

· 基础研究 ·

利用 shRNA 慢病毒高效敲降雄性小鼠睾丸基因

龚洁, 卜治文, 徐晨, 叶岚*, 谢婕*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 建立快速、高效制备小鼠睾丸基因敲降的平台。方法: 设计和构建靶向睾丸特异性表达基因 Sox30 转录本的 shRNA 表达载体 (pSliencer-GFP-shSox30) 及其对照质粒 (pSliencer-GFP-shScramble), 与慢病毒颗粒包装后通过网微注射转导至出生 24 d 小鼠睾丸生精小管管腔, 利用免疫荧光等检测慢病毒敲降鼠体内靶向基因的效率及敲降 Sox30 后对生殖细胞发育的影响。结果: 慢病毒处理敲降后, 相比对照组小鼠, shSox30 病毒敲降组小鼠睾丸组织中 Sox30 蛋白表达水平显著下调, 生精管腔中圆形精子发育阻滞在 2~3 步, VII~VIII 期生精管腔中无长型精子。结论: shRNA 慢病毒有效降低小鼠睾丸靶基因的表达水平, 在制备睾丸特定基因敲降动物模型中具有巨大优势。

[关键词] RNA 干扰; 动物模型; Sox30; 小鼠; 睾丸

[中图分类号] R394.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)06-749-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20230601

Application of shRNA-mediated lentivirus for knockdown of endogenous genes in mouse testis

GONG Jie, BU Zhiwen, XU Chen, YE Lan*, XIE Jie*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to establish an efficient and fast method for *in vivo* knockdown of endogenous genes in mouse testis. **Methods:** Lentiviral vector (pSliencer-GFP-shSox30) along with the control vector (pSliencer-GFP-shScramble) were designed and constructed. These lentiviral particles were microinjected into the mouse testis at postnatal day 24. Immunofluorescence and histological analysis was performed to evaluate the functional consequences in mouse testis upon Sox30 knockdown. **Results:** After the shSox30 lentiviral particles treatment, Sox30 protein was substantially decreased in mouse testis. Immunofluorescence of testis sections revealed that many spermatids were arrested at step 2-3. Histological examination of testis sections revealed that elongated spermatids were absent in seminiferous tubules at stage VII-VIII. **Conclusion:** The shRNA-mediated lentivirus effectively decreases the expression level of target genes in mouse testis, providing a useful platform to knockdown endogenous genes *in vivo*.

[Key words] RNAi; animal model; Sox30; mouse; testis

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(06): 749-755]

小鼠的精子发生是一个高度复杂且有序的过程, 涉及多个与精子发生相关的基因^[1-3]。不同的精子发生相关基因在不同的时间窗内准确而有序地表达是精子发生成功的必要条件。为了更好地研究这些基因在精子发生过程中发挥何种功能, 需要

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31871503, 32070843, 2022YFC2703501)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jiexie@njmu.edu.cn; lanye@njmu.edu.cn

研究者建立相关基因的基因敲除动物模型。近年来, 有研究者基于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象开发基因敲减平台, 通过构建 pSliencer-GFP-shRNA 表达载体, 并递送至小鼠睾丸内, 成功敲降目的基因的表达^[4]。

RNAi 是指小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 诱发导致的同源 mRNA 高效特异性降解, 而引起基因表达沉默的现象^[5]。siRNA 结合至 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex,

RISC)^[6-7],再释放 siRNA 的随从链从而激活 RISC。激活后的 RISC 在 siRNA 的引导链的指导下降解其同源互补的 mRNA,从而沉默特定基因的表达^[8]。shRNA (short hairpin RNA)载体在细胞核内转录为 pri-shRNA (primary shRNA),然后在双链 RNA 结合蛋白 DGCR8 和 Drosha 蛋白的加工下形成 pre-shRNA (precursor shRNA)^[9]。pre-shRNA 在 Exportin-5 等蛋白因子的协助下从细胞核转运至细胞质^[10]。细胞质中的 pre-shRNA 在 Dicer 酶等蛋白因子加工下去除其茎环结构成为 siRNA,从而启动 RNAi 过程来沉默目的基因表达^[11]。基于这一原理,有研究者设计靶向特定序列的 shRNA 敲降载体,从而诱导 RNA 特异性降解^[12]。

