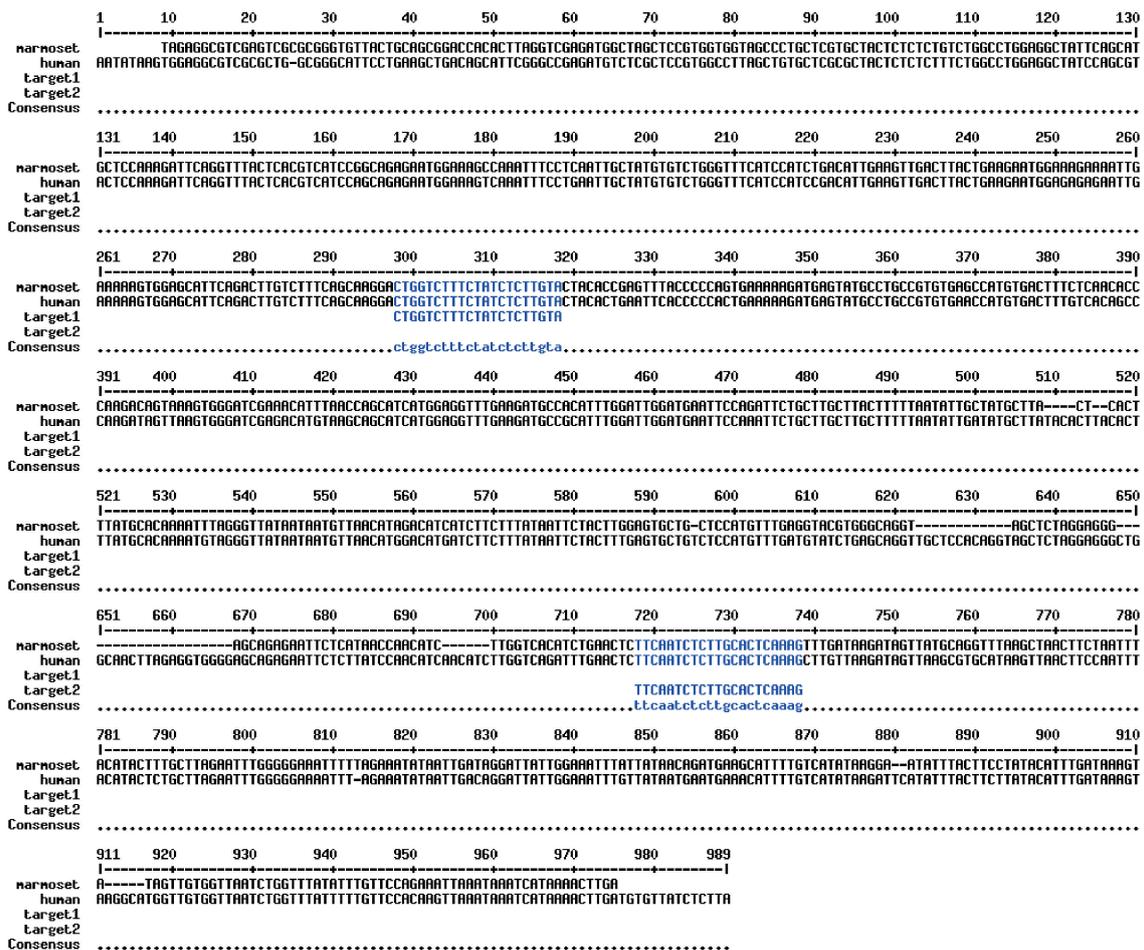


图 1 狨猴 *B2m* 基因序列同源性比对分析

Fig. 1 Homology analysis of marmoset *B2m* gene sequence

表 1 *B2m* 基因的 shRNA 寡核苷酸序列

Tab. 1 Oligonucleotide sequences of *B2m* gene shDNA

序列名称 Name	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')
FUGW-TDT-shb2m-1	Sense: tcgaccCTGGTCTTTCTATCTCTTGTGA CTCAAGAGA TACAAGAGATAGAAAGACCAG TTTTTTggaaat Antisense: ctgatttcc AAA AAA CTGGTCTTTCTATCTCTTGTGA TCT CTT GAG TACAAGAGATAGAAAGACCAG gg
FUGW-TDT-shb2m-2	Sense: tcgaccTTCAATCTCTTGCACTCAAAG CTCAAGAGA CTTTGAGTGAAGAGATTGAA TTTTTTggaaat Antisense: ctgatttcc AAA AAA TTCAATCTCTTGCACTCAAAG TCT CTT GAG CTTTGACTGCAAGAGATTGAA gg

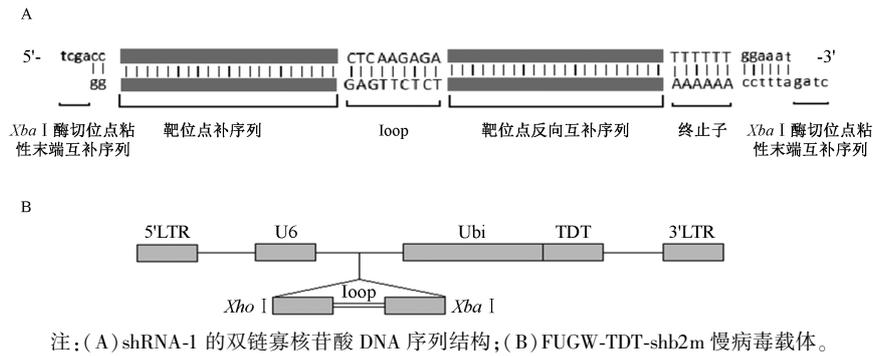


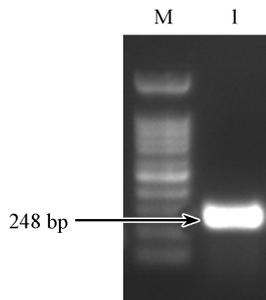
图 2 结构示意图

Note. (A) Double-stranded DNA oligonucleotide sequence structure of shRNA-1; (B) FUGW-TDT-shb2m lentiviral vector.

Fig. 2 The frame of FUGW-TDT-shRNA

2.3 293T 细胞中 *B2M* 丰度的检测

