



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108546734 A

(43)申请公布日 2018.09.18

(21)申请号 201810202831.5

(22)申请日 2018.03.13

(71)申请人 吴俊

地址 210000 江苏省南京市江宁区龙眠大道101号

(72)发明人 吴俊 苗登顺

(51)Int.Cl.

C12Q 1/26(2006.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12Q 1/6888(2018.01)

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书4页 说明书10页

(54)发明名称

细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法

(57)摘要

本发明公开了一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,率先利用细胞分子生物学技术以及模式动物研究p27是否能够与p130/E2F4共同作用,结合到Shh基因的启动子区域,发挥转录抑制Shh的功能,抑制骨髓间充质干细胞增殖和分化,从而发挥抑制成骨细胞骨形成的作用,利用Real time RT-PCR和Western blot实验从RNA和蛋白水平对芯片数据进行了初步验证,同时验证p27能够与p130/E2F4共同作用,结合到Shh基因的启动子区域,转录抑制Shh的表达,从而发挥抑制骨髓间充质干细胞(BM-MSC)增殖和分化,抑制成骨细胞骨形成的作用。

1. 一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 取4至5周小鼠的胫骨组织,使用PLP固定液固定,经脱钙、脱水、石蜡包埋、切片后进行HE染色、组化和免疫组化染色;

取新鲜胫骨组织,提取RNA用于Real-time RT-PCR检测,备用;

取新鲜胫骨组织提取蛋白质用于Western blot 分析,备用;

b. 取妊娠13或14天的孕鼠,进行胚胎成纤维细胞培养;

将子宫角放在一次性直径10cm培养皿中,用无菌PBS洗3次,10ml/次;用无菌眼科剪剪开胚囊,让胚胎流入培养皿中;

用无菌眼科镊去除胎盘和胎膜,并去除所有的脏器组织,将胚胎放入干净的P100培养皿中,无菌 PBS洗3次;用弯头眼科剪仔细剪碎胚胎组织至直径 1-3mm 碎块,加入 5ml 0.25%胰酶-EDTA,37℃静置20分钟;

用移液管剧烈吹吸胰酶-EDTA中的组织,直至组织块几乎消失;37℃继续静置10分钟;

加入20ml含10%胎牛血清的 DMEM高糖培养液(10%FBS/DMEM)终止胰酶的消化作用,将组织单细胞悬液移至一次性50ml尖底离心管中;

充分混匀离心管中的细胞悬液,均匀加入含 10ml 10%FBS/DMEM的含用移液管吹打混匀细胞后转移至P100培养皿中;

c. 取生后4周小鼠进行骨髓间充质干细胞培养及染色;

用标准培养基将骨髓中的骨髓细胞冲出,并反复吹打,用注射器将细胞从针头推出,通过筛网,制成单细胞悬液,将 2×10^6 细胞种入60mm的培养皿,加3ml培养基,放入培养箱培养;每隔2天换培养液一次;14天后细胞固定,进行细胞染色;

d. 进行骨形态学检测:首先固定后的骨组织进行X线摄影,观察骨骼形态和密度的改变;

然后进行Micro-CT扫描和三维重建:取胫骨,进行微-CT扫描和三维重建观察胫骨矿化程度的改变;

再进行组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作HE、总胶原、碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)等组织化学染色;

最后进行免疫组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作免疫组化染色;检测指标包括成骨细胞分化指标即I型胶原(Col-1)、骨钙素(CN);破骨细胞分化指标和核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL);

e. 提取小鼠长骨骨组织总RNA,采用Axon GenePix 4000B 芯片扫描获得芯片数据,运用NimbleScan软件通过Robust Multichip Average (RMA)算法分析获得差异基因,Agilent GeneSpring GX software 分析差异基因获得表达热图;

f. 进行蛋白质和RNA水平检测,取骨组织提取的RNA,作Real-time RT-PCR分析,观察骨形成相关基因、细胞周期相关基因、Shh信号通路相关基因表达及p130/E2F4复合物基因表达的变化;

g. 进行质粒构建与转染,根据Refseq数据库查询基因的全长转录本序列,通过化学合成法合成基因的全长转录本序列,并插入真核表达载体pcDNA3.1+中,构建基因过表达载体;利用siRNA 设计软件,设计 3~5个siRNA序列构建到ShRNA载体,经测序鉴定正确的

克隆,用于下一步RNAi效率分析,将构好的质粒用Qiagen Plasmid Midi Kit 中量提取,用于细胞转染;

设计PCR 引物,扩增获得目的基因启动子区域片段,插入pGL3-basic荧光素酶表达质粒载体,将荧光素酶表达质粒及RT-LK质粒共转染入MEF细胞;将转染后的细胞置于37°C CO₂ 培养箱中培养 48h 后收集细胞提取总RNA通过Realtime RT-PCR 进行mRNA水平检测,提取蛋白进行Western Blot检测,按照Promega荧光素酶检测试剂盒说明进行荧光素酶检测;

- h. 进行免疫共沉淀 (Co-IP);
- i. 进行染色质免疫共沉淀 (ChIP) 实验;
- j. 进行凝胶电泳迁移 (EMSA) 实验;
- k. 荧光素酶报告基因检测

使用12孔细胞种板,每孔种约 40000 个 WT和p27 成纤维细胞;次日,用Lipofectamine3000将500ng pGL3-Shh和25ng pRL-TK 共同转染到细胞中;

48 小时后,将正常的换成含 0.5%胎牛血清的低血清培养液培养细胞,24-48 小时后,用冰 PBS 洗细胞一次,每孔加入Promega荧光素酶检测试剂盒自带的 PLB 裂解液 100μl 室温快速振摇裂解细胞 30 分钟;收集裂解液至 1.5ml EP 管中,13000g 室温离心 5min 后,取 80μl上清液进行荧光素酶活性的检测。

