

长链非编码 RNA AK005183 干扰载体 构建及慢病毒包装

张晓明, 安俊辉, 万 一, 胡 源, 覃金洲, 曾文先*

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为研究长链非编码 RNA AK005183 在精子发生中的功能, 设计、合成了干扰 AK005183 表达的 shRNA 序列, 并构建其干扰表达重组慢病毒载体 CD513B-U6-AK005183, 将干扰表达质粒及对照质粒分别转染 NIH3T3 细胞系, 实时定量 PCR 检测 CD513B-U6-AK005183 质粒对 AK005183 的表达具有较好的干扰效果。利用第三代慢病毒包装系统, 将 CD513B-U6-AK005183、pGag-Pol、pRsv-rev、pVSV-G 质粒共转染 293T 细胞系, 包装得到滴度为 5×10^6 TU/mL 的干扰表达重组慢病毒。用 CD513B-U6-AK005183 慢病毒转导 GC-1 spg 细胞系, 检测到 AK005183 的表达下调 64%。表明本研究成功构建并包装得到高效干扰长链非编码 RNA AK005183 表达的重组慢病毒, 将为深入研究长链非编码 RNA 在精子发生过程中的功能奠定了基础。

[关键词] 长链非编码 RNA; AK005183; 精原干细胞; RNA 干扰; 慢病毒

[中图分类号] S811.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-5228(2017)10-0015-05

精原干细胞(Spermatogonial stem cell, SSCs)是雄性动物体内唯一能将自身遗传信息传给子代的成体干细胞^[1], 是精子发生的前体细胞, 具有自我更新维持自身群体数量恒定和定向分化产生精母细胞的双重功能。目前关于精原干细胞自我更新、增殖与分化的表观遗传学调控机制尚不明确。

哺乳动物体内蛋白质编码基因的数量约占细胞内所有转录本的 2%, 剩余均为非编码 RNA。长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类核苷酸数量大于 200 bp, 与 mRNA 类似, 但缺少或仅含有很短的开放式阅读框的一类非编码 RNA。随着对 ncRNA 研究的深入, 人们发现 lncRNA 与 X 染色体失活、基因组印记、胚胎发育、细胞周期调控以及表观遗传调控有密切联系^[2-5]。而体内尚有大量的 lncRNA 的结构、功能、作用机制尚未研究清楚。

精原干细胞增殖分化是一个极其复杂的过程, 目前关于非编码 RNA 对 SSCs 增殖影响的报道非常少。有报道称 microRNA 对精原干细胞增殖分

化及精子发生有影响^[6]。长链非编码 RNA Mrhl 与细胞粘附、细胞信号转导和细胞发育及分化相关^[7]。但在精原干细胞自我更新、增殖与分化过程中有哪些长链非编码 RNA 发挥作用及其作用模式还需要进一步研究。

本研究目的是构建并制备重组慢病毒, 检测其干扰效率, 为进一步研究 AK005183 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

昆白小鼠购于第四军医大学; GC-1spg 细胞系由上海交通大学何祖平研究员所赠, 由本实验室传代冻存; DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司; 试验所用质粒为西北农林科技大学动物医学院杜恩岐副教授馈赠。

反转录试剂盒(RR047A)、荧光定量检测试剂盒(DRR820S)、Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶(EcoR I、BamH I)购于大连宝生物工程有限

* [收稿日期] 2016-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31072029, 31272439)

[作者简介] 张晓明(1988-), 男, 河南林州人, 硕士, 主要从事长链非编码 RNA 调控雄性生殖干细胞自我更新与分化的研究。
E-mail: kk0641@163.com