选取 293T 细胞提取总 RNA 后逆转录为 cDNA, 经普通 PCR, 电泳检测细胞中 *B2m* 基因的丰度(图 3)。结果显示 293T 细胞中 *B2m* 基因的表达, 说明能够选用 293T 细胞于基因抑制效率检测。



注: (M) Marker; (1) 293T。

图 3 *B2m* 含量检测

Note. (M) Marker; (1) 293T.

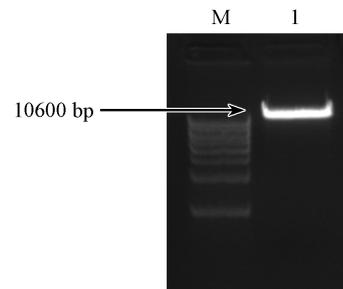
Fig. 3 Detection of *B2m* abundance

2.4 慢病毒表达载体 FUGW-TDT 的 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切结果

将慢病毒表达载体 FUGW-TDT 经 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切后, 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果(如图 4)表明: 酶切片段大小 10600 bp 左右, 与预期相符合。然后将其酶切产物采用胶纯化回收试剂盒回收目的片段, 用于后续的连接反应。

2.5 菌液 PCR 鉴定阳性克隆

B2m 基因 shRNA 的寡核苷酸序列, 经退火形成双链 DNA, 与经 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切后的 FUGW-TDT 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 每个平板挑取 3 个重组阳性克隆, 进行菌液 PCR 鉴定阳性克隆。重组细菌克隆的 PCR 产物 351 bp(插入片段为 61 bp), 而经双酶切后没有插入片段的 FUGW-TDT 空载体 PCR 产物为 290 bp。作为对照(图 5), 鉴定结果与预期相符。证明 *B2m* 基因的 shRNA 已经定向连入慢病毒表达载体中。