2. 根据权利要求1所述的细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于,所述步骤h 包括以下子步骤:

1) 将收集到的细胞,加入适量细胞裂解缓冲液,冰上裂解30min,细胞裂解液于4°C 最大转速离心30 min后取上清;

2) 取少量裂解液以备Western blot分析,剩余裂解液加1μg相应的抗体加入到细胞裂解液,4°C缓慢摇晃孵育过夜;

3) 取10μl protein A 琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗3 次,每次3,000 rpm离心3 min;

4) 将预处理过的10μl protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中4°C缓慢摇晃孵育2-4h,使抗体与protein A琼脂糖珠偶连;

5) 免疫沉淀反应后,在4°C以3,000 rpm 速度离心3 min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清小心吸去,琼脂糖珠用1ml裂解缓冲液洗3-4次;最后加入15μl的2×SDS上样缓冲液,沸水煮5分钟;

6) 制作SDS-PAGE,通过Western blot实验确定结合蛋白。

3. 根据权利要求1所述的细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于,所述步骤i包括以下子步骤:

1) 细胞的甲醛交联与超声破碎,取出1平皿细胞,加入243μl 37%甲醛,使得甲醛的终浓度为1%;37摄氏度孵育10min;

终止交联:加甘氨酸至终浓度为0.125M;450μl 2.5M甘氨酸于平皿中;混匀后,在室温下放置5min即可;吸尽培养基,用冰冷的PBS清洗细胞2次;细胞刮刀收集细胞于15ml离心管中;预冷后2000rpm 5min收集细胞;倒去上清;

按照细胞量,加入SDS Lysis Buffer,使得细胞终浓度为每200μl含2×10⁶个细胞;

这样每100 μ l溶液含 1×10^6 个细胞,再加入蛋白酶抑制剂复合物;超声破碎;

2) 除杂及抗体孵育,超声破碎结束后,10,000 $\times g$ 4 $^{\circ}C$ 离心10 min;去除不溶物质;留取300 μ l做实验,其余保存于-80 $^{\circ}C$;300 μ l中,100 μ l加抗体做为实验组;100 μ l不加抗体做为对照组;100 μ l加入4 μ l 5M NaCl (NaCl终浓度为0.2 M),65 $^{\circ}C$ 处理3 h解交联,跑电泳,检测超声破碎的效果;在100 μ l的超声破碎产物中,加入900 μ l ChIP Dilution Buffer和20 μ l的50 \times PIC;再各加入60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA;4 $^{\circ}C$ 颠转混匀1h;

1h后,在4 $^{\circ}C$ 静置10min沉淀,700rpm离心1min;取上清,各留取20 μ l作为Input,一管中加入1 μ l抗体,另一管中则不加抗体;4 $^{\circ}C$ 颠转过夜;

3) 检验超声破碎的效果

取100 μ l超声破碎后产物,加入4 μ l 5M NaCl,65 $^{\circ}C$ 处理2h解交联;分出一半用酚/氯仿抽提;电泳检测超声效果;

4) 免疫复合物的沉淀及清洗

孵育过夜后,每管中加入60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA;颠转2h;4 $^{\circ}C$ 静置10min后,700rpm离心1 min,除去上清;加入溶液,在4 $^{\circ}C$ 颠转10min,4 $^{\circ}C$ 静置10min沉淀,700rpm离心1min,除去上清;洗涤溶液:

清洗完毕后,开始洗脱;洗脱液的配方为:100 μ l 10%SDS,100 μ l 1M NaHCO₃,800 μ l ddH₂O,共1ml;每管加入250 μ l洗脱buffer,室温下颠转15min,静置离心后,收集上清;重复洗涤一次,最终的洗脱液为每管500 μ l;解交联:每管中加入20 μ l 5M NaCl;混匀,65 $^{\circ}C$ 解交联过夜;

5) DNA样品的回收

解交联结束后,每管加入1 μ l RNaseA,37 $^{\circ}C$ 孵育1h;每管加入10 μ l 0.5M EDTA,20 μ l 1M Tris.HCl,2 μ l 10mg/ml蛋白酶K;45 $^{\circ}C$ 处理2h;DNA片段的回收----Omega胶回收试剂盒;最终的样品溶于100 μ l ddH₂O;设计引物,进行定量PCR。

4. 根据权利要求1所述的细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于,所述步骤j中包括以下子步骤:

1) 核蛋白提取:

细胞培养至所需状态,吸出培养基,用2ml冰预冷的PBS冲洗细胞两次;收集细胞,加入500 μ l Buffer A,反复吹打,冰上放置5分钟;16000rpm,离心1 min;弃上清,加入500 μ l Buffer B,反复吹打;1600rpm,离心1 min;弃上清,加入120 μ l Buffer C,振荡,4 $^{\circ}C$,30min;-80 $^{\circ}C$,保存,用BCA法定量蛋白质;

2) 探针的合成:

所用探针为采购的生物素标记;

3) DNA与蛋白结合:

在冰上按照试剂盒说明书混合样品和试剂:充分混合,15-25 $^{\circ}C$ 孵育15分钟,冰上放置;每管加入5 μ l的上样缓冲液,混匀,离心;

4) 灌制凝胶、电泳及转膜:

与Western方式一致,配方中不含SDS;

5) 化学发光检测:

在Washing buffer中洗膜3min;在Blocking buffer中孵育30min;在Antibody

solution中孵育30min;在Washing buffer中洗膜2次,每次15min;在Detection buffer中放置5min;显影方式与Western blot一致。