传统的基因敲除动物模型一般使用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术进行遗传学模型的构建^[13]。即使 CRISPR/Cas9 技术经过多年发展已经趋于成熟,但仍存在耗时较长、费用较高、不能在特定时间点敲除目的基因,以及脱靶效应等诸多问题^[14]。同时,某些基因的敲除小鼠模型存在胚胎死亡现象,常导致实验人员无法得到敲除小鼠。为了规避这些问题,需要研究者开发一个快速、特异、安全的睾丸原位基因敲减平台。近些年来,很多研究通过向睾丸递送 siRNA^[15]或反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)^[16]来完成睾丸特定基因的敲减。虽然向小鼠睾丸递送 siRNA 和 ASO 可以规避 CRISPR/Cas9 等基因技术存在的问题,但也存在着作用时间维持较短的问题^[17]。shRNA 敲降载体具有表达 shRNA 的元件,可以通过慢病毒整合到基因组上稳定表达。研究者可以向小鼠睾丸递送 shRNA 慢病毒敲降载体基因来维持稳定、长效的基因表达沉默。本研究通过构建靶向 Sox30 基因的 shRNA 慢病毒敲降载体,通过网微注射进入出生 24 d 小鼠睾丸来敲降 Sox30 基因转录本,观察 Sox30 蛋白是否可被持续敲降,及生精管腔中生殖细胞是否有发育异常现象。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所使用的小鼠均为 24 日龄 C57BL/6J (SPF

级)雄性小鼠(南京医科大学实验动物中心),本研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。Oligo(上海生工公司);限制性内切酶 *Bgl* II、*Hind* III、*Xba* I、*Xho* I、CutSmart Buffer、10×NEB Buffer3.1 (NEB 公司,美国);FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (南京 Vazyme 公司);EndoFree Mini Plasmid Kit II (TIANGEN 公司,美国);胰酶、胎牛血清、DMEM (Gibco 公司,美国);琼脂糖(上海生工公司),TRIzol (Thermo Fisher Scientific 公司,美国);RT reagent Kit (TaKaRa 公司,日本);DAPI (Sigma 公司,美国);花生凝集素(peanut agglutinin, PNA) (Vector Labs 公司,美国),EGFP 抗体、Sox30 抗体、二抗 (Abclonal 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 Oligos 退火形成双链

将公司合成的 shSox30-oligo1 和 shSox30-oligo2 用高压灭菌后的 ddH₂O 溶解。按照 4 μL oligo1、4 μL oligo2、2 μL 10×NEB buffer2、10 μL ddH₂O 配置退火体系。95 °C 水浴退火 5 min,自然冷却至室温,4 °C 保存。

1.2.2 载体线性化

空载环状的 pSilencer 载体按照 2 μg pSilencer 载体、1 μL *Xba* I 内切酶、1 μL *Xho* I 内切酶、5 μL CutSmart Buffer,再加 ddH₂O 补齐至 50 μL 体系,37 °C 水浴 3 h。将酶切后的产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳 30 min,使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的产物。空载的 pSuper 载体分两步进行酶切,先按照 2 μg pSuper 载体、1 μL *Bgl* II 内切酶、5 μL 10×NEB Buffer 3.1,加 ddH₂O 补齐至 50 μL 体系,37 °C 水浴 3 h。线性产物使用试剂盒纯化后,再按照 2 μg pSuper 线性载体、1 μL *Hind* III 内切酶、5 μL 10×NEB Buffer2.1,加 ddH₂O 补齐至 50 μL 体系,37 °C 水浴 3 h。1%琼脂糖凝胶中电泳 30 min,使用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化产物得到双酶切的线性 pSuper 产物。同样地,pSuper-shSox30 按照 pSuper 酶切体系酶切。

