全基因组 siRNA 法筛选环形 RNA 的反式调控因子

Genome-wide siRNA Screen for *trans*-factors of Circular RNA Regulation

李响, 陈玲玲*

¹ 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

*通讯作者邮箱: linglingchen@sibcb.ac.cn

引用格式: 李响, 陈玲玲. (2021). 全基因组 siRNA 法筛选环形 RNA 的反式调控因子. *Bio-101* e1010820.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010820.

How to cite: Li, X. and Chen, L. L. (2021). Genome-wide siRNA Screen for *trans*-factors of Circular RNA Regulation. *Bio-101* e1010820. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010820. (in Chinese)

摘要: 环形 RNA (circular RNA, circRNA) 主要是由前体 RNA 的外显子通过反向剪接产生的共价闭合的 RNA 分子。目前关于 circRNA 的表达调控和生物学功能仍不清楚。尽管已知部分顺式原件参与了 circRNA 的生成调控, 但对于参与其中的反式因子仍知之甚少。为了全面评估与鉴定参与 circRNA 表达调控的反式因子, 我们利用商业化的全基因组 siRNA 文库, 结合生化细胞所化学生物学平台的高通量筛选平台, 进行了全基因组 siRNA 筛选, 最终鉴定到了 103 个参与 circRNA 表达调控的反式因子, 并对其中鉴定到的两个蛋白 NF90 和 NF110 进行了深入的机制与功能研究。这里, 我们将详细介绍利用全基因组 siRNA 文库筛选 circRNA 表达调控反式因子的主要流程, 包括筛选用细胞系的构建、全基因组 siRNA 文库筛选和数据分析流程。

关键词: RNAi 筛选, circRNA, 反式因子, RNA 结合蛋白

材料与试剂

1. HeLa 细胞 (ATCC, 产品目录号: CCL-2)
2. HEK293 细胞 (ATCC, 产品目录号: CRL-1573)
3. DMEM (Gibco™, 产品目录号: 11965092)
4. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco™, 产品目录号: 10270-106)
5. 0.25% Trypsin (Gibco™, 产品目录号: 27250018)
6. Penicillin streptomycin (Hyclone, 产品目录号: SV30010)

7. Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Gibco™, 产品目录号: 31985070)
8. Lipofectamine™ 3000 Reagent (Thermo, 产品目录号: 21341)
9. Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo, 产品目录号: 13778030)
10. Human ON-TARGETplus siRNA library –Genome- SMARTpool (Dharmacon)
11. doxycycline (Dox) (Clontech, 产品目录号: #631311)
12. psPAX2 (Addgene, 产品目录号: #12260)
13. pMD2.G (Addgene, 产品目录号: #12259)
14. 84 消毒液
15. Phosphate buffered saline (PBS) 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 高内涵细胞成像分析仪 Operetta (PerkinElmer, Operetta 高内涵细胞分析系统)
2. 自动化洗板机 ELx405 (BioTek, ELx405 Select Deep Well Microplate Washer)
3. 自动化分液仪 Multidrop Combi (Thermo Fisher, Multidrop Combi 自动化分液仪)
4. CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher, Heracell 150i)
5. 水平离心机 (Beckman Coulter, model: Allegra X-12R)

实验步骤

一、构建筛选用细胞系：可诱导的 circmCherry-EGFP 报告细胞系 (图 1)

图 1. 可诱导 circmCherry-EGFP 报告细胞系的构建流程。

1. 构建可诱导的 circmCherry-EGFP 报告质粒

通过分子克隆, 在 p23-phage 质粒的基础上插入可以过表达 circmCherry 和 EGFP 的序列。另外, 为了减少背景并更好的反应新生成的环形 RNA 表达量的变化, 将 CMV 启动子替换为 Dox 诱导表达的 pTET 启动子。可诱导 circmCherry-EGFP 报告质粒的具体序列见 Addgene, 产品目录号: # 92351。

2. 包装可诱导 circmCherry-EGFP 报告质粒的慢病毒

2.1 转染前 24 h 于 3.5 cm 培养皿中预铺 30%汇合度的 HEK293 细胞;

2.2 用 50 μ l Opti-MEM 稀释 4 μ l Lipofectamine 3000 并混匀; 用 50 μ l Opti-MEM 稀释 4 μ l P3000, 1 μ g pHAGE-EF1 α -IRES-mCherry, 0.75 μ g psPAX2 和 0.25 μ g pMD2.G 并混匀;

2.3 将稀释的质粒加入稀释的 Lipofectamine 3000 中, 混匀并室温静置 15 min;

2.4 将质粒-脂质体复合物逐滴、均匀地加入到细胞中;

2.5 6 h 后更换新的 DMEM 完全培养基;

2.6 分别于 24 h、48 h 收集两次病毒上清液, 病毒液经混匀后 1,000 $\times$ g 离心 5 min, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后离心浓缩并分装。

3. 在 HeLa 传代过程中, 将上述包装好的慢病毒加入 DMEM 完全培养基中, 悬浮感染 HeLa 细胞。

4. HeLa 细胞感染 4 天后, 加入 1 μ g/mL dox 诱导 circmCherry 和 EGFP 表达。诱导表达 24 小时后, 通过流式分选同时带有绿色荧光和红色荧光的 HeLa 细胞。

5. 将流式分选拿到的同时带有绿色和红色荧光的 HeLa 细胞收集, 并以每 500 个细胞接种到一个 10cm 培养皿里面, 培养箱正常培养 10 天后, 单个细胞来源的克隆长大至肉眼可见, 再将单克隆分别转移至多孔板里面单独培养扩增。后续进一步挑选带有合适绿色、红色荧光的细胞系, 即为筛选用的可诱导 circmCherry-EGFP 报告细胞系。