5. 根据权利要求1所述的细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于:所述步骤a中胫骨组织经乙二胺四乙酸-甘油溶液脱钙,乙二胺四乙酸-甘油溶液的浓度为1%~2.2%。

6. 根据权利要求1所述的细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,其特征在于:所述步骤a中PLP固定液包括2%的复醛,75mM的,10mM的过碘酸钠。

细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物基因技术领域,具体涉及一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法。

背景技术

[0002] 人体正常的骨代谢过程是骨组织不断进行改建活动的一个复杂过程,包括骨形成和骨吸收两个方面。成骨细胞骨形成与破骨细胞骨吸收两者的平衡是维持正常骨量的关键,细胞周期的调节可以显著影响成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化,研究证实细胞周期进程受阻会影响骨的发育、形成及稳态,但细胞周期调节因子究竟是如何调节骨发育、形成及稳态相关基因的尚不完全清楚。

[0003] p27kip1基因是一种细胞周期素依赖性激酶(Cyclin dependent kinase, CDK)抑制因子,这一功能在p27基因敲除(p27)小鼠模型中得到体现。研究人员通过对小鼠表型分析,发现p27小鼠生长加快,体型增大,多器官因细胞增殖增加而肥大,并发生多发性内分泌瘤病以及视网膜发育异常。研究证实p27基因可以抑制C3H10T1/2成纤维细胞向成骨细胞分化,而p27基因缺失能够促进成骨细胞的生长和分化。实验室最近的研究结果还发现p27小鼠成骨细胞骨形成增加,长骨和下颌骨量明显增加,但p27基因在骨骼生长发育中确切的调节机制尚不清楚。

[0004] 为了探索p27基因在调节骨骼生长发育中的机制,利用全基因组表达谱基因芯片扫描分析技术比较了同窝2周龄WT与p27小鼠骨组织基因表达谱的差异,运用Agilent GeneSpring GX software 分析差异基因,获得差异基因表达热图,基于KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库的信号通路富集分析,结果发现在p27小鼠骨组织中Sonic Hedgehog(Shh)信号通路显著激活,利用Real time RT-PCR和Western blot实验从RNA和蛋白水平对芯片数据进行了初步验证是一个新的技术路线。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供了一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,率先利用细胞分子生物学技术以及模式动物研究p27是否能够与p130/E2F4共同作用,结合到Shh基因的启动子区域,发挥转录抑制Shh的功能,抑制骨髓间充质干细胞增殖和分化,从而发挥抑制成骨细胞骨形成的作用,利用Real time RT-PCR和Western blot实验从RNA和蛋白水平对芯片数据进行了初步验证,同时验证p27能够与p130/E2F4共同作用,结合到Shh基因的启动子区域,转录抑制Shh的表达,从而发挥抑制骨髓间充质干细胞(BM-MSC)增殖和分化,抑制成骨细胞骨形成的作用。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法,包括以下步骤:

包括以下步骤:

a. 取4至5周小鼠的胫骨组织,使用PLP固定液固定,经脱钙、脱水、石蜡包埋、切片后进行HE染色、组化和免疫组化染色;

取新鲜股骨组织,提取RNA用于Real-time RT-PCR检测,备用;

取新鲜股骨组织提取蛋白质用于Western blot 分析,备用;

b. 取妊娠13或14天的孕鼠,进行胚胎成纤维细胞培养;

将子宫角放在一次性直径10cm培养皿中,用无菌PBS洗3次,10ml/次;用无菌眼科剪剪开胚囊,让胚胎流入培养皿中;

用无菌眼科镊去除胎盘和胎膜,并去除所有的脏器组织(胚胎中深色区域),将胚胎放入干净的P100培养皿中,无菌 PBS洗3次;用弯头眼科剪仔细剪碎胚胎组织至直径 1-3mm碎块,加入 5ml 0.25%胰酶-EDTA,37℃静置20分钟;

用移液管剧烈吹吸胰酶-EDTA中的组织,直至组织块几乎消失;37℃继续静置10分钟;

加入20ml含10%胎牛血清的 DMEM高糖培养液(10%FBS/DMEM)终止胰酶的消化作用,将组织单细胞悬液移至一次性50ml尖底离心管中;

充分混匀离心管中的细胞悬液,均匀加入含 10ml 10%FBS/DMEM的含用移液管吹打混匀细胞后转移至P100培养皿中;

c. 取生后4周小鼠进行骨髓间充质干细胞培养及染色;

用标准培养基将骨髓中的骨髓细胞冲出,并反复吹打,用注射器将细胞从针头推出,通过筛网,制成单细胞悬液,将 2×10^6 细胞种入60mm的培养皿,加3ml培养基(5×10^6 细胞种入10mm培养皿),放入培养箱培养;每隔2天换培养液一次;14天后细胞固定,进行细胞染色;

d. 进行骨形态学检测:首先固定后的骨组织进行X线摄影,观察骨骼形态和密度的改变;

然后进行Micro-CT扫描和三维重建:取胫骨,进行微-CT扫描和三维重建观察胫骨矿化程度的改变;

再进行组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作HE、总胶原、碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)等组织化学染色;