1.2.3 pSuper-shSox30 与 pSliencer-GFP-shSox30 的连接与鉴定

20 ng 线性 pSuper 载体、1 μL 10×T4 Buffer、1 μL

表 1 shSox30 核苷酸序列

Table 1 The oligonucleotide sequences of shSox30

基因	序列(5'→3')
shSox30-1-Oligo1	GATCCCCGCCTTCTGAGTTGATACGGTTTTCAAGAGAAACCGTATCAACTCAGAAGGCTTTTTGGAAA
shSox30-1-Oligo2	AGCTTTTCCAAAAAGCCTTCTGAGTTGATACGGTTTCTCTTGGAAAACCGTATCAACTCAGAAGGCGGG
shSox30-2-Oligo1	GATCCCCCCTTTTCAGAGACTATCCAGATTTCAAGAGAAATCTGGATAGTCTCTGAAAGTTTTGGAAA
shSox30-2-Oligo2	AGCTTTTCCAAAAACCTTTTCAGAGACTATCCAGATTTCTCTTGGAAATCTGGATAGTCTCTGAAAGGGGG

T4 DNALigase、再加双链 Oligos 补足至 10 μ L 体系, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化,涂氨苄抗性平板,挑单克隆菌落,经菌落 PCR 后初步选取阳性菌落送测序验证。测序验证成功连接的 pSuper-shSox30,酶切(同 1.2.2)回收小片段,与线性 pSilencer 按照 20 ng pSilencer、20 ng pSupersh-shSox30 小片段、1 μ L 10 \times T4 Buffer、1 μ L T4 DNA Ligase、ddH₂O 补至 10 μ L, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化,挑取单克隆菌落测序验证。

1.2.4 293T 细胞培养与转染

293T 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱常规培养,每 1~2 d 换液 1 次,当细胞密度达 70%~80% 时转染。按照 2.5 μ g 质粒、50 μ L 0.5 mmol/L CaCl₂、100 μ L 2 \times HBS,加水补齐至 200 μ L 配置转染试剂。转染后 36~48 h 收样。空白组为未转染质粒组,过表达组为单转 Sox30 过表达质粒 PRK5-HA-Sox30,对照组为 Sox30 过表达质粒 PRK5-HA-Sox30 与 shScramble 共转染,实验组为 Sox30 过表达质粒 PRK5-HA-Sox30 分别与 shSox30-1、shSox30-2 共转染。

1.2.5 RNA 提取与 RT-qPCR

细胞加入 TRIzol 试剂,冰上研磨至组织充分裂解,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清并加入 200 μ L 氯仿,剧烈摇晃后室温静置 3 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清并加入等体积的异丙醇,静置 10 min 后 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,75% 乙醇清洗沉淀后加入适量 DEPC 水溶解 RNA。通过紫外可见分光光度计检测 RNA 浓度和纯度;采用 TaKaRa 的 PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒合成 cDNA, qPCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s。

1.2.6 慢病毒包装与网微注射

病毒上清溶液在 4 $^{\circ}$ C、50 000 g 转速下离心 90 min 以获得高滴度的慢病毒。再使用高滴度的慢病毒包装 pSilencer-GFP-shSox30 敲降载体形成慢病毒敲降载体。慢病毒敲降载体与台盼蓝染液混合后使用毛细管注射进入出生 24 d 的小鼠睾丸生精小管。

1.2.7 免疫荧光检测

TBS 清洗组织切片后用 1%TBST 配制的含 10% 鸡血清的封闭液室温封闭 1 h,一抗稀释液(EGFP 抗体 1:500)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,加入二抗稀释液(PNA+绿色荧光二抗 1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBS 清洗 3 次后滴加 DAPI 封片,荧光显微镜拍片保存。

1.3 统计学方法

实验数据结果采用 GraphPad Prism7 软件分析,符合正态分布的定量数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 载体的构建