* [通讯作者] 曾文先(1962-), 男, 四川新都人, 教授, 主要从事猪雄性生殖细胞自我更新与分化的调控研究。

E-mail: zengwnxian@hotmail.com

公司;T4 DNA 连接酶及 Tubofect 转染试剂购于赛默飞世尔科技公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于 OMEGA 公司;RNA 提取试剂 Trizol,转染试剂 Lipofectamine 2000 Reagent 与 Opti-MEM 购于 Invitrogen 公司;引物合成于生工生物工程(上海)股份有限公司。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 qPCR primers

| 基因 Gene | 引物序列(5'-3')Primer sequence (5-3') | 扩增长度 Product length |
|----------|---|---------------------|
| Gapdh | F:AATGGATTTGGACGCATTGGT R:TTTGCACTGGTACGTGTTGAT | 213 |
| AK005183 | F:CATGGCGTCTAGTCAAACAAAG R:CATGAGCAAGCTCTTGAGTATCC | 83 |

1.2.2 RNA 提取 用 Trizol 试剂常规法抽提组织和细胞总 RNA,DEPC 水溶解沉淀,核酸蛋白分析仪(ND-1000 Spectrometer, USA)测定 RNA 浓度和纯度,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否降解。

1.2.3 反转录与实时定量 反转录反应使用 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒,按照试剂盒操作流程进行。实时定量 PCR 采用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒并按照试剂盒操作流程进行实验;每个样品均作三复管 PCR 反应。数据采用 iQ5 软件利用的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.3 AK005183 干扰载体构建与效率检测

1.3.1 shRNA 引物设计与合成 根据 AK005183 转录本的序列,利用 IDT 在线设计程序及 Oligo-Engine 软件,结合文献中提供的 RNAi 序列,共同筛选。最终确定干扰序列为:shRNA-AK006183:5'-CAACATGGCGTCTAGTCAAAC-3';阴性对照序列为 shRNA-NC:5'-GATGAAATGGGTAAGTA-CA-3'。Loop 环采用 5'-CGAA-3',尾部为 TTTTTT 的 RNA 聚合酶 III 终止信号;模板链两端分别带有 BamH I 和 EcoR I 酶切位点。

1.3.2 载体构建 用 EcoR I 和 BamH I 对 CD513B-U6 质粒进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳和切胶回收。寡核苷酸退火参照 pSilencer™ siRNA Expression Vectors 说明书进行。采用 Fermentas T4 DNA Ligase EL0014 试剂盒将 shRNA 与线性化载体连接。取 5 μL 连接产物进行转化 50 μL 感受态细胞。随后将连接产物转化感受态细胞,涂板,挑单克隆,提质粒,酶切及测序鉴定。

1.3.3 干扰载体转染 NIH3T3 细胞系 将 NIH3T3 细胞系接种到六孔板上。取 1.5 mL 离心

1.2 AK005183 在睾丸中表达检测

1.2.1 定量引物设计与合成 参照基因库提供的鼠 Gapdh(NM_008085.1)的完整序列设计引物,引物跨外显子设计;根据文献合成 AK005183 的 PCR 引物^[8],引物序列和扩增长度如表 1。

管,加入 600 μL Opti-MEM,加入 10 μL Lipofectamine 2000,吹打均匀;加入 1 μg 干扰质粒,吹打均匀,室温孵育 15 min。将六孔板中的培养基换成无抗生素的完全培养基,将加有载体和转染试剂的 Opti-MEM 滴加到六孔板中;转染 6 h 后更换为完全培养基;72 h 后提取 RNA,进行反转录,实时定量 PCR 检测 AK005183 的表达变化。

1.4 慢病毒包装与效果检测

1.4.1 慢病毒包装 将 293T 细胞接种到 25 cm² 培养瓶中,待细胞密度达到 90%左右时,准备转染。在 1.5 mL 灭菌离心管中加入 1 mL Opti-MEM,分别加入 1 μg pGag-Pol、pRev、pVSV-G 包装载体和 2 μg CD513B-U6-AK005183 载体,吹打均匀,加入 10 μL Tubofect 转染试剂,室温孵育 15 min 后逐滴加入到培养瓶中。转染 16 h 后,将培养瓶中的培养基替换为 6 mL 病毒包装缓冲液,继续培养 48 h 后,收集培养瓶中的培养基,1500 g 离心 10 min,分装到 1.5 mL 离心管中,-80℃保存。