最后进行免疫组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作免疫组化染色;检测指标包括成骨细胞分化指标即I型胶原(Col-I)、骨钙素(CN);破骨细胞分化指标和核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL);

e. 提取小鼠长骨骨组织总RNA,采用Axon GenePix 4000B 芯片扫描获得芯片数据,运用NimbleScan软件通过Robust Multichip Average (RMA)算法分析获得差异基因,Agilent GeneSpring GX software 分析差异基因获得表达热图;

f. 进行蛋白质和RNA水平检测,取骨组织提取的RNA,作Real-time RT-PCR分析,观察骨形成相关基因、细胞周期相关基因、Shh信号通路相关基因表达及p130/E2F4复合物基因表达的变化;

g. 进行质粒构建与转染,根据Refseq数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)查询基因的全长转录本序列,通过化学合成法合成基因的全长转录本序列,并插入真核表达载体pcDNA3.1+中,构建基因过表达载体;利用siRNA 设计软件,设计 3~5个siRNA序列构建到ShRNA载体,经测序鉴定正确的克隆,用于下一步RNAi效率分析。将构好的质粒用Qiagen Plasmid Midi Kit 中量提取,用于细胞转染;

设计PCR引物,扩增获得目的基因启动子区域片段,插入pGL3-basic荧光素酶表达质粒载体,将荧光素酶表达质粒及RT-LK质粒共转染入MEF细胞;将转染后的细胞置于37℃ CO2培养箱中培养48h后收集细胞提取总RNA通过Realtime RT-PCR进行mRNA水平检测,提取蛋白进行Western Blot检测,按照Promega荧光素酶检测试剂盒说明进行荧光素酶检测;

- h. 进行免疫共沉淀 (Co-IP);
- i. 进行染色质免疫共沉淀 (ChIP) 实验;
- j. 进行凝胶电泳迁移 (EMSA) 实验;
- k. 荧光素酶报告基因检测

使用12孔细胞种板,每孔种约40000个WT和p27成纤维细胞;次日,用Lipofectamine3000将500ng pGL3-Shh和25ng pRL-TK共同转染到细胞中;

48小时后,将正常的换成含0.5%胎牛血清的低血清培养液培养细胞,24-48小时后,用冰PBS洗细胞一次,每孔加入Promega荧光素酶检测试剂盒自带的PLB裂解液 (Passive Lysis Buffer) 100μl室温快速振摇裂解细胞30分钟;收集裂解液至1.5ml EP管中,13000g室温离心5min后,取80μl上清液进行荧光素酶活性的检测。

[0007] 所述步骤h包括以下子步骤:

1) 将收集到的细胞,加入适量细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解30min,细胞裂解液于4℃最大转速离心30min后取上清;

2) 取少量裂解液以备Western blot分析,剩余裂解液加1μg相应的抗体加入到细胞裂解液,4℃缓慢摇晃孵育过夜;

3) 取10μl protein A琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗3次,每次3,000 rpm离心3min;

4) 将预处理过的10μl protein A琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中4℃缓慢摇晃孵育2-4h,使抗体与protein A琼脂糖珠偶连;

5) 免疫沉淀反应后,在4℃以3,000 rpm速度离心3min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清小心吸去,琼脂糖珠用1ml裂解缓冲液洗3-4次;最后加入15μl的2×SDS上样缓冲液,沸水煮5分钟;

6) 制作SDS-PAGE,通过Western blot实验确定结合蛋白。

[0008] 所述步骤i包括以下子步骤:

1) 细胞的甲醛交联与超声破碎,取出1平皿细胞(10cm平皿),加入243μl 37%甲醛,使得甲醛的终浓度为1%(培养基共有9ml);37摄氏度孵育10min;

终止交联:加甘氨酸至终浓度为0.125M;450μl 2.5M甘氨酸于平皿中。混匀后,在室温下放置5min即可;吸尽培养基,用冰冷的PBS清洗细胞2次;细胞刮刀收集细胞于15ml离心管中(PBS依次为5ml,3ml和3ml);预冷后2000rpm 5min收集细胞;倒去上清;

按照细胞量,加入SDS Lysis Buffer。使得细胞终浓度为每200μl含 2×10^6 个细胞;

这样每100μl溶液含 1×10^6 个细胞,再加入蛋白酶抑制剂复合物;超声破碎;

2) 除杂及抗体孵育,超声破碎结束后, $10,000 \times g$ 4℃离心10min;去除不溶物质;留取300μl做实验,其余保存于-80℃;300μl中,100μl加抗体做为实验组;100μl不加抗体做为对照组;100μl加入4μl 5M NaCl (NaCl终浓度为0.2 M),65℃处理3h解交联,跑电泳,检测

超声破碎的效果;在100 μ l的超声破碎产物中,加入900 μ l ChIP Dilution Buffer和20 μ l的50 \times PIC;再各加入60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA;4 $^{\circ}$ C颠转混匀1h;

1h后,在4 $^{\circ}$ C静置10min沉淀,700rpm离心1min;取上清。各留取20 μ l作为Input。一管中加入1 μ l抗体,另一管中则不加抗体;4 $^{\circ}$ C颠转过夜;

3) 检验超声破碎的效果

取100 μ l超声破碎后产物,加入4 μ l 5M NaCl,65 $^{\circ}$ C处理2h解交联;分出一半用酚/氯仿抽提;电泳检测超声效果;

4) 免疫复合物的沉淀及清洗

孵育过夜后,每管中加入60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA;颠转2h;4 $^{\circ}$ C静置10min后,700rpm离心1 min,除去上清;加入溶液,在4 $^{\circ}$ C颠转10min,4 $^{\circ}$ C静置10min沉淀,700rpm离心1min,除去上清;洗涤溶液:

清洗完毕后,开始洗脱;洗脱液的配方为:100 μ l 10%SDS,100 μ l 1M NaHCO₃,800 μ l ddH₂O,共1ml;每管加入250 μ l洗脱buffer,室温下颠转15min,静置离心后,收集上清;重复洗涤一次。最终的洗脱液为每管500 μ l;解交联:每管中加入20 μ l 5M NaCl (NaCl终浓度为0.2M);混匀,65 $^{\circ}$ C解交联过夜;

