

小鼠大脑皮层层次特异表达基因天然 反义转录物的筛选与鉴定

李 萍, 张 靖, 李爱花, 王 珊, 谈小超, 阴 彬, 彭小忠

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

通信作者: 彭小忠 电话: 010-65295945, 电子邮件: peng_xiaozhong@163.com

摘要: **目的** 筛选并鉴定小鼠大脑皮层发育过程中皮层层次特异表达的基因是否存在天然反义转录物 (NAT)。**方法** 对 63 个小鼠大脑皮层层次特异表达的基因进行生物信息学预测, 筛选出 31 个可能存在 NAT 的基因, 从小鼠脑组织及神经系统来源的细胞系提取总 RNA, 采用 RT-PCR 方法对筛选阳性基因进行鉴定并克隆到 pGEM-T 载体中进行测序。**结果** 31 个经生物信息学预测的基因中, 8 个为 NAT 阳性。**结论** 小鼠大脑皮层发育过程中皮层层次特异表达的基因存在 NAT, NAT 可能通过调控编码基因影响小鼠皮层发育。

关键词: 天然反义转录物; 小鼠大脑皮层; 筛选; 鉴定

中图分类号: R739.41 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2011)06-0620-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.06.007

Screening and Identification of Natural Antisense Transcript in Mouse Cerebral Cortex

LI Ping, ZHANG Jing, LI Ai-hua, WANG Shan, TAN Xiao-chao,
YIN Bin, PENG Xiao-zhong

National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: PENG Xiao-zhong Tel: 010-65295945, E-mail: peng_xiaozhong@163.com

ABSTRACT: Objective To screen and identify the possible existence of natural antisense transcript (NAT) within the mouse neocortex. **Methods** Sixty-three cerebral cortex layer-specific genes were screened by bioinformatics prediction in mice, among which 31 mice with potential NATs were screened. NAT was identified using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and then cloned in pGEM-T Vector System for sequencing. **Results** Among 31 genes predicted using bioinformatics, 8 were proved to be NAT positive by RT-PCR. **Conclusions** NATs exist in the mouse neocortex tissue during the development of cerebral cortex. NATs may influence mouse cortical development by regulating the related coding genes.

Key words: natural antisense transcript; mouse cerebral cortex; screening; identification

Acta Acad Med Sin, 2011, 33(6):620-623

NAT 由蛋白编码基因的反义链转录产生, 属于一类新的长非编码 RNA, 其中少数可以编码蛋白, 根据其编码方式可分为两种: (1) 顺式 NAT (cis-NAT): 与其对应编码基因来源于相同的基因组位点,

由编码有义转录物的相对链所编码,与靶基因的序列完全互补;(2)反式 NAT (trans-NAT):与编码基因来源于不同的基因组位点,与有义转录物只是部分互补^[1]。NAT 与对应的正义 RNA (sense RNA) 通过碱基互补配对,形成正义-反义转录物 (sense-antisense transcript, SAT),影响靶 mRNA 的稳定性或翻译^[2]。1976 年,Barrell 等^[3]在病毒中首次发现 NAT 的存在,此后越来越多有功能的 NAT 被发现在转录及转录后水平对其对应的 sense RNA 发挥调控作用。Emx2 为中枢神经系统表达的转录因子,可对大脑皮层发育中神经细胞的分化、迁移和神经前体细胞增殖等发挥重要的调控作用。Spigoni 等^[4]通过 RT-PCR 和原位杂交等技术发现,神经元前体细胞中 Emx2OS-ncRNA 对 Emx2 进行转录后下调,而敲除 Emx2 基因后 Emx2OS-ncRNA 转录水平降低,说明 Emx2 及其 NAT 之间存在相互调控,并可能间接影响神经系统发育。本研究以小鼠大脑皮层特异表达基因为研究对象,筛选并鉴定了其 NAT。

材料和方法

材料 pGEM-T 载体、质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂盒购自日本 Takara 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,T4 DNA 连接酶,RQ1 RNase-Free DNase 购自美国 Promega 公司。E12.5 的胎鼠及成年小鼠品系均为 ICR,所用细胞系为小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)和 NIH 小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)均购自美国 ATCC 公司。