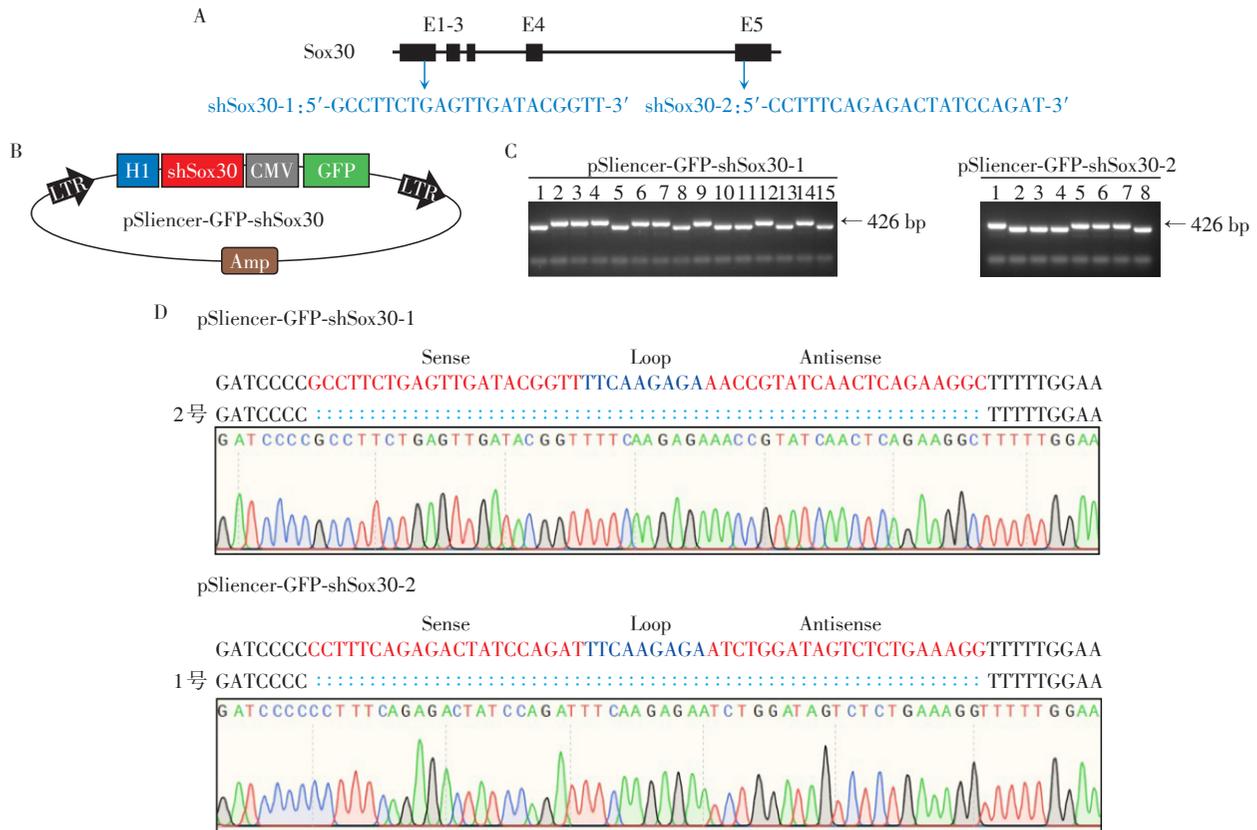
为了成功敲降小鼠睾丸内 Sox30 基因的表达,将特异性 shRNA 靶标序列分别设计在 Sox30 基因的 1 号外显子和 5 号外显子区域(图 1A)。利用同源重组方法构建 pSiencer-GFP-shSox30-1, pSiencer-GFP-shSox30-2 敲减载体和 pSiencer-GFP-shScramble 对照载体,转化进原核细胞 DH5 α 后 PCR 筛选 sense-Loop-antisense 片段插入成功的阳性单克隆菌落,通用引物 H1 和 CMV-R 进行 PCR 扩增,目的条带为 426 bp (图 1B、C)。阳性菌落提取质粒进行测序, Sense-Loop-Antisense 序列测序结果正确的 pSiencer-GFP-shSox30-1 和 pSiencer-GFP-shSox30-2 质粒用作后续敲降实验(图 1D)。