5) DNA样品的回收

解交联结束后,每管加入1 μ l RNaseA (MBI),37 $^{\circ}$ C孵育1h;每管加入10 μ l 0.5M EDTA,20 μ l 1M Tris.HCl (PH6.5),2 μ l 10mg/ml蛋白酶K;45 $^{\circ}$ C处理2h;DNA片段的回收----Omega胶回收试剂盒;最终的样品溶于100 μ l ddH₂O;设计引物,进行定量PCR。

[0009] 所述步骤j中包括以下子步骤:

1) 核蛋白提取:

细胞培养至所需状态,吸出培养基,用2ml冰预冷的PBS冲洗细胞两次;收集细胞,加入500 μ l Buffer A,反复吹打,冰上放置5分钟;16000rpm,离心1 min;弃上清,加入500 μ l Buffer B,反复吹打;1600rrpm,离心1 min;弃上清,加入120ml Buffer C,振荡,4 $^{\circ}$ C,30min;-80 $^{\circ}$ C,保存,用BCA法定量蛋白质;

2) 探针的合成:

所用探针为生物素标记,采购。

[0010] 3) DNA与蛋白结合:

在冰上按照试剂盒说明书混合样品和试剂:充分混合,15-25 $^{\circ}$ C孵育15分钟,冰上放置;每管加入5 μ l的上样缓冲液,混匀,离心。

[0011] 4) 灌制凝胶、电泳及转膜:

与Western方式一致,配方中不含SDS。

[0012] 5) 化学发光检测:

在Washing buffer中洗膜3min;在Bl $^{\circ}$ Cking buffer中孵育30min;在Antibody solution中孵育30min;在Washing buffer中洗膜2次,每次15min;在Detection buffer中放置5min;显影方式与Western blot一致。

[0013] 所述步骤a中胫骨组织经乙二胺四乙酸-甘油溶液脱钙,乙二胺四乙酸-甘油溶液的浓度为1%~2.2%。

[0014] 所述步骤a中PLP固定液包括2%的复醛,75mM的,10mM的过碘酸钠。

[0015] 由于上述技术方案的运用,本发明与现有技术相比具有下列优点:

率先利用细胞分子生物学技术以及模式动物研究 p27 是否能够与 p130/E2F4共同作用,结合到 Shh 基因的启动子区域,发挥转录抑制 Shh 的功能,抑制骨髓间充质干细胞增殖和分化,从而发挥抑制成骨细胞骨形成的作用,利用 Real time RT-PCR 和 Western blot 实验从 RNA 和蛋白水平对芯片数据进行了初步验证,同时验证p27 能够与p130/E2F4 共同作用,结合到 Shh 基因的启动子区域,转录抑制 Shh 的表达,从而发挥抑制骨髓间充质干细胞(BM-MSC)增殖和分化,抑制成骨细胞骨形成的作用。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0017] 实施例一

明确 p27 基因缺失是否通过激活 Shh 信号通路,促进 BM-MSCs 增殖和向成骨细胞分化,而引起骨形成增加

1)明确 p27 基因缺失是否激活小鼠骨组织中 Shh 信号通路

为了进一步验证 p27 基因缺失小鼠骨组织芯片扫描结果即 Shh 信号通路激活,我们将提取WT及p27^{-/-}小鼠长骨组织RNA和总蛋白,使用Real-time RT-PCR和 Western blot 的方法,检测 Shh 信号通路的相关基因和蛋白表达水平的变化。2)明确 Shh 是否是 p27 的潜在目标基因

为了明确 Shh 是否是 p27 的潜在目标基因,我们首先分析了 p27 目标基因(p27-TGs)芯片数据(GSE20068),接着通过免疫共沉淀实验(Co-IP)来验证这一结果。

[0018] 3)明确 p27 是否能够抑制 Shh 的表达

为了明确 p27 是否能够抑制 Shh 的表达,我们将培养成纤维细胞系C3H10T1/2 和 NIH3T3,分别转染 p27 基因过表达(0v-)和敲低(Sh-)质粒,提取细胞 mRNA 和总蛋白,检测 Shh 基因和蛋白表达水平的变化。

[0019] 4)明确 p27 基因缺失是否通过激活 Shh 信号通路促进 BM-MSCs 增殖和向成骨细胞分化

为了明确 p27 基因缺失是否通过激活 Shh 信号通路,促进 BM-MSCs 增殖和向成骨细胞分化,我们通过体外培养 WT 和 p27^{-/-} 小鼠来源的 BM-MSCs,分别给予 Shh 信号通路特异性抑制剂 KAAD-Cyclopamine 处理或转染 Shh 敲低质粒,对形成的成纤维细胞集落分别进行甲基蓝染色和 ALP 细胞化学染色,并通过图像分析对甲基蓝染色阳性的总成纤维细胞集落形成单位(CFU-f)和 ALP 阳性 CFU-f(CFU-fap)面积进行统计,同时收集细胞,提取 RNA 和蛋白检测成骨相关基因和蛋白、Shh 信号通路相关基因和蛋白表达水平的变化。

[0020] 明确 p27 是否能够与 p130/E2F4 共同作用,结合到 Shh 基因的启动子区域,转录抑制 Shh 的表达

1)明确 p27 基因是否对 Shh 基因启动子区域存在表观遗传抑制

我们通过公共数据库 UCSC 网站预测获得 Shh 基因启动子序列。鉴于组蛋白 H3K9me3 和 H3K27me3 是基因是否受到抑制的重要表观遗传标志,为了明确 p27 基因是否对 Shh 基因启动子区域的存在抑制作用,我们将培养 WT 和 p27^{-/-}小鼠胚胎成纤维