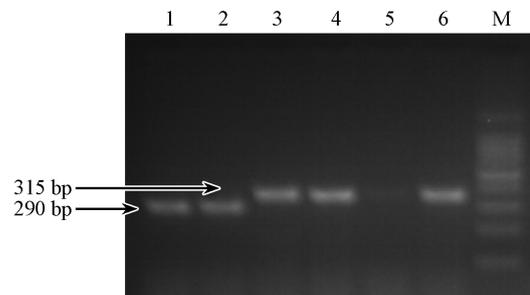


注: (M) DNAMarker; (1) 经 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切线性化后的质粒载体。

图 4 FUGW-TDT 载体的双酶切电泳结果

Note. (M) DNA Marker; (1) Linearized plasmid *XhoI* and *XbaI* double digestion.

Fig. 4 Electrophoresis for production of FUGW-TDT vector by double digestion



注: (M) DNAMarker; (1~3) FUGW-TDT-shb2m-1; (4~6) FUGW-TDT-shb2m-2。

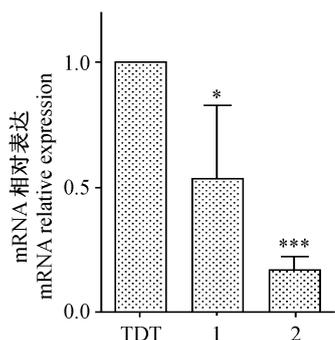
图 5 FUGW-TDT-shb2m 载体菌液 PCR 鉴定结果

Note. (M) DNA Marker; (1~3) FUGW-TDT-shb2m-1; (4~6) FUGW-TDT-shb2m-2.

Fig. 5 Results of PCR FUGW-TDT-shb2m identification

2.6 RT-PCR 检测 293T 细胞 *B2m* 基因的表达

RT-PCR 检测结果显示, 实验组中 2 个插入 shRNA 序列的重组质粒对应的 *B2m* 基因 mRNA 表达量都明显低于对照组, 其中, FUGW-TDT-shb2m-1 组与对照组相比, 其沉默效率为 $(46.54 \pm 7.91)\%$ ($P < 0.05$), FUGW-TDT-shb2m-2 组与对照组相比, 其沉默效率为 $(83.22 \pm 4.37)\%$ ($P < 0.0001$), 实验批数 $n = 3$, 差异有显著性(图 6)。



注: (TDT) 对照组 FUGW-TDT; (1) FUGW-TDT-B2m-1; (2) FUGW-TDT-b2m-2; 与对照组 FUGW-TDT 相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$ 。

图 6 SYBR-Green 法 Real-time PCR 检测 *B2m* 基因 mRNA 的表达 ($n = 3$)

Note. (TDT) Control group FUGW-TDT; (1) FUGW-TDT-b2m-1; (2) FUGW-TDT-B2m-2; Compared with control group FUGW-TDT, * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

Fig. 6 Detection of *B2m* mRNA by SYBR-Green Real-time PCR

3 讨论

很多种类的免疫缺陷动物模型已经建立起来,在免疫学、遗传学、肿瘤学、自身免疫性疾病、微生物学等诸多方面发挥重要作用^[12]。实验室常用的免疫缺陷动物包括裸小鼠、SCID 小鼠等,但相对于啮齿类动物,非人灵长类动物在遗传、进化、生理等方面与人类高度相似,被认为是最理想的疾病治疗和预防药物研究的模型,并已广泛应用于评估抗病药物和疫苗的安全及药代工作^[13, 14]。

狨猴现在已经成为重要的研制人类疾病模型的动物,在基因修饰动物研究方面有很多优势条件,比如相对成熟的辅助生殖技术和与人类进化的亲缘性。近年来,狨猴在神经科学方面及帕金森、肝炎等疾病动物模型方面具有重要地位^[15]。但是,狨猴疾病模型无法替代旧大陆猴在构建 HIV、结核病等人类疾病模型的独特优势,所以应根据课题的需求和具备的条件,采用相应的动物品种^[16]。

