

利用明星基因 *TP53* 设计分子生物学开放实验的构思

吴燕华, 乔守怡^(✉)

复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

摘要: 为适应迅猛发展的分子生物学技术及理论, 高校的分子生物学实验课程应与时俱进, 不断进行改革和提高。笔者结合自身科研背景及教学经验, 以明星基因 *TP53* 为研究对象, 设计了一项分子生物学开放实验。一方面紧密联系流行的学术前沿, 糅合新颖的分子生物学实验技术, 另一方面以开放实验为载体指引学生思考和解决科学问题。这一改革构思旨在提高分子生物学实验教学质量的同时, 为培养真正的生物科学研究型人才创造条件。

关键词: 分子生物学, 实验教学, 教学改革, 人才培养

A Design Concept of Experimental Molecular Biology by Utilizing Superstar *TP53*

WU Yan-hua, QIAO Shou-yi^(✉)

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

1 前言

分子生物学从生物大分子的层次研究生命活动规律, 是生物科学最重要的分支学科之一。随着分子生物学向其他生物分支学科的渗透, 分子生物学正在从根本上改变生物世界的研究角度与方法。因此, 在高等院校生物科学及相关专业的教学计划中, 分子生物学和分子生物学实验均被设定为专业必修课程。分子生物学又是一门实验性学科, 因此, 高质量的实验教学在培养研究型人才中具有更加重要的作用。

但笔者在日常教学实践中发现, 分子生物学实验的传统课程内容已经越来越不能满足学生们日益增长

的学习、科研需求。一方面, 经过数十年的发展, 分子生物学的核心已经从简单的 DNA 体外扩增技术发展为从分子水平阐述生命活动的规律, 重点研究 DNA 与 DNA、DNA 与 RNA、DNA 与蛋白质的相互作用关系。另一方面, 现有的分子生物学实验仍然以重组质粒的构建为核心, 以掌握基本的克隆技术为培养目标。换言之, 现行的分子生物学实验教程显然落后于当下的分子生物学知识与技术的发展。因此, 与时俱进, 紧跟科学发展的方向, 改进实验教学内容与教学方式, 使学生能从课堂中体会科学研究的方法方式, 接触新颖多样的分子生物学新技术, 已经成为当前高校分子生物学教学改革的当务之急^[1]。

笔者在探索分子生物学实验课程的改革过程中, 结合自身的研究背景, 选择 *TP53* 基因作为分子生物学实验的研究对象, 综合多种分子实验技术方法搭建实验流程, 围绕 *TP53* 突变体的性质分析设计开放课题。这一新颖的实验体系既能向学生传授更多新颖实用的分子生物学实验技能, 又能在在此基础上锻炼学生的科

收稿日期: 2014-05-20; 修回日期: 2014-06-25

基金项目: 国家基础科学人才培养基金: 复旦大学生物学人才培养基地 (J1103707); 复旦大学基地人才培养支撑条件建设项目 (J1210012)

通讯作者: 乔守怡, E-mail: syqiao@fudan.edu.cn

学思维与研究能力。

2 实验构思与内容编排

2.1 项目选题依据

肿瘤转移抑制基因 *TP53* 是肿瘤分子遗传学研究领域的明星分子。自 1979 年首次报道 *TP53* 基因与肿瘤存在联系以来，围绕 *TP53* 的研究工作已经有 30 余年，但时至今日，围绕 *TP53* 的研究报道仍不断发表在国际知名期刊上，*TP53* 在肿瘤发生发展中的重要性可见一斑。

TP53 基因全长约 20 kb，定位于人类染色体 17p13.1，由 11 个外显子组成，编码 393 个氨基酸组成的核蛋白 p53。p53 蛋白含有转录激活功能域、DNA 结合功能域以及寡聚化功能域，在不同压力刺激条件下，p53 蛋白可以转录调节不同的靶基因，从而参与细胞周期阻滞、细胞凋亡、衰老、DNA 修复、血管新生、细胞侵袭和转移等^[2]。临床上超过 50% 的肿瘤携带 *TP53* 基因突变，突变的形式包括点突变、缺失突变、插入突变、移码突变、基因重排等^[3]。由于 *TP53* 基因突变导致编码蛋白 p53 发生性质改变，p53 与其他蛋白质的