2.2 shRNA 敲降效率的验证

Sox30 是生殖细胞特异表达的转录因子,为了在体外验证两条 shRNA 的敲降效率,将构建好的 pSiencer-GFP-shScramble、pSiencer-GFP-shSox30-1 或 pSiencer-GFP-shSox30-2 重组质粒分别与 Sox30 过表达 PRK5-HA-Sox30 质粒共转入 293T 细胞中,未转染的细胞作为空白对照组。转染后继续培养 36 h 后收取细胞样品进行 RT-qPCR 和 Western blot 实验。重组质粒带有 EGFP 标签,荧光显微镜下发现 50% 以上的 293T 细胞都是 EGFP 阳性细胞(图 2A),且实验组和对照组间的阳性细胞比例差异无统计学意义(图 2B)。RT-qPCR 实验分别检测空白对照组、过表达组、对照组、实验组 1、实验组 2 中 Sox30 基因的 mRNA 水平,结果显示两组实验组的 Sox30 转录本表达量显著下降,仅为过表达组的 30%~40% (图 2C)。Western blot 结果显示两组实验组中 Sox30 蛋白表达量下降,约为过表达组的 40%~50% (图 2D)。其中实验组 2 在 Sox30 mRNA 水平和蛋白水平的敲降效率更高,用于后续睾丸组织病毒注射实验。

2.3 Sox30 敲降小鼠模型的构建及验证

根据细胞实验中 shSox30 的敲减效率结果,选取敲减效率较高的 pSiencer-GFP-shSox30-2 重组质粒用于构建小鼠敲降模型。小鼠出生后 18 d 睾丸



A: shRNA 设计模式图及序列; B: pSliencer-GFP-shSox30 慢病毒表达载体构建策略, GFP 表达由 CMV (cytomegalovirus) 启动子驱动, shSox30 表达由 H1 启动子驱动, LTR (long terminal repeats, 长末端重复序列); C: 左图为 pSliencer-GFP-shSox30-1 连接产物菌落 PCR 结果, 其中: 2、3、4、6、7、9、12、14 成功连接; 右图为 pSliencer-GFP-shSox30-2 连接产物菌落 PCR 结果, 其中: 1、5、6、7 成功连接; 箭头所指为成功连接后的目的片段; D: pSliencer-GFP-shSox30 测序结果; Sense 序列为识别靶标 mRNA 的部分, Loop 序列可以形成 shRNA 的茎环结构, Antisense 序列为 Sense 序列的互补序列。

图1 shRNA 设计模式图及载体构建

Figure 1 Schematic illustration of shRNA and the result of pSliencer-GFP-shSox30 expression constructed