细胞(MEFs),通过染色质免疫共沉淀(ChIP)实验检测 Shh 基因启动子区域 H3K9me3 和 H3K27me3 富集水平的变化。

[0021] 2)明确 p27 基因是否与 p130/E2F4 复合物共同作用于 Shh 基因启动子区域发挥转录抑制作用

为了明确 p27 基因是否与 p130/E2F4复合物共同作用于Shh 基因启动子区域,我们将培养 WT 和 p27^{-/-}小鼠的 MEFs,通过 JASPAR 在线软件预测 Shh 基因的启动子区域是否存在转录因子 p130 和 E2F4 的结合位点,通过 ChIP 实验和凝胶电泳迁移实验(EMSA)检测 Shh 基因启动子区域 p27、p130 和 E2F4 的富集变化。

[0022] 1)明确 p27 基因是否是共转录抑制 Shh 表达所必需

为了明确 p27 基因是否是上述共转录抑制 Shh 所必需,我们将构建 p130 和E2F4 过表达(0v-)或敲低(Sh-)质粒以及含有 Shh 基因启动子片段的荧光素酶表达质粒(pGL3-Shh)分别转染 WT 和 p27^{-/-}MEFs 细胞,通过 Realtime RT-PCR、Western blot 和荧光素酶检测等实验,从 RNA 和蛋白调节水平明确 p130 和 E2F4在 p27 存在或缺失时对 Shh 基因表达的影响。

[0023] 明确 p27 基因缺失致骨形成增加是否能够通过^{在体}抑制 Shh 所纠正

为了明确 p27 基因缺失致小鼠骨形成增加是否能够通过^{在体}抑制 Shh 所纠正,我们将给予同窝 3 周龄 WT 和 p27^{-/-}小鼠灌胃 Shh 信号通路特异性口服抑制剂 Vismodegib 或尾静脉注射 Shh 敲低质粒,2 周后收集小鼠的长骨,通过影像学的方法分别观察 WT 和 p27^{-/-}小鼠处理组和未处理组骨形态及骨密度的变化;采用组织学和组织化学染色的方法,观察各组小鼠骨量的改变;通过组织化学、免疫组织化学染色及 Real-time RT-PCR 和 Western blot 的方法,分别观察各组成骨相关基因和蛋白及 Shh 信号通路相关基因和蛋白表达水平的变化。

[0024] 实施例二

1.实验动物及基因型鉴定

p27 杂合子(p27^{+/-})小鼠雌雄交配,用本实验室已建立的 PCR 方法对出生后仔鼠进行基因型鉴定,获得 WT 和 p27^{-/-}小鼠,比较分析 2 种基因型小鼠表型差异,观察 p27 基因敲除能否影响小鼠骨骼发育表型。

[0025] 2.取材

取 4 或 5 周龄小鼠,麻醉后。取胫骨组织,使用能更好保存酶活性和组织抗原性的 PLP (2%复醛,75mM 赖氨酸,10mM 过碘酸钠)固定液固定,经常规脱钙、脱水、石蜡包埋、切片,用于 HE 染色、组化和免疫组化染色。取新鲜股骨组织,提取 RNA 用于 Real-time RT-PCR 检测;取新鲜股骨组织提取蛋白质用于 Western blot 分析。

[0026] 3.石蜡切片制备

取胫骨组织经乙二胺四乙酸-甘油溶液脱钙后,制备石蜡切片。

[0027] 4.基因信号通路富集

按照 WebGestalt 软件使用方法操作。

[0028] 5.细胞培养及染色

1)胚胎成纤维细胞培养

取妊娠 13 或 14 天的孕鼠,颈椎脱臼法处死,腹部用 75%医用酒精消毒;剪开腹部皮

肤,暴露腹膜;用无菌手术器械打开腹腔壁,暴露子宫角;取出子宫角,放在一次性直径 10cm 培养皿中,用无菌 PBS 洗 3 次,10ml/次;用无菌眼科剪剪开胚囊,让胚胎流入培养皿中;用无菌眼科镊去除胎盘和胎膜,并去除所有的脏器组织(胚胎中深色区域),将胚胎放入干净的 P100 培养皿中,无菌 PBS 洗 3 次;用弯头眼科剪仔细剪碎胚胎组织至直径 1-3mm 碎块,加入 5ml 0.25%胰酶-EDTA,37℃静置 20 分钟;用移液管剧烈吹吸胰酶-EDTA 中的组织,直至组织块几乎消失;37℃继续静置 10 分钟;加入 20ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液(10%FBS/DMEM)终止胰酶的消化作用,将组织单细胞悬液移至一次性 50ml 尖底离心管中;充分混匀离心管中的细胞悬液,均匀加入含 10ml 10%FBS/DMEM 的含用移液管吹打混匀细胞后转移至 P100 培养皿中。

[0029] 2)骨髓间充质干细胞培养及染色

取生后 4 周小鼠进行研究,乙醚麻醉,颈椎脱臼处死,浸入 75%酒精。从酒精中取出,移到超净台内,玻璃小鼠后肢的皮肤并将后肢分离下来,用标准培养基将骨髓中的骨髓细胞冲出,并反复吹打,用注射器将细胞从针头推出,通过筛网,制成单细胞悬液,将 2×10^6 细胞种入 60mm 的培养皿,加 3ml 培养基(5×10^6 细胞种入 10mm 培养皿),放入培养箱培养。每隔 2 天换培养液一次。14 天后细胞固定,按照我们之前报道的方法[13]进行细胞染色。