结合活性以及 p53 的转录调控活性均会发生变化，影响细胞周期、凋亡、衰老、DNA 修复等，最终改变肿瘤发生发展的进程。但是，越来越多的研究证明，不同位点的 *TP53* 突变对肿瘤的影响可能完全不同，不同的 p53 突变体蛋白可以以完全不同的机制影响转录调控及靶基因的表达。一些 *TP53* 突变并非单纯的失活突变，而是表现出了癌基因功能，在一定程度上促进了肿瘤的发生，侵袭和转移^[4]。因此，对不同 *TP53* 突变基因的性质和活性分析具有重要的科学研究意义，既能更全面地了解 *TP53* 在肿瘤中的作用机制，又能为临床上靶向治疗携带 *TP53* 突变体的患者提供重要的参考信息。

2.2 项目内容与流程

如图 1 所示，实验的主要思路是由学生自行选择一个 *TP53* 突变基因进行操作和研究，包括利用分子生物学实验课堂的技术平台构建突变体基因，原核表达和纯化相应的突变蛋白，并进一步利用实验方法检测突变体蛋白与蛋白质、DNA 的结合能力的变化，最终获得该 *TP53* 突变基因的性质信息。

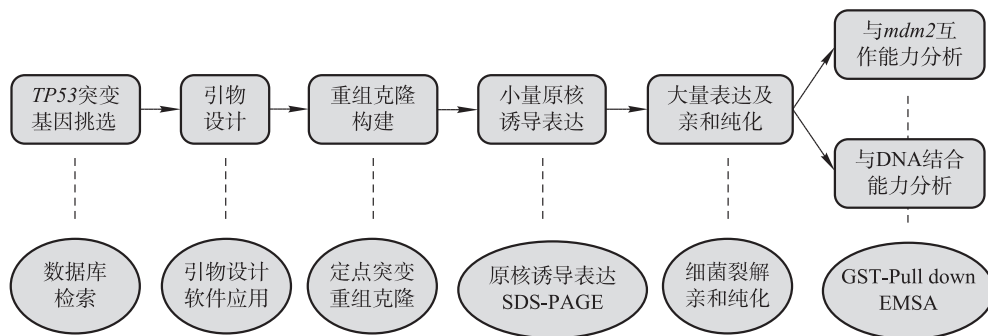


图 1 实验流程图与技术方法

矩形框所注的是实验内容，椭圆形框所注的是相关技术方法

2.2.1 *TP53* 突变基因挑选

利用在线 *TP53* 突变数据库 (<http://p53.iarc.fr/>) 进行 *TP53* 基因突变体的检索，该数据库中收录了目前已报道的几乎全部 *TP53* 突变类型，包括突变位点，突变方式，突变频率，氨基酸变化以及蛋白质性质及功能变化等详细信息，其中还有相当一部分 *TP53* 仅有突变报道，而无功能研究的报道。查阅信息后，同学们可自行挑选没有功能研究报道的 *TP53* 点突变体进行分子生物学实验操作。

2.2.2 *TP53* 突变体的构建

以携带野生型 *TP53* 基因的 pET32a-p53 原核动物

表达质粒为模板，利用定点突变试剂盒进行 *TP53* 点突变体 (*TP53m*) 克隆的快速构建。首先指导学生设计扩增 p53m 的正反向引物，要求包括突变位点处在引物中间位置，两侧是 10 ~ 15 bp 的野生序列，总长 25 ~ 45 bp， T_m 值 ≥ 78 °C (T_m 计算公式是 $81.5 + 0.41 \times (\text{GC 百分含量}) - 675 / \text{碱基数} - \text{突变碱基的百分含量}$)，引物中 GC 百分含量大于 40%，3' 端以 G/C 终止。然后进行 PCR 反应，利用高温打开模板链，选择合适退火温度使突变引物与模板结合，利用高保真的 DNA 聚合酶围绕 pET32a-*TP53* 质粒模板进行“循环延伸”，如此进行 12 ~ 18 个循环，得到野生型质粒模

板，延伸产物退火配对形成的带缺口的开环质粒突变双链。最后利用 *Dpn* I 酶特异性消化被甲基化修饰的质粒模板，得到纯的突变质粒。

2.2.3 *TP53* 突变体重组质粒的构建

将经过 *Dpn*I 酶特异性消化的定点突变 PCR 产物转化大肠杆菌感受态细胞，涂布到氨苄抗性的 LB 固体培养基上，37 °C 培养过夜。次日利用菌落 PCR 或酶切技术筛选阳性转化子，并将阳性转化子进行测序，确定是否成功构建了携带特定 *TP53m* 的 pET32a 重组质粒。