细胞培养 将 NIH3T3 与 MEF 细胞系置于含 10% 胎牛血清(体积分数)+100 U/ml 青霉素+100 U/c

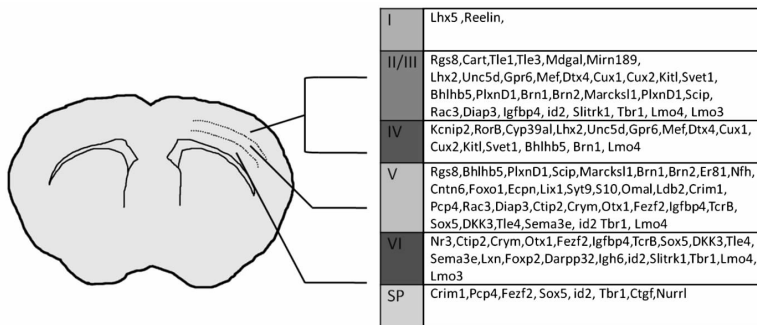
链霉素的 DMEM 完全培养基中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

细胞与组织 RNA 的提取及去 DNA 处理 对于贴壁生长的细胞,先用 PBS 洗细胞 1~2 次,然后按照每 (5~10) × 10⁶ 个细胞:1 ml Trizol 的比例直接将 Trizol 加入到细胞培养皿中;取新鲜鼠脑组织在液氮中研磨,制成 1 mg 组织:1 ml Trizol 的比例,氯仿抽提,于 -20℃ 异丙醇沉淀过夜,75% 乙醇漂洗 2 次后,空气干燥,并加入适量 DEPC 处理过的水溶解。对提取的 RNA 进行去 DNA 处理所用的是 RNase-Free DNase,具体为每消化 10⁻³ mg RNA 用 1 个单位的 RQ1 RNase-Free,37℃ 处理 0.5 h,然后用异丙醇沉淀过夜,纯化 RNA 样品。

候选基因的选择和引物设计 选择在皮层的一层或几层特异表达或者对皮层发育产生重要影响的 63 种基因(图 1),在北大生物信息学网站 <http://natsdb.cbi.pku.edu.cn/> 进行初筛,筛选出 31 个 NAT 阳性的基因,由于引物设计等原因本研究实际的扩增长度要小于转录本的长度(表 1)。

RT-PCR 本实验的总 RNA 来源分别是成年鼠脑组织,12.5 d 胎鼠脑组织、MEF、NIH373,提取总 RNA 后,用链特异性引物(G)及随机引物(R)分别做逆转录并进行 PCR 反应,所用逆转录的引物均为 PCR 的下游引物。阴性对照的 PCR 体系中未加模板。

克隆测序 31 个逆转录产物都进行 PCR 检测,将得到的特异条带进行切胶回收,用 DNA 纯化试剂盒纯化,将纯化的 DNA 产物连接到 pGEM-T 载体,连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,挑选阳性克隆,送美国 Invitrogen 公司测序部进行测序,与原始序列比对一致的基因判定为 NAT 阳性基因。



I~VI: 小鼠大脑新皮层第 1 层到第 6 层; SP: 皮层下板

I-VI: layer I-VI of mouse neocortex; SP: subplate

图 1 选取的小鼠大脑皮层发育过程中特异层次表达的 63 个候选基因

Fig 1 Sixty three candidate genes in the specific layers of the cortex during its development

表 1 生物信息学预测出的 31 个可能存在 NAT 的皮层发育相关基因

Table 1 Thirty one layer-specific genes were predicted to have potential NATs by bioinformatics method