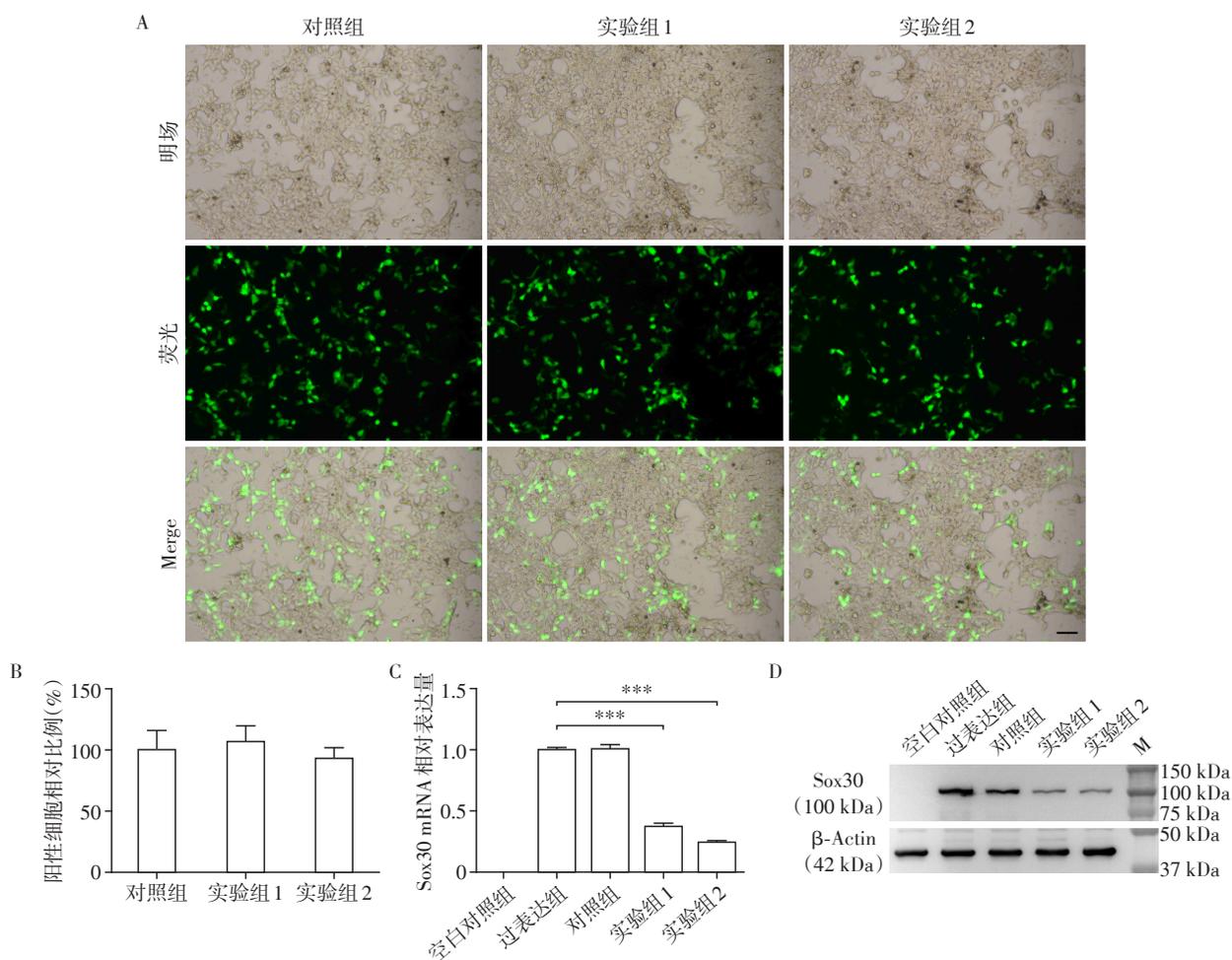
生精管腔发育至圆形精子阶段, 在第 24 天完成发育并逐步过渡至长型精子阶段。为了探究 Sox30 敲降对精子变形过程的影响, 选取出生后 24 d 的野生型雄鼠, 通过网微注射将 pSliencer-GFP-shSox30-2 重组质粒注射至小鼠生精小管中, 在重组质粒持续表达并敲降 Sox30 转录本 48 h 及 7 d 后, 收集小鼠睾丸样品。本研究中提取小鼠睾丸总蛋白和 RNA, 分别进行 RT-qPCR 和 Western blot 实验, 系统验证睾丸组织中 Sox30 在 mRNA 水平和蛋白水平的敲降效率。发现注射 48 h 后, 实验组中 Sox30 基因 mRNA 水平下降, 仅为对照组的 20%, 蛋白表达量约为对照组的一半, 注射 7 d 后, 实验组中 Sox30 基因 mRNA 水平为对照组的 60%~70%, 蛋白表达水平降低(图 3A、B)。

Sox 蛋白家族分为 A~H 亚型。Sox30 属于 Sox H 亚家族, 且为唯一成员。为了明确 shSox30 敲减系统是否存在脱靶效应, 选取与 Sox30 同源性最近的

Sox D 亚家族成员 Sox5、Sox6, 分别进行 RT-qPCR 和 Western blot 实验。同对照组相比, 注射 48 h 后, 实验组中 Sox5 和 Sox6 的 mRNA 水平无显著性差异, Sox5 和 SOX6 的蛋白水平在两组中差异无统计学意义(图 3C~E)。以上结果提示, 本研究中的敲减体系不存在脱靶效应。

