全基因组 siRNA 法筛选长非编码 RNA *NEAT1* 的转录调控因子

Genome-wide siRNA Screen for Transcription Regulators of Long Noncoding RNA *NEAT1*

王洋, 陈玲玲*

作者单位: 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: 王洋, 陈玲玲. (2021). 全基因组 siRNA 法筛选长非编码 RNA *NEAT1* 的转录调控因子. // 高通量筛选实验手册. *Bio-101* e1010830. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010830.

How to cite: Wang, Y., Chen, L. L. (2021). Genome-wide siRNA Screen for Transcription Regulators of Long Noncoding RNA *NEAT1*. // High-throughput Screening Protocol eBook. *Bio-101* e1010830. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010830. (in Chinese)

摘要: 长非编码 RNA (long non coding RNA, lncRNA) 的功能与其自身表达量密切相关, 转录调控的相关研究对了解 lncRNA 的功能有重要的指导意义。经典 lncRNA *NEAT1* 的表达水平与多种生理学过程的调控相关, 包括细胞应激反应、细胞分化、黄体形成和癌症的发生发展。为了筛选 *NEAT1* 的转录调控水平, 我们构建了 *NEAT1* 内源启动子驱使转录表达 EGFP 的细胞系并结合全基因组 RNAi 筛选文库完成了 *NEAT1* 转录调控元件的筛选。这里, 我们详细介绍了如何利用全基因组 siRNA 文库筛选 lncRNA *NEAT1* 转录调控因子的主要流程, 包括筛选细胞系的构建、全基因组 siRNA 文库筛选。合理的数据分析流程可帮助获得初步的筛选结果并用于下游的验证以及相关功能预测。

关键词: RNAi 筛选, 转录调控筛选, 长非编码 RNA, *NEAT1*

研究背景:

由 *NEAT1* 组装形成的 paraspeckle 富含复杂的蛋白质和 RNA 成分, 因此 *NEAT1* 表达水平对于这些内含物的储存和转运影响了多种细胞生物学过程。如 *NEAT1* 协调增强由 pre-RNAs 内含子产生的 pri-miRNA 的加工(Jiang *et al.*, 2017); 调控一类 3'-UTR 含有反向重复序列 RNA 的出核过程 (Chen and Carmichael, 2009); *NEAT1* 表达水平与 paraspeckles 的动态变化影响细胞分化、疾病进展和部分应激反应高度相关(Hirose

et al., 2014; Imamura *et al.*, 2014; Adriaens *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018)。尽管 *NEAT1*/paraspeckle 的重要功能被陆续报道，然而 *NEAT1* 自身是如何被调控的相关研究仍相对滞后。

对于基因转录调控的筛选目前普遍使用全基因组 RNAi 文库或 CRISPR/Cas9 文库。传统的外源性的小干扰 RNA (small interference RNAs, siRNAs) 对于敲减目的基因的表达是非常有效的，全基因组 siRNA 文库可允许研究人员通过高通量的方式研究每个基因对特定细胞表型的影响。相比之下 CRISPR/Cas9 筛选过程中细胞单一性较强，文库自身的可操作性更高，使用过程也更为便捷。对于 *NEAT1* 转录调控的筛选，我们在 *NEAT1* 内源启动子后插入 EGFP 基因，构建了用荧光强度指示 *NEAT1* 表达水平的可视化系统。由于 *NEAT1* 自身的表达水平具有一定的周期性 (Torres *et al.*, 2016)，因此对 *NEAT1* 表达水平的监控和评估采以细胞群体为基础更为合理。所以这里我们采用 RNAi 文库筛选的方式对 *NEAT1* 进行转录调控的筛选。在筛选过程中，部分蛋白的敲降可能会影响细胞整体转录水平的改变或产生细胞毒性，为了避免这些蛋白产生的非特异性结果，我们利用慢病毒感染的方式在待筛选细胞中整合了由外源启动子 EF1 α 驱动表达的 mCherry 作为荧光筛选的内参。最终 *NEAT1* 表达水平的改变由 EGFP，mCherry 以及 EGFP/mCherry 三个参数进行确定。