| 基因名称代码 Gene accession number | NAT 代码序列长度 NAT accession number length | 扩增长度 Amplification (bp) | 基因名称代码 Gene accession number | NAT 代码序列长度 NAT accession number length | 扩增长度 Amplification (bp) |
|---------------------------------|---|----------------------------|---------------------------------|---|----------------------------|
| <u>Tle1</u> NM011599 | BB404312 320 bp | 275 | <u>Nurr1</u> NM_013613 | DT926528 755 bp | 457 |
| <u>Reelin</u> NM_011261 | AK133143 1797 bp | 521 | <u>Marcks11</u> NM_010807 | BE99174 382bp | 351 |
| <u>Bmi1</u> NM_008900 | BY374466 334 bp | 316 | <u>Ecpn</u> NM_010098 | BB243315 207 bp | 207 |
| <u>Id2</u> NM_010496 | BQ031857 321 bp | 286 | <u>Lix1</u> NM_025934 | AA597292 430 bp | 428 |
| <u>Foxo1</u> NM_019739 | BY751999 689 bp | 541 | <u>Ldb2</u> NM_010698 | BI133120 173 bp | 164 |
| <u>Er81</u> NM_007960 | A1850534 463 bp | 305 | <u>Diap3</u> AK220493 | BC229709 299 bp | 294 |
| <u>Sox5</u> NM_011444 | AK016816 1586 bp | 548 | <u>DKK3</u> NM_015814 | BY688908 492 bp | 450 |
| <u>Tbr1</u> NM_009322 | AK132631 1404 bp | 716 | <u>Tle4</u> NM_011600 | BE655681 527 bp | 526 |
| <u>Rgs8</u> NM_026380 | BB653666 714 bp | 481 | <u>Lxn</u> NM_138591 | BB017785 239 bp | 194 |
| <u>Tle3</u> NM_009389 | BC029767 1823 bp | 597 | <u>Darpp32</u> NM_144828 | AK005627 1388 bp | 544 |
| <u>Rorb</u> NM_146095 | BE950652 301 bp | 235 | <u>Slitrk1</u> AK173296 | BB807420 462 bp | 428 |
| <u>Lhx2</u> NM_010710 | CN842779 544 bp | 446 | <u>Lmo4</u> NM_010723 | BB203414 600 bp | 455 |
| <u>Unc5d</u> AK220417 | BY653458 399 bp | 356 | <u>Lmo3</u> NM_207222 | AW488442 265 bp | 227 |
| <u>Mef2c</u> NM_025282 | CF532823 583 bp | 380 | <u>Foxg1</u> NM_008241 | CJ256995 487 bp | 422 |
| <u>Cux1</u> NM_009986 | BY715779 981 bp | 453 | <u>Ctgf</u> NM_010217 | BY714156 938 bp | 438 |
| <u>Cux2</u> NM_007804 | AK133032 335 bp | 320 | | | |

NAT: 天然反义转录物

NAT: natural antisense transcript

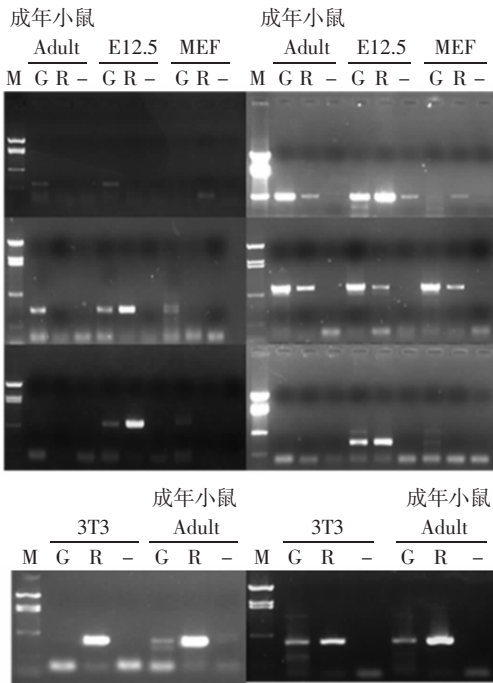
结 果

RT-PCR 验证和克隆测序结果显示, 31 个经生物信息学筛选的基因中, 有 8 个验证正确 (图 2)。

讨 论

NAT 为一种长的非编码 RNA, 是天然存在的反义 RNA 分子, 在哺乳动物基因组中大多数 NAT 不能编码蛋白。Katayama 等^[2]用 cDNA 克隆大规模测序技术分析小鼠基因组 (共 43 553 个转录元件), 发现与 cDNA 中互补链重叠且含有转录元件易于形成