1.4.2 滴度测定 采用倍比稀释测定慢病毒滴度,72 h 后,在荧光显微镜下观察带荧光的细胞,分别以 A 和 B 表示最后两孔带荧光的细胞数。计算公式:滴度(TU/mL)=(A+B×10)/2/A 孔中病毒液的毫升数。

2 结果与分析

2.1 AK005183 在睾丸中表达

为检测 AK005183 在小鼠睾丸中是否表达以及在发育过程中是否存在差异,分别提取了不同日龄(1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、20 d 及成年)的昆白小鼠睾丸组织总 RNA,并进行 qPCR 检测 AK005183 在这 8 个阶段中的表达。结果发现在小鼠睾丸发育过程中该转录均表达(图 1)。

2.2 成功构建 AK005183 及对对照的干扰载体

为了得到线性化的 CD513B-U6 载体,首先提取 CD513B-U6 质粒,经电泳检测发现质粒提取效果良好。然后,将 CD513B-U6 载体用 ExoR I 和

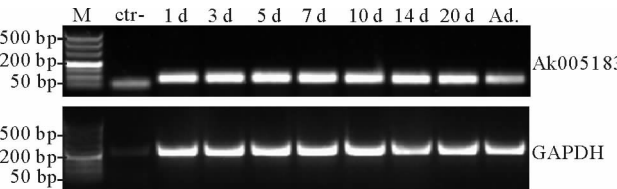


图 1 AK005183 在不同睾丸发育阶段中的表达
M. DNA marker(DL500, TaKaRa);ctr-. PCR 阴性对照;1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、20 d、Ad. 分别为以 1、3、5、7、10、14、20d 及成年小鼠睾丸组织 cDNA 为模板的 PCR 产物;上图为 AK005183 基因的 PCR 产物,下图为 GAPDH 对照

Fig.1 RT-PCR of AK005183 in mouse testis
M. DNA marker(DL500, TaKaRa); Ctr-. negative control; 1 d,3 d,5 d,7 d,10 d,14 d, 20 d, Ad. the cDNA templates of mouse testis; Up. PCR product of AK005183; Down. PCR product of GAPDH

将复性的 shRNA 双链与线性化质粒用 T4 连接酶进行连接,将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,并活化、涂板、倒置培养。第二天挑取克隆,每个培养皿挑取 3 个克隆,然后进行菌液 PCR 鉴定,并用 CD513B-U6 空载体作为阴性对照的模板。PCR 鉴定结果表明,与阴性对照相比,AK005183 和 NC 的三个克隆中,分别有两个为阳性,一个为阴性(图 3)。

并用质粒作为模板(稀释到 1 ng/ μ L)进行 PCR,送 PCR 产物进行测序。将测序结果与合成的 shRNA 序列进行比对(图 4),结果表明两个载体均构建成功。
2.3 所构建的干扰载体在 NIH3T3 细胞系上具有好的干扰效果

为了初步检测构建的 AK005183 干扰载体是否具有理想的干扰效果,将构建的质粒干扰载体转染 NIH3T3 细胞系,经过 RNA 提取,反转录 PCR 和实时定量 PCR 检测 AK005183 的表达水平,结果发