2.2.4 His - p53 融合蛋白的小量诱导表达

将测序正确的重组 pET32a - *TP53m* 及野生型 pET32a - *TP53* 质粒分别转化大肠杆菌 BL21 - Codon-Plus (DE3) - RIL 感受态菌株，次日挑取多个单菌落，分别接种于 5 mL 含有氨苄和氯霉素抗生素的 LB 液体培养基中，做好标记。37 °C，250 r/min 振荡培养过夜。次日以 1:20 转接到 5 mL 新鲜的 LB 液体培养基中，37 °C 250 r/min 培养至 $A_{600} > 0.6$ 后加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，继续培养 3 h。离心收集菌体，加入蛋白样品缓冲液进行裂解，沸水浴变性处理后进行 SDS - PAGE 电泳检测，Coomassie Blue 染色后依据诱导表达蛋白条带的强弱挑选高表达的菌株。将该高表达克隆重新接种到新鲜的 LB 液体培养基中，37 °C，250 r/min 振荡培养过夜。次日以 1:20 转接到新鲜的 LB 液体培养基中，37 °C 250 r/min 培养至 $A_{600} > 0.6$ 后加入 IPTG，分别培养 4，6，8，12 h 后收集菌体，SDS - PAGE 分析蛋白诱导表达水平，确定最佳诱导表达时间。

2.2.5 His - p53 突变体融合蛋白的大量诱导表达及纯化

根据小量诱导表达的结果选择诱导表达水平较高的菌株，接种到 5 mL 含有氨苄和氯霉素抗生素的 LB 液体培养基中。37 °C 250 r/min 振荡培养过夜。次日以 1:20 转接入 100 mL 新鲜的 LB 液体培养基中，37 °C 250 r/min 振荡培养至 $A_{600} > 0.6$ 。向培养基中加入 500 mmol/L IPTG 进行诱导表达，根据小量诱导表达的最优时间进行振荡培养。培养结束后，将菌液移入合适的离心管中，4 °C，5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，收集所有菌体沉淀。

将含有菌体沉淀的离心管置于冰上，每 100 mL 细菌培养物加入 4 mL 裂解缓冲液（50 mmol/L NaH_2PO_4 ，0.3 mmol/L NaCl，1 mmol/L PMSF，1 mg/mL 溶菌酶）重悬菌体，搅拌均匀。将重悬的细胞于冰上进行短时

间的超声破碎。然后 4 °C 12 000 r/min 离心 30 min，将上清转移入新的离心管中。取样以备电泳检测裂解情况。用 Ni - NTA His Bind Resins 装柱，用十倍柱体积的结合缓冲液（50 mmol/L NaH_2PO_4 ，0.3 mmol/L NaCl）平衡柱子。将离心后的细菌裂解上清上柱，用低压层析仪控制流速为 0.5 mL/min，收集上样流出液。用十倍柱体积的 1 × Wash Buffer（50 mmol/L NaH_2PO_4 ，0.3 mmol/L NaCl，0.02 mol/L imidazole）清洗柱子。柱子洗涤完，盖上底部的帽子，用 5 倍柱床体积的 1 × Elute Buffer（50 mmol/L NaH_2PO_4 ，0.3 mmol/L NaCl，0.5 mol/L imidazole）洗脱，收集流出蛋白。SDS - PAGE 检测融合蛋白的纯化效率。

2.2.6 p53 突变体与 mdm2 的蛋白互作能力分析

泛素 E3 连接酶是 p53 蛋白的重要互作蛋白之一，也是 p53 蛋白质水平的关键调节分子之一^[5]。利用原核表达并纯化好的 GST - mdm2 蛋白可以检测 p53 突变体蛋白（p53m）是否保留了与 mdm2 的结合能力，推测该突变体的蛋白质稳定性是否受到影响。分别取 3 μg 的 GST 蛋白与 8 μg 的 GST - mdm2 蛋白（等摩尔），各加入经 binding buffer（PBS，5 mmol/L EGTA，0.1 % (v/v) Triton X - 100，0.5 mmol/L PMSF）预处理的葡聚糖珠子 25 μL（50% slurry）和 5 μg His - p53 或者 His - p53m，再加入 binding buffer 至终体积 500 μL。4 °C 旋转孵育 2 h。3000 r/min 离心 2 min，去上清。加入 1 mL binding buffer 洗涤珠子，上下充分颠倒后 3000 r/min 离心 2 min，弃上清，重复 3 次。最后向沉淀珠子中加入 25 μL 上样缓冲液，煮沸 5 min。将样品进行 SDS - PAGE 电泳分离。利用抗 GST 单抗和抗 His 单抗进行 Western Blotting。对比野生型 p53 蛋白，检测突变型 p53 蛋白的结合能力是否发生变化。