[0030] 6.骨形态学检测X-线摄影:固定后的骨组织进行 X 线摄影,观察骨骼形态和密度的改变。

[0031] Micro-CT 扫描和三维重建:取胫骨,进行微-CT 扫描和三维重建观察胫骨矿化程度的改变。

[0032] 组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作 HE、总胶原、碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)等组织化学染色。

[0033] 免疫组织化学染色:取骨组织的石蜡切片,作免疫组化染色,检测指标包括成骨细胞分化指标:I 型胶原(Col-I)、骨钙素(OCN);破骨细胞分化指标:核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)。

[0034] 7、全基因芯片扫描

提取小鼠长骨骨组织总 RNA,由上海康成生物工程有限公司采用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描获得芯片数据,运用 NimbleScan 软件通过 Robust Multichip Average (RMA)算法分析获得差异基因,Agilent GeneSpring GX software 分析差异基因获得表达热图。

[0035] 8、蛋白和 RNA 水平检测

Real-time RT-PCR:取骨组织提取的 RNA,作 Real-time RT-PCR 分析,观察骨形成相关基因、细胞周期相关基因、Shh信号通路相关基因表达及p130/E2F4复合物基因表达的变化,检测指标如下:

骨形成相关基因:Cbfa1、ALP、Col-I、OCN、RANKL、OPG 等

Shh 信号通路相关基因: Shh、Gli1、Gli3、Smo、Sufu、Ptch1、Bmi1 等 p130/E2F4 复合物基因: p130、E2F4 等

Western blot:取长骨组织提取的蛋白质,进行 Western blot 分析,检测指标同 RNA 部分。

[0036] 9、质粒构建与转染

根据 Refseq 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) 查询基因的全长转录本序列,通过化学合成法合成基因的全长转录本序列,并插入真核表达载体 pcDNA3.1+ 中,构建基因过表达载体;利用 Invitrogen 公司网站的 siRNA 设计软件,设计 3~5 个 siRNA 序列构建到 ShRNA 载体,经测序鉴定正确的克隆,用于下一步 RNAi 效率分析。将构好的质粒用 Qiagen Plasmid Midi Kit 中量提取,用于细胞转染。本实验均用 Lipofectamine 3000 使用转染,转染步骤按照 Lipofectamine 3000 说明书操作。设计 PCR 引物,扩增获得目的基因启动子区域片段,插入 pGL3-basic 荧光素酶表达质粒载体,按 Lipofectamine 3000 脂质体说明书将荧光素酶表达质粒及 RT-LK 质粒共转染入 MEF 细胞。将转染后的细胞置于 37°C CO₂ 培养箱中培养 48h 后收集细胞提取总 RNA 通过 Realtime RT-PCR 进行 mRNA 水平检测,提取蛋白进行 Western Blot 检测,按照 Promega 荧光素酶检测试剂盒说明进行荧光素酶检测。

[0037] 10、免疫共沉淀 (Co-IP)

1) WT 和 p27^{-/-} 饥饿处理 24 小时后,收集细胞,加入适量细胞裂解缓冲液 (含蛋白酶抑制剂),冰上裂解 30min,细胞裂解液于 4°C 最大转速离心 30 min 后取上清;

2) 取少量裂解液以备 Western blot 分析,剩余裂解液加 1 μ g 相应的抗体加入到细胞裂解液,4°C 缓慢摇晃孵育过夜;

3) 取 10 μ l protein A 琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗 3 次,每次 3,000 rpm 离心 3 min;

4) 将预处理过的 10 μ l protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中 4°C 缓慢摇晃孵育 2-4h,使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连;

5) 免疫沉淀反应后,在 4°C 以 3,000 rpm 速度离心 3 min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清小心吸去,琼脂糖珠用 1ml 裂解缓冲液洗 3-4 次;最后加入 15 μ l 的 2 \times SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 分钟;

6) 制作 SDS-PAGE,通过 Western blot 实验确定结合蛋白。

[0038] 11、染色质免疫共沉淀 (ChIP) 实验

本实验购买 Millipore Millipore 公司试剂盒,按照说明书操作。

[0039] 1) 细胞的甲醛交联与超声破碎

取出 1 平皿细胞 (10cm 平皿),加入 243 μ l 37% 甲醛,使得甲醛的终浓度为 1% (培养基共有 9ml);37 摄氏度孵育 10min;终止交联:加甘氨酸至终浓度为 0.125M。450 μ l 2.5M 甘氨酸于平皿中。混匀后,在室温下放置 5min 即可;吸尽培养基,用冰冷的 PBS 清洗细胞 2 次;细胞刮刀收集细胞于 15ml 离心管中 (PBS 依次为 5ml,3ml 和 3ml)。预冷后 2000rpm 5min 收集细胞;倒去上清。按照细胞量,加入 SDS Lysis Buffer。使得细胞终浓度为每 200 μ l 含 2 \times 10⁶ 个细胞。这样每 100 μ l 溶液含 1 \times 10⁶ 个细胞。再加入蛋白酶抑制剂复合物;超声破碎。

[0040] 2) 除杂及抗体孵育

超声破碎结束后,10,000 \times g 4°C 离心 10 min。去除不溶物质;留取 300 μ l 做实验,其余保存于 -80°C;300 μ l 中,100 μ l 加抗体做为实验组;100 μ l 不加抗体做为对照组;100 μ l 加入 4 μ l 5M NaCl (NaCl 终浓度为 0.2 M),65°C 处理 3 h 解交联,跑电泳,检测超声

破碎的效果;在 100 μ l 的超声破碎产物中,加入 900 μ l ChIP Dilution Buffer 和 20 μ l 的 50 \times PIC;再各加入 60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4 $^{\circ}$ C 颠转混匀 1h。1h 后,在 4 $^{\circ}$ C 静置 10min 沉淀,700rpm 离心1min;取上清。各留取 20 μ l 作为 Input。一管中加入 1 μ l 抗体,另一管中则不加抗体。4 $^{\circ}$ C 颠转过夜。