BamH I 进行双酶切,5 h 后,将酶切产物进行电泳,切胶,凝胶回收;回收到的线性化载体进行电泳检测和浓度测定(图 2)。

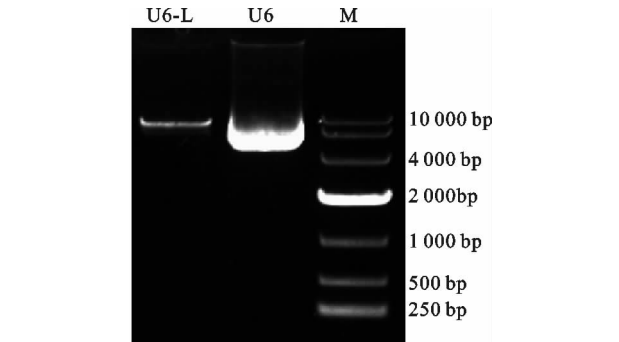


图 2 CD513B-U6 质粒双酶切前后电泳图
M. DNA marker(DL10 000, TaKaRa);U6. CD513B-U6 质粒;U6-L. CD513B-U6 双酶切后胶回收产物
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of CD513B-U6 plasmid
M. DNA marker(DL10 000, TaKaRa); U6. the CD513B-U6 plasmid; U6-L. the digested product of CD513B-U6 plasmid

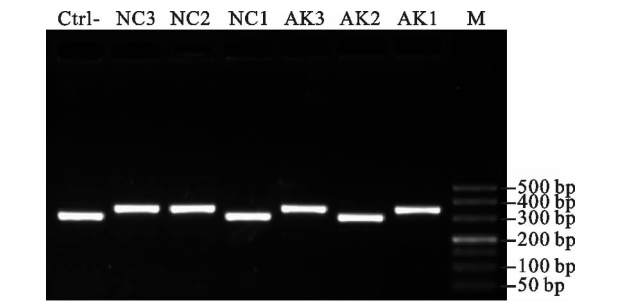


图 3 PCR 鉴定阳性克隆
M. DNA marker (DL500, TaKaRa); AK1, AK2, AK3 为 CD513B-U6-AK005183 克隆;NC1, NC2, NC3 为 CD513B-U6-NC 克隆;Ctrl-. 阴性对照

Fig.3 The identification of active clones
M. DNA marker(DL500, TaKaRa); AK1, AK2, AK3 are three different clones of CD513B-U6-AK005183; NC1, NC2, NC3 are three different clones of CD513B-U6-NC; Ctr-. the negative control

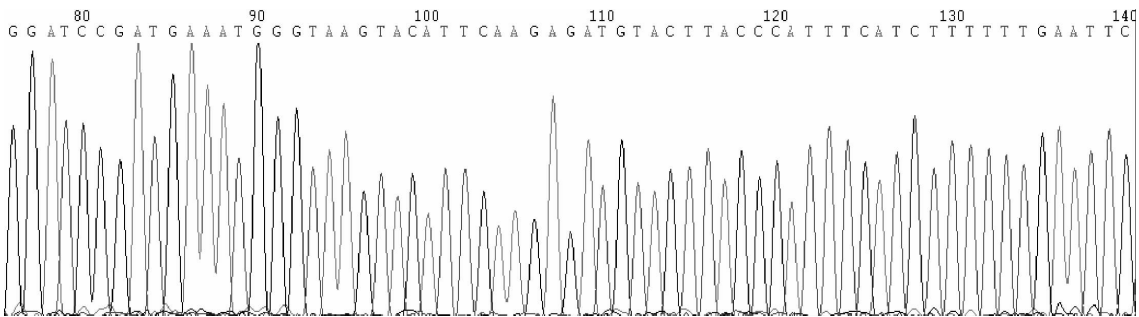


图 4 AK005183 干扰序列测序分析
Fig.4 Analysis of the sequencing result of CD513B-U6-AK005183

现所合成的 shRNA 干扰效果较良好,能够将 AK005183 转录本在 RNA 水平干扰 82%(图 5)。

2.4 慢病毒包装

利用 SBI 的第三代慢病毒包装系统,将四个质粒一起转染 293T 细胞系,进行病毒包装,16 h 后进行观察并换成病毒包装缓冲液,结果发现有 60%—70%的 293T 细胞能够自发荧光(图 6),表明转染效果良好。48 h 后收集病毒,利用倍比稀释法测定包装的两种病毒滴度,结果发现病毒滴度为 5×10^6 TU/mL。