2.2.7 p53 突变体与 DNA 结合能力分析

转录激活靶基因的转录是 p53 蛋白质的重要分子机制，多数 p53 突变体的转录激活水平发生了改变。利用体外的 EMSA 实验可以验证 p53 突变体与 DNA 识别序列的结合能力的变化^[6]。将纯化得到的 p53 突变蛋白和野生型 p53 蛋白与生物素标记探针（序列为：5' - AGACATGCCTAGACATGCCT - 3'）孵育（4 μL 5 × Binding Buffer，1 μL Poly (dl · dC)，1 μL Poly Lysine，2 μL 标记探针，2 μg p53 蛋白或 p53 突变蛋白，加水至终体积 20 μL。）室温下反应 25 min。冰上放置终止反应，加入 5 μL 5 × 上样缓冲液，上样，6% 非变性胶电泳，80 V，溴酚蓝到底端处停止电泳。80 V 湿转 1 h 至

尼龙膜上。转印后尼龙膜含有 DNA 面朝上，紫外照射进行交联。漂洗缓冲液（试剂盒提供）漂洗 5 min，封闭液（试剂盒提供）封闭 30 min。抗体孵育 30 min。漂洗液漂洗 15 min，两遍。检测平衡液（试剂盒提供）漂洗 5 min。加入底物，室温反应 5 min，37 °C 反应 10 min。压片曝光。对比野生型 p53 蛋白，检测突变型 p53 蛋白的结合能力是否发生变化。

3 讨论与结语

随着生物科学不断向分子水平拓展和延伸，分子生物学的教学质量在生物科学及相关专业的人才培养中的影响越来越大。分子生物学又是一门实验性学科，实验课程的重要性不容小觑。实验课堂有它独特的教学优势，实验操作以学生为主体、并需要学生手脑并用，因此可以促进学生对理论知识的理解与消化，培养学生关注知识的兴趣与研究问题的能力。但现行实验课程内容过于传统陈旧，虽然对构筑分子生物学的基础有帮助，但显然不能提升学生的学习兴趣，亦不能满足研究型人才培养的需求。如何适应不断发展的学科需求，将传统实验技术与内容和现代科学研究与热点问题相结合，如何提高实验课程的实用性和学习价值，利用实验课堂传授规范的科学思维和研究方法，引导学生发现、思考和解决科学问题，培养真正的生物科研人才，应该成为广大高校实验课程教师们关注的问题^[7]。

在本实验课题的构思中，笔者一方面注重在有序的实验流程中糅合性质多样的，操作性强，内容新颖的实验技术方法。这些技术与方法（如 Western blot，蛋白互作，EMSA 等）的实践经验不仅能帮助学生理解

相关的实验原理，而且能紧密结合他们在科研实验室所从事的研究工作，为他们带来指导和帮助。另一方面，笔者追求在验证已知科学现象与规律的同时，鼓励和指导同学们利用现有实验流程自行设计和解决未知的科学问题。对于一些未有任何数据发表的 p53 突变体，做出重要数据的同学还可以继续深入他的研究工作，借助笔者所在的科研团队完成一项有质量的课题研究，发表科学研究论文。最终通过这一方式实现从专业基础实验课程向开放实验课堂的顺利过渡。

参考文献

- [1] 曹志贱, 蒋达和, 陈宇, 等. 分子生物学实验教学的几点体会 [J]. 教育教学论坛, 2012 (45): 245 - 246.
- [2] Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field [J]. Nat. Rev. Cancer, 2009, 9 (10): 701 - 713.
- [3] Petitjean A, Achatz M I, Borresen-Dale A L, et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes [J]. Oncogene, 2007, 26 (15): 2157 - 2165.
- [4] Muller P A, Vousden K H. p53 mutations in cancer [J]. Nat. Cell Biol., 2013, 15 (1): 2 - 8.
- [5] Moll U M, Petrenko O. The MDM2 - p53 Interaction [J]. Mol. Cancer Res., 2003, 1 (14): 1001 - 1008.
- [6] Wang Y, Schwedes J F, Parks D, et al. Interaction of p53 with its consensus DNA - binding site [J]. Mol. Cell Biol., 1995, 15 (4): 2157 - 2165.
- [7] 吴燕华, 郭滨, 娄慧玲, 等. 从基因克隆到表达分析——改革基因工程实验课程的实践与体会 [J]. 遗传, 2012, 34 (2): 248 - 252.

(责编 高新景)