[0041] 3) 检验超声破碎的效果

取 100 μ l 超声破碎后产物,加入 4 μ l 5M NaCl,65 $^{\circ}$ C 处理 2h 解交联。分出一半用酚/氯仿抽提。电泳检测超声效果。

[0042] 4) 免疫复合物的沉淀及清洗

孵育过夜后,每管中加入 60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4 $^{\circ}$ C颠转 2h;4 $^{\circ}$ C 静置 10min 后,700rpm 离心 1 min。除去上清;依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗的步骤:加入溶液,在 4 $^{\circ}$ C 颠转 10min,4 $^{\circ}$ C 静置 10min沉淀,700rpm 离心 1min,除去上清;洗涤溶液:a. low salt wash buffer; b. high salt wash buffer; c. LiCl wash buffer; d. TE buffer;清洗完毕后,开始洗脱。洗脱液的配方:100 μ l 10%SDS,100 μ l 1M NaHCO₃,800 μ l ddH₂O,共 1ml;每管加入250 μ l 洗脱 buffer,室温下颠转 15min,静置离心后,收集上清。重复洗涤一次。最终的洗脱液为每管 500 μ l;解交联:每管中加入 20 μ l 5M NaCl (NaCl 终浓度为0.2M);混匀,65 $^{\circ}$ C 解交联过夜。

[0043] 5) DNA 样品的回收

解交联结束后,每管加入 1 μ l RNaseA (MBI),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;每管加入 10 μ l 0.5M EDTA,20 μ l 1M Tris.HCl (PH6.5),2 μ l 10mg/ml 蛋白酶 K;45 $^{\circ}$ C 处理 2h;DNA 片段的回收---Omega 胶回收试剂盒。最终的样品溶于 100 μ l ddH₂O;设计引物,进行定量 PCR。

[0044] 12、凝胶电泳迁移 (EMSA) 实验

1) 核蛋白提取:

细胞培养至所需状态,吸出培养基,用 2ml 冰预冷的 PBS 冲洗细胞两次;收集细胞,加入 500 μ l Buffer A,反复吹打,冰上放置 5 分钟;16000rpm,离心1 min;弃上清,加入 500 μ l Buffer B,反复吹打;1600rrpm,离心 1 min;弃上清,加入 120ml Buffer C,振荡,4 $^{\circ}$ C,30min;-80 $^{\circ}$ C,保存,用 BCA 法定量蛋白质。

2) 探针的合成

所用探针为生物素标记,均合成于上海生工生物工程有限公司。

3) DNA 与蛋白结合

此部分实验购买 Thermo Fisher EMSA 试剂盒实验。

[0047] 在冰上按照试剂盒说明书混合样品和试剂:充分混合,15-25 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟,冰上放置;每管加入 5 μ l 的上样缓冲液,混匀,离心。

4) 灌制凝胶、电泳及转膜

与 Western 方式一致,配方中不含 SDS。

5) 化学发光检测

在 Washing buffer 中洗膜 3min;在 Blocking buffer 中孵育 30min;在 Antibody solution 中孵育 30min;在 Washing buffer 中洗膜 2 次,每次 15min;在 Detection buffer 中放置 5min;显影方式与 Western blot 一致。

[0050] 13、荧光素酶报告基因检测

细胞种板:在 12 孔板中,每孔种约 40000 个 WT 和 p27^{-/-} 成纤维细胞。次日,用 Lipofectamine3000 将 500ng pGL3-Shh 和 25ng pRL-TK 共同转染到细胞中。48 小时后,将正常的换成含 0.5%胎牛血清的低血清培养液培养细胞,。24-48 小时后,用冰 PBS 洗细胞一次,每孔加入 Promega 荧光素酶检测试剂盒自带的 PLB 裂解液 (Passive Lysis Buffer) 100 μ l 室温快速振摇裂解细胞 30 分钟。收集裂解液至 1.5ml EP 管中, 13000g 室温离心 5min 后,取 80 μ l 上清液进行荧光素酶活性的检测。

[0051] 以上仅是本发明的具体应用范例,对本发明的保护范围不构成任何限制。凡采用等同变换或者等效替换而形成的技术方案,均落在本发明权利保护范围之内。

专利名称(译)	细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法		
公开(公告)号	CN108546734A	公开(公告)日	2018-09-18
申请号	CN201810202831.5	申请日	2018-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	吴军		
申请(专利权)人(译)	吴俊		
当前申请(专利权)人(译)	吴俊		
[标]发明人	吴俊 苗登顺		
发明人	吴俊 苗登顺		
IPC分类号	C12Q1/26 C12Q1/686 C12Q1/6888 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/686 C12Q1/26 C12Q1/6888 C12Q2600/158 G01N33/5005 G01N33/53 G01N33/68 C12Q2561/113 C12Q2521/107		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种细胞周期依赖性激酶抑制因子P27基因型鉴定方法，率先利用细胞分子生物学技术以及模式动物研究p27是否能够与p130/E2F4共同作用，结合到Shh基因的启动子区域，发挥转录抑制Shh的功能，抑制骨髓间充质干细胞增殖和分化，从而发挥抑制成骨细胞骨形成的作用，利用Real time RT-PCR和Western blot实验从RNA和蛋白水平对芯片数据进行了初步验证，同时验证p27能够与p130/E2F4共同作用，结合到Shh基因的启动子区域，转录抑制Shh的表达，从而发挥抑制骨髓间充质干细胞(BM-MSC)增殖和分化，抑制成骨细胞骨形成的作用。