2.5 在 GC-1 spg 细胞系中具有较好的干扰效果

为建立稳定干扰 AK005183 的细胞株,将包装好的干扰慢病毒与 NC 对照慢病毒一起转导 GC-1 spg 细胞系。72 h 后检测带 eGFP 的细胞比例,并用嘌呤霉素筛选,在传代及培养过程中,连续使用含有嘌呤霉素的完全培养基,直到荧光观察所有的细胞均带有 eGFP 标记,再开展后续实验。为检测转导慢病毒之后的细胞内 AK005183 是否被下调,通过提取处理组,NC 对照组及空白对照组的总 RNA,实时定量 PCR 检测干扰效果,结果表明,与对照组相比,处理组中 AK005183 的表达水平下调 64%(图 7)。

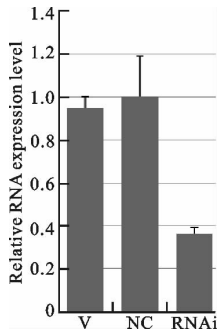


图 7 GC-1 spg 细胞系中检测 RNAi 干扰效果
RNAi. 处理组;NC、V 对照组

Fig. 7 The RNA interference efficiency of
CD513B-U6-AK005183 in GC-1 spg cell line

RNAi. GC-1 spg cell transfected by lentivirus — mediated
RNAi ; NC and V. control group

3 讨 论

目前在人和小鼠的多种组织及细胞中的长链非编码 RNA 表达谱系已经建立,如人和小鼠胚胎干细胞,人类乳腺组织,人类前列腺癌组织等。在小鼠生殖细胞中 lncRNA 的研究也有一些成果,2008 年, Lee 等利用生物信息学技术,建立了小鼠生殖细胞发育三个阶段的基因表达序列分析数据库 Germ-

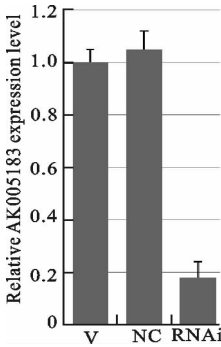


图 5 NIH3T3 细胞系中检测 RNAi 干扰效果
RNAi. 处理组;NC、V 对照组

Fig. 5 The RNA interference efficiency of
CD513B-U6-AK005183 in NIH3T3 cell line

RNAi. NIH3T3 cell transfected by CD513B-U6-AK005183
plasmid; NC and V. control group

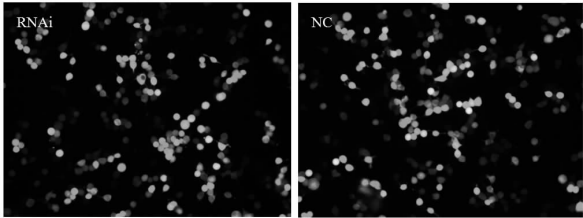


图 6 四质粒共转染 293T 细胞,16 h 后照相观察

Fig. 6 Transfection efficiency of the plasmids

RNAi. CD513B-U6-AK005183;NC. CD513B-U6-NC
SAGE^[9]。2012 年, Lee 等又利用 SAGE 数据,分析出了数千种 lncRNAs 在 A 型精原细胞,粗线期精母细胞和圆形精子细胞中的表达丰度。这些数据为进行 lncRNA 在 SSCs 上的研究提供了理论参考^[10]。

1500009L16Rik 长 1 211 bp,含有 poly A 尾,转录本包含 6 个外显子。AK005183 长 650 bp,转录本含有 6 个外显子。linc1435 是 Guttman 等命名的一个长 1893 bp 的基因间长链非编码 RNA^[8]。但这三个转录本都从第 10 号染色体 83185191-83226402 及附近区域转录;这三种转录本可能是由不同的可变剪接产生。

本研究利用 NCBI GEO 数据库中 GDNF 对精原干细胞增殖的影响的数据,分析发现非编码 RNA 转录本 1500009L16Rik 在不同条件处理下存在变化。在添加有 GDNF 的培养条件下,精原干细胞中 1500009L16Rik 转录水平高;当从培养基中撤掉 GDNF 后,精原干细胞中 1500009L16Rik 表达水平下调;再次添加 GDNF 后 4 h 观察,1500009L16Rik 的表达水平恢复到正常水平。因此,推测 1500009L16Rik 可能包含在 GDNF 信号通路内,参与 SSCs 的自我更新与增殖。