2.4 Sox30 敲降小鼠生殖表型观察

选取注射后 48 h 的对照组和实验组睾丸制备组织切片, 根据 EGFP 在生殖细胞中的荧光信号明确 shRNA 感染的细胞类型。结果显示, 注射 48 h 后, 在前细线期精母细胞 (preleptotene, PL)、偶线期精母细胞 (zygotene, Zyg)、粗线期精母细胞 (pachytene, Pac)、圆形精子细胞 (round spermatid, RS)、减数第一次分裂中期细胞 (metaphase I, MI) 以及睾丸体细胞支持细胞 (sertoli, Ser) 中观察到绿色荧光信号(图 4A)。以上提示本研究中的 shRNA 敲降系统成功感染多类型生殖细胞。进一步选取注射后 7 d 的



A: 293T细胞转染后绿色荧光蛋白表达情况, 标尺为100 μm(×100); B: 对照组和实验组中荧光信号阳性细胞统计(n=3); C: shSox30干扰效率的RT-qPCR鉴定(两组比较, *** $P < 0.001$, n=3); D: shSox30干扰效率的Western blot鉴定。

图2 评估shRNA介导的基因敲降效率

Figure 2 Evaluation of shRNA mediated knock-down efficiency

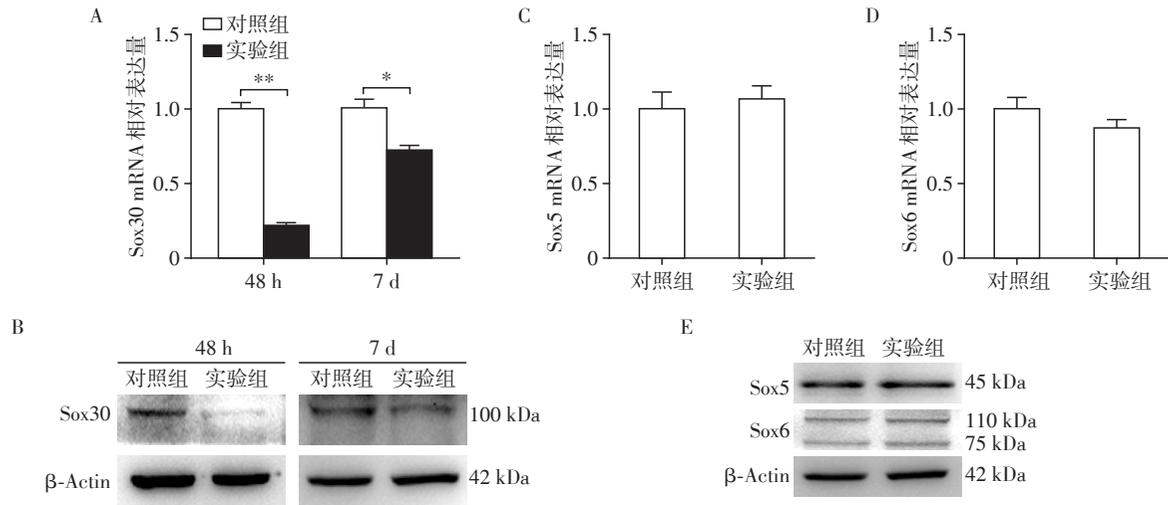
对照组和实验组睾丸制备成组织切片, 观察圆形精子发育进程。PNA可特异性识别圆形精子顶体蛋白, 根据顶体蛋白覆盖面角度可区分圆形精子的发育时期。圆形精子发育至2~3步时顶体蛋白染色呈1~2个小点, 发育至4~6步时顶体蛋白覆盖面角度逐渐延展至120°。免疫荧光结果显示, 实验组中生精管腔内圆形精子发育阻滞在2~3步, 无法正常发育至长型精子阶段(图4B)。苏木素-伊红染色结果显示, 实验组睾丸生精小管VII~VIII管腔中明显缺少长型精子(图4C)。