材料与试剂

1. HeLa 细胞 (ATCC, catalog number: CCL-2)
2. HEK293 细胞 (ATCC, catalog number: CRL-1573)
3. DMEM (Gibco™, catalog number: 11965092)
4. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco™, catalog number: 10270-106)
5. 0.25% Trypsin (Gibco™, catalog number: 27250018)
6. Penicillin streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
7. Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Gibco™, catalog number: 31985070)
8. Lipofectamine™ 3000 Reagent (Thermo, catalog number: 21341)
9. Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo, catalog number: 13778030)
10. Human ON-TARGETplus siRNA library –Genome- SMARTpool (Dharmacon)
11. MISSION® esiRNA (Sigma, catalog number: EHUEGFP)

12. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) (Addgene, catalog number: #1000000034)
13. psPAX2 (Addgene, catalog number: #12260)
14. pMD2.G (Addgene, catalog number: #12259)
15. 84 消毒液
16. 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 NEAT1^G-HeLa-R (图 1)

图 1. NEAT1^G-HeLa-R 细胞系构建流程。

1. 构建靶向基因组 5'-GACCCCGGTGACGCG-3' 和 5'-AGTTGTGGCAAGTCC-3' 序列的 TALEN-NEAT1 质粒 (具体操作方法请见(Cermak *et al.*, 2011))。

2. 构建用于在 *NEAT1* 转录起始位点前插入 EGFP 报告基因的供体质粒 *NEAT1*-GFP, 其中同源臂序列分别为 chr11:65,421,968-65,422,789 和 chr11:65,422,798-65,423,623, 从 HeLa 基因组 DNA 扩增获得; 报告基因 EGFP-poly(A) 序列则是从 pEGFP-C1 质粒扩增获得。
3. 使用 Lipofectamine 3000 Reagent 转染 TALEN-*NEAT1* 和 *NEAT1*-GFP 质粒。
 - 3.1 转染前 24 h 于 3.5 cm 培养皿中预铺 30%汇合度的 HeLa 细胞;
 - 3.2 用 50 μ L Opti-MEM 稀释 3 μ L Lipofectamine 3000 并混匀; 用 50 μ L Opti-MEM 稀释 3 μ L P3000, 0.5 μ g TALEN-*NEAT1* 和 1 μ g *NEAT1*-GFP 并混匀;
 - 3.3 将稀释的质粒加入稀释的 Lipofectamine 3000 中, 混匀并室温静置 15 min;
 - 3.4 将质粒-脂质体复合物逐滴、均匀地加入到细胞中;
 - 3.5 8 - 2 h 后更换新的 DMEM 完全培养基。
4. 转染 48 h 后, 用 1 μ g/mL puromycin 筛选细胞 3 天。
5. 筛选后的细胞以单克隆形式培养, 后续挑选带有合适绿色荧光的细胞系进行基因型鉴定获得 NEAT1^G-HeLa。
6. 包装 pHAGE-EF1 α -IRES-mCherry 病毒。
 - 6.1 转染前 24 h 于 3.5 cm 培养皿中预铺 30%汇合度的 HEK293 细胞;
 - 6.2 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;
 - 6.3 将稀释的质粒加入稀释的 Lipofectamine 3000 中, 混匀并室温静置 15 min;
 - 6.4 将质粒-脂质体复合物逐滴、均匀地加入到细胞中;
 - 6.5 6 h 后更换新的 DMEM 完全培养基;
 - 6.6 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 0.45 μ m 滤膜过滤后分装。
7. 在 NEAT1^G-HeLa 传代过程中, 按体积比 1:1 混合 DMEM 完全培养基和病毒液, 悬浮感染细胞。
8. 将感染后的细胞以单克隆形式培养, 后续挑选带有合适绿色、红色荧光的细胞系 NEAT1^G-HeLa-R。

二、全基因组 siRNA 文库筛选 (图 2)

图 2. Human siGENOME SMARTpool siRNA library 筛选 NEAT1^G-HeLa-R 流程。

此文库参考筛选条件为 RNAiMAX 0.1 μ L/孔, 体系 10 μ L。对于转染条件的优化, 我们这里仅作预铺细胞数目的优化。我们在 384 孔板中分别预铺 100, 200, 500, 1,000 个待筛选细胞, 并补加 1x siRNA buffer 稀释的 scramble siRNA, 10 μ L 经 Opti-MEM 按体积比 1:100 稀释的 LipofectamineTM RNAiMax, 培养 72 h。通过观察细胞的汇合度, 发现 500 个/孔的预铺条件最为理想, 在 72 h 后达到 80% ~ 90%左右。