本研究首先利用 RT-PCR 检测了 AK005183 在

不同日龄小鼠中的表达,然后用 RT-qPCR 检测发现其在 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、20 d 及成年小鼠中表达差异不显著。为了便于下一步的功能研究,试验设计了 AK005183 的 shRNA 序列,并将其连接到 CD513B-U6 载体上,得到了其干扰载体,并通过转染 NIH3T3 细胞系,初步判断其能够干扰 NIH3T3 细胞系中 AK005183 的表达。之后,将其包装了慢病毒,并测定了慢病毒滴度,转导 GC-1 spg 细胞系后,RT-qPCR 检测发现能够成功干扰 AK005183 的表达。

综上所述,本研究成功构建了 AK005183 的干扰载体,包装了其慢病毒,并初步验证了其干扰效果,这为在精原干细胞上研究 AK005183 的功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Ehmecke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives[J]. Human reproduction update, 2006, 12(3): 275-282.

[2] Rinn J L, Chang H Y. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. Annual review of biochemistry, 2012, 81: 145-166.

[3] Yan B, Wang Z. Long noncoding RNA: its physiological and

pathological roles [J]. DNA and Cell Biology, 2012, 31(S1): S-34-S-41.

[4] Ponting C P, Oliver P L, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. cell, 2009, 136(4): 629-641.

[5] Hung T, Chang H Y. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms [J]. RNA biology, 2010, 7 (5): 582-585.

[6] Bouhallier F, Alloli N, Laval F , et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis [J]. RNA,2010, 16(4): 720-731.

[7] Arun G, Akhade V S, Donakonda S , et al. Mrhl RNA, a long noncoding RNA, negatively regulates wnt signaling through its protein partner Ddx5/p68 in mouse spermatogonial cells [J]. Molecular and cellular biology, 2012,32(15):3 140-3 152.

[8] Guttman M, Donaghey J, Carey B W , et al. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation [J]. Nature, 2011, 477(7364): 295-300.

[9] Lee T-L, Cheung H-H, Claus J , et al. GermSAGE: a comprehensive SAGE database for transcript discovery on male germ cell development [J]. Nucleic acids research, 2009, 37 (suppl 1): D891-D897.

[10] Lee T-L, Xiao A, Rennert O M. Identification of novel long noncoding RNA transcripts in male germ cells [J]. Methods Mol Biol,2012,825:105-114.

Construction of the Plamid Carrying Short Hairpin RNA Targeting Long Noncoding RNA AK005183

ZHANG Xiaoming, AN Junhui, WAN Yi, HU Yuan, QIN Jinzhou, ZENG Wenxian*
(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:To study the function of long noncoding RNA AK005183 in sperms, the shRNA oligonucleotide interfering AK005183 expression was designed and synthesized, and its interference expression of recombinant lentiviral vector CD513B-U6-AK005183 was constructed as well . Transfected NIH3T3 cells with interference expression plasmid to detect the interference efficiency of this shRNA on the expression of AK005183 by real time and quantitative PCR. By using the third generation lentivirus package system, the plasmids of CD513B-U6-AK005183, pGag-Pol, pRsv-rev, and pVSV-G was transfected to 293T cell lines, an interference expression of recombinant lentivirus with titer of 5×10^6 TU/mL was aquired from the package. It was detected that the expression of AK005183 declined by 64% due to the transfection of GC-1spa cells lines with lentivirus. This study successfully contructed and packaged the recombinant lentivirus which can highly and efficiently interfere with long noncoding RNA AK005183, providing a foudation for further research on function of long noncoding RNA in sperms.

Key words:long noncoding RNA; AK005183; Spermatogonial stem cells; RNA interfere; lentivirus