二、全基因组 siRNA 文库筛选 (图 2)

图 2. Human siGENOME SMARTpool siRNA library 筛选流程。

经过前期转染条件的优化, 确定最适转染条件为: 在 384 孔板中, 使用 Lipofectamine™ RNAiMAX 0.1 μ l/孔, 细胞接种密度 500 个/孔, 转染 48 h 后, 加入 1 μ g/mL dox 诱导 24 h, 然后进行荧光表型检测。

siRNA 转染的具体操作步骤如下:

1. 阴性对照组的制备:
 - 1.1 使用 1x siRNA buffer 稀释 Non-targeting Pool siRNA 至 0.1 μ M;
 - 1.2 在第二列孔中加入 Non-targeting Pool siRNA (0.1 μ M), 10 μ l/孔, 设置为阴性对照组。
2. 转染试剂的制备:
 - 2.1 用 Opti-MEM 按照体积比 1: 100 稀释 Lipofectamine™ RNAiMax;
 - 2.2 使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述转染试剂溶液加入 siRNA 板内 (第 2 列至第 23 列), 10 μ l/孔;
 - 2.3 水平离心机 100 $\times$ g 离心 1 min, 将 siRNA 与 RNAiMax 混匀
 - 2.4 室温静置 20 min。
3. 细胞悬液的制备:
 - 3.1 将可诱导的 circmCherry-EGFP 报告细胞系消化后配制成浓度为 500 个细胞/30 μ l DMEM 完全培养基的悬液。
 - 3.2 使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将上述细胞悬液加入 siRNA 板 (第 2 列至第 23 列), 30 μ l/孔;
 - 3.3 为减少边缘效应, 在 384 孔板第 1 列及第 24 列加入 50 μ l DMEM。
4. 将加好转染试剂和细胞的 384 板经水平离心机中 100 $\times$ g 离心 2 min, 放置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h。

5. 将 Dox 用 DMEM 完全培养基稀释至 6 $\mu\text{g/mL}$ 。使用自动化分液仪 Multidrop Combi 将 Dox 加入 siRNA 板 (第 1 列至第 24 列), 10 μl /孔。
6. 将加好 Dox 的 384 板经水平离心机中 100 $\times g$ 离心 2 min, 放置于 CO_2 培养箱中继续培养 24 h。

三、表型检测

1. 加入 Dox 24h 后, 使用 PBS 及自动洗板机 ELx405 清洗细胞 3 次 (抽吸 30 μl 1x PBS 并补充新的 30 μl 1x PBS, 重复 3 次), 最后将培养基置换为 1x PBS; 此步骤的目的是降低由培养基导致的成像背景信号值过高, 从而提高图像信噪比。
2. 使用 Operetta 高内涵成像分析仪对清洗后的 384 板成像 (10 倍长工作距离物镜, GFP 和 mCherry 双通道) (图 3)。
3. 利用 Harmony 软件进行图像定量分析, 分别计算各孔 GFP 和 mCherry 的平均荧光强度。

图 3. 筛选结果中代表性的 384 孔板成像图片。

结果与分析

筛选的 384 板经 Operetta 成像的结果中, 第 2 列为 Scramble 组 (阴性对照组); 第 3 列至第 22 列为 siRNA 处理组。成像数据经 Operetta 采集、自动化分析可得出量化的荧光数值, 这些数据经过合理的分析 (图 4) 得到初步的筛选结果, 具体流程如下:

图 4. 筛选结果的初步数据分析步骤及结果。

1. 利用 Scramble 组的 GFP 和 RFP 荧光值分别标准化各 siRNA 处理组的荧光值。将两次生物学重复的筛选结果值取平均，总共 18,104 个基因具有荧光值。
2. 根据 HeLa 的 RNA 二代测序结果去除初步筛选结果中不表达的基因，保留 9,249 个表达基因的荧光值。
3. 去除影响 EGFP 表达的基因，阈值设定为：0.67 < EGFP < 1.5，保留 6,876 个基因的荧光值。
4. 筛选影响 mCherry 的基因：上调的阈值设定为：mCherry > 1.5，下调的阈值设定为：mCherry < 0.67，总共筛选到 787 和 1,053 个基因分别导致红色荧光上调和下调。
5. 为了鉴定直接影响 circRNA 的反式因子，对找到的 787 和 1,053 个基因进行基因聚类分析，最终鉴定到 103 个 RNA 结合蛋白。
6. 后续利用其他方法进行单个验证。例如，通过 shRNA 敲低筛选鉴定到的 NF90 和 NF110 两个蛋白，均能发现 circmCherry 的表达量明显下调(图 5)，说明这两个蛋白对于 circRNA 的生成有促进作用，与筛选结果一致。

图 5. 筛选结果的初步验证，敲低 NF90 和 NF110 影响了 circmCherry 的表达。

溶液配方

- 1x PBS，配置后调整 pH 值为 7.2 ~ 7.4 并过滤灭菌

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
ddH ₂ O 补至 1 L	

致谢

本实验在生化细胞所化学生物学平台完成，得到化学生物学平台工作人员的大力帮助。另外本实验得到了中国科技部 (2016YFA0100701、2014CB964802)、中国科学院 (XDB19020104)、国家自然科学基金 (91440202、91540115)和霍华德·休斯医学研究所 (55008728) 的支持。此方法已被使用，相应研究成果被发表在 *Molecular Cell* (Li *et al.*, 2017)。

参考文献

1. Li, X., Liu, C. X., Xue, W., Zhang, Y., Jiang, S., Yin, Q. F., Wei, J., Yao, R. W., Yang, L. and Chen, L. L. (2017). [Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection.](#) *Mol Cell* 67(2): 214-227 e217.