NAT 的基因占全基因组的 28.7% (12 519 个)。非编码 RNA 形成了庞大的网络, 对基因的表达调控起着至关重要的作用, 对生物生长发育、疾病发生等生理过程具有广泛影响。Faghihi 等^[5]用大规模的 RNAi 技术在人类 797 个进化保守的 NAT 中筛选到 7 个对其编码基因有调控作用的 NAT。目前研究表明, long non-coding RNA 在神经干细胞命运决定、分化和表观调控中起到发挥了极其重要的作用^[6]。NAT 主要通过以下 4 种机制发挥作用: (1) 转录调控相关机制; (2) 在细胞核内的 DNA-RNA 相互作用; (3) 细胞核中 RNA-RNA 相互作用; (4) 在细胞质中的 RNA-RNA 相互作用^[7]。本研究中的候选基因几乎涵盖了所有皮层特异表达的基因^[8], 它们除了在皮层



M: PBR322-BstNI 分子标记; G: 链特异性引物; R: 随机引物; E12.5: 12.5 d 胎鼠; MEF: 小鼠胚胎成纤维细胞; 3T3: NIH 小鼠胚胎成纤维

M: PBR322-BstNI Marker; G: gene specific primer; R: random primer; E12.5: mouse embryonic day 12.5; MEF: mouse embryonic fibroblast; 3T3: NIH mouse embryonic fibroblast

图 2 在小鼠脑组织及细胞系中通过 RT-PCR 方法验证出 8 个基因存在 NAT 并且克隆测序正确

Fig 2 NATs were identified in 8 genes by RT-PCR using the mouse brain tissue and cell lines RNA as templates and confirmed by direct sequencing

特异层次表达之外, 在层次发生过程中也发挥了重要作用。例如: *Lhx* 就在皮层发育两个相对独立方面发挥作用^[9], 一方面它表达在室管膜区 (ventricular zone, VZ) 和室管膜下区 (subventricular zone, SVZ) 的前体细胞中, 另一方面也表达在上层成熟的 (有丝分裂后的) 神经元中, 提示其在前体细胞命运决定中起到决定作用, 在上层神经元分化过程中也有一定功能, 因为当敲除 *Lhx* 后所有层次的神经元均有缺失^[10-11]。本研究选取了 63 个皮层发育相关的重要基因, 经生物信息学预测出 31 个 NAT 可能为阳性的基因, 筛选阳性的比例为 49.2%, 而验证后阳性为 8 个, 验证阳性比率 25.8%。8 个重要 NAT 的发现为后续功能的研究提供了基础。为了进一步对 NAT 功能做探索, 下阶段的工作是应用 RACE, Northern blot

等技术手段观察在在体水平各个 NAT 的表达情况, 并深入探讨其分子机制。

参 考 文 献

- [1] Lapidot M, Pilpel Y. Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(12):1216-1222.
- [2] Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome [J]. *Science*, 2005, 309(5740):1564-1566.
- [3] Barrell BG, Air GM, Hutchison CA 3rd. Overlapping genes in bacteriophage phiX174 [J]. *Nature*, 1976, 264(5581):34-41.
- [4] Spigoni G, Gedressi C, Mallamaci A. Regulation of *Emx2* expression by antisense transcripts in murine cortico-cerebral precursors [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8658.
- [5] Faghihi MA, Kocerha J, Modarresi F, et al. RNAi screen indicates widespread biological function for human natural antisense transcripts [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13177.
- [6] Mercer TR, Qureshi IA, Gokhan S, et al. Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11:14.
- [7] Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9):637-643.
- [8] Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, et al. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(6):427-437.
- [9] Alvarez-Bolado G, Rosenfeld MG, Swanson LW. Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of *POU-III* homeobox gene expression, birthdates, and morphological features [J]. *J Comp Neurol*, 1995, 355(2):237-295.
- [10] Bulchand S, Grove EA, Porter FD, et al. LIM homeodomain gene *Lhx2* regulates the formation of the cortical hem [J]. *Mech Dev*, 2001, 100(2):165-175.
- [11] Monuki ES, Porter FD, Walsh CA. Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-*lhx2* pathway [J]. *Neuron*, 2001, 32(4):591-604.

(收稿日期: 2011-10-20)