B2m 是通过非共价键与 MHC I 类分子的 α 链细胞外段相互作用,不参与 MHC I 类分子同抗原多肽的结合,但对维持 MHC I 类分子天然构型的稳定性及其表达起关键作用。有文献报道 *B2m* 基因缺陷小鼠表现为免疫缺陷,且 *B2m* 基因缺陷小鼠在无病原体环境下培养,可正常发育及繁殖^[17],为探究狨猴 *B2m* 基因沉默后是否有免疫降低甚至缺陷的现象,首先从细胞水平上筛选沉默效率高的 *B2m* 基因靶点。本文中,将筛选的 *B2m* 基因沉默靶点插入带红色荧光的慢病毒质粒 (FUGW-TDT) 后转染 HEK293T 细胞,通过 real-time PCR 方法分析,结果表明在 RNA 干扰作用下,转染的细胞中 *B2m* 基因

在转录水平比对照组显著降低,说明 RNA 干扰靶点有效,可以经过病毒包装后进行狨猴胚胎和个体水平上验证实验,为构建狨猴免疫缺陷模型奠定基础。

参考文献:

- [1] Chiou SJ, Chen CH. Decipher beta2-microglobulin: gain- or loss-of-function (a mini-review) [J]. Med Sci Monit Basic Res, 2013, 19: 271-273.
- [2] Koller BH, Marrack P, Kappler JW, et al. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8 + T cells. 1990 [J]. J Immunol, 2010, 184(9): 4592-4595.
- [3] Van Rompay KK. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection [J]. Antiviral Res, 2010, 85(1): 159-175.
- [4] Sasaki E. Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset [J]. Neurosci Res, 2015, 93: 110-115.
- [5] Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology [J]. Dev Growth Differ, 2014, 56(1): 53-62.
- [6] Grinev VV. [Design and quality control of short interfering RNAs] [J]. Mol Biol (Mosk), 2012, 46(6): 827-845.
- [7] Zhao H, Zhang JY, Xu WH, et al. [Construction and identification of lentiviral vector for RNA interference targeting STUB1 gene] [J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 39(6): 623-627.
- [8] Cheng L, Shu R, Song ZC, et al. [Reconstruction and expression of recombinant lentiviral vector for human amelogenin in 293T cell line] [J]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2008, 17(1): 45-50.
- [9] 苏静芬, 张晨, 刘云波, 等. 恒河猴 p53 基因沉默靶点在细胞水平的验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(8): 7-10.
- [10] Longo PA, Kavran JM, Kim MS, et al. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI) [J]. Methods Enzymol, 2013, 529: 227-240.
- [11] Alfonso J, Pollevick GD, Castensson A, et al. Analysis of gene expression in the rat hippocampus using Real Time PCR reveals high inter-individual variation in mRNA expression levels [J]. J Neurosci Res, 2002, 67(2): 225-234.
- [12] Mosier DE. Small animal models for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) research [J]. Lab Anim Sci, 1996, 46(3): 257-265.
- [13] Schiel N, Souto A. The common marmoset: An overview of its natural history, ecology and behavior [J]. Dev Neurobiol, 2017, 77(3): 244-262.
- [14] Watakabe A, Sadakane O, Hata K, et al. Application of viral vectors to the study of neural connectivities and neural circuits in the marmoset brain [J]. Dev Neurobiol, 2017, 77(3): 354-372.
- [15] Hashikawa T, Nakatomi R, Iriki A. Current models of the marmoset brain [J]. Neurosci Res, 2015, 93: 116-127.
- [16] Chan AW. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research [J]. ILAR J, 2013, 54(2): 211-223.
- [17] Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Implication of the beta2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes [J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(9): 1359-1371.

[收稿日期] 2016-12-30