经转染优化实验, 确定最适转染条件为: 在 384 孔板中, 使用 LipofectamineTM RNAiMAX 0.1 μ L/孔, 转染体系 10 μ L, 细胞接种密度 500 个/孔, 转染 72 h 后进行表型检测。

siRNA 转染的具体操作步骤如下:

1. 阴、阳性对照组的制备:
 - 1.1 使用 1x siRNA buffer 分别稀释 scramble siRNA 及 esiEGFP 至 0.1 μ M;
 - 1.2 在 H2, I2, J2 孔中加入 10 μ L esiEGFP 稀释液 (0.1 μ M), 设置为 NEAT1-EGFP 荧光信号减弱的阳性对照; 在第二列其它孔中加入 scramble siRNA (0.1 μ M), 设置为对照组。
2. 转染试剂的制备:
 - 2.1 用 Opti-MEM 按照体积比 1:100 稀释 LipofectamineTM 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 NEAT1^G-HeLa-R 细胞配制成浓度为 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 PBS 或 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 72 h。

三、表型检测

1. 转染 72 h 后，使用 PBS 及自动洗板机 ELx405 清洗细胞 3 次 (抽吸 30 μ L 1x PBS 并补充新的 30 μ L 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)。
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。

结果与分析

用于 NEAT1^G-HeLa-R 筛选的 384 板经 Operetta 成像的结果代表图如图 3 所示 (红色荧光图未展示，第 1、23、24 列非实验组未展示)。第 2 列中 H2-J2 为 esiEGFP 处理组 (阳性对照组)，其它为 Scramble 组 (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 3. NEAT1^G-HeLa-R 筛选结果绿色荧光通道代表图及各孔信息。

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。
2. 上调的调控因子阈值设定为: GFP < 0.8 & mCherry > 0.8 & GFP/mCherry < 0.75。
3. 下调的调控因子阈值设定为: GFP > 1.2 & mCherry < 1.2 & GFP/mCherry > 0.75。
4. 合并两次重复筛选的结果, 获得 107 个上调因子和 215 个下调因子的初步筛选结果。
5. 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, 获得 63 个上调因子和 108 个下调因子。
6. 后续进行复筛或其他方法进行验证。

溶液配方

1. 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

感谢中科院生化与细胞所化学生物学平台对本实验方法的帮助和技术支持。本实验方法得到中国科技部 (2016YFA0100701)、中国科学院 (XDB19020104)、国家自然科学基金 (31725009、31730111、91440202) 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 *Nature Cell Biology* (Wang *et al.*, 2018)。

参考文献

1. Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J., Latil, M., Verfaillie, A., Kalev, P., Boeckx, B., Wijnhoven, P. W., Radaelli, E., Vermi, W. *et al.* (2016). [p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity.](#) *Nat Med* 22(8): 861-868.
2. Chen, L. L. and Carmichael, G. G. (2009). [Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA.](#) *Mol Cell* 35(4): 467-478.
3. Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. (2011). [Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.](#) *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.
4. Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Sato, H., Yoneda, M., *et al.* (2014). [Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli.](#) *Mol Cell* 53(3): 393-406.
5. Jiang, L., Shao, C., Wu, Q.J., Chen, G., Zhou, J., Yang, B., Li, H., Gou, L.T., Zhang, Y., Wang, Y., *et al.* (2017). [NEAT1 scaffolds RNA-binding proteins and the Microprocessor to globally enhance pri-miRNA processing.](#) *Nat Struct Mol Biol* 24(10): 816-824.

6. Torres, M., Becquet, D., Blanchard, M.P., Guillen, S., Boyer, B., Moreno, M., Franc, J.L., and Francois-Bellan, A.M. (2016). [Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements](#). *Elife* 5.
7. Wang, Y., Hu, S. B., Wang, M. R., Yao, R. W., Wu, D., Yang, L. and Chen, L. L. (2018). [Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria](#). *Nat Cell Biol* 20(10): 1145-1158.