3 讨论

本研究特异性设计靶向Sox30基因转录本的shRNA序列, 将shRNA构建进入pSilencer载体中形成pSliencer-GFP-shSox30敲降载体。利用慢病毒包装系统形成侵染能力较强的慢病毒敲降载体, 并通

过网微注射将慢病毒敲降载体注射进出生24 d雄鼠睾丸的输出小管, 使其进入生精小管管腔。处理48 h和7 d后, 分别收集小鼠睾丸进行实验验证。本研究利用RT-qPCR、Western blot实验, 从体外和体内水平验证shRNA体系具备高效敲减效率, 且敲减效率至少可持续1周。采用PNA进行免疫荧光, 结合睾丸组织免疫组化实验, 证实了该体系成功敲降生殖细胞重要转录因子Sox30的表达, 观察到圆形精子发育阻滞在第2~3步, VII~VIII期生精管腔中无长型精子, 实验组中产生了与Sox30全敲雄性小鼠类似的生殖表型。

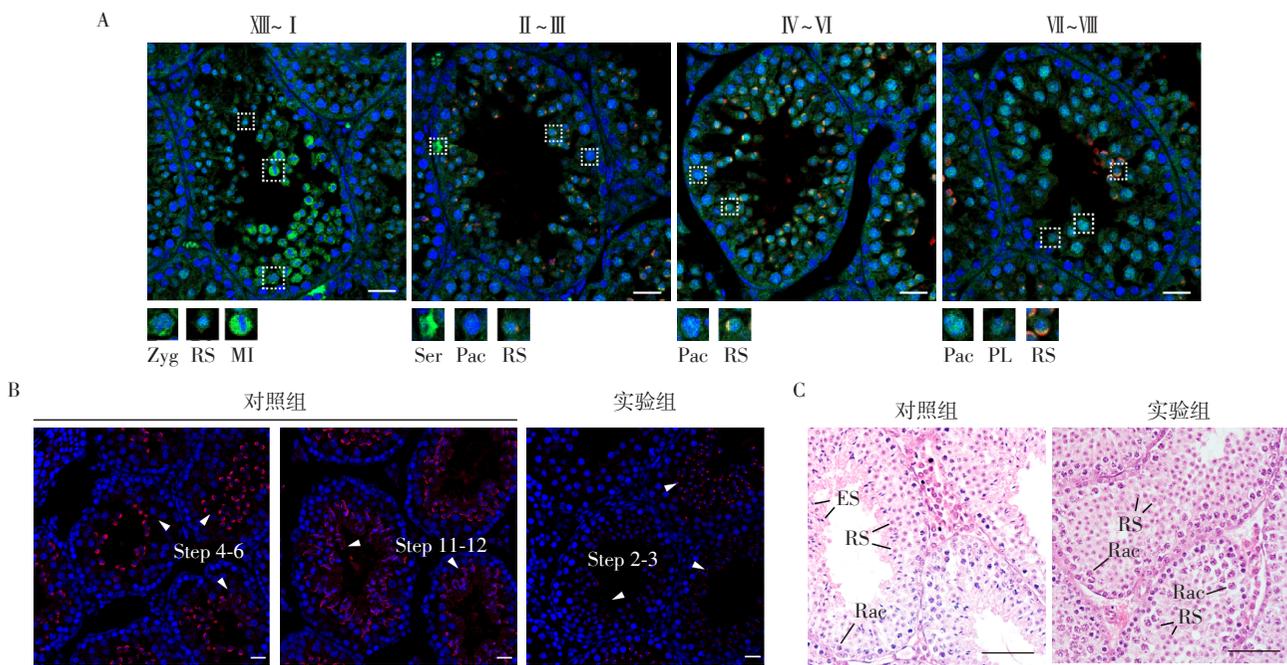
精子发生是一个连续且有序的生理过程, 涉及精原干细胞的自我更新、精母细胞的减数分裂, 以及单倍体精子的变形过程^[18-19]。某一精子发生相关基因可能在精子发生的多个阶段都发挥功能。传统的基因敲除模型可能在生精细胞发育分化的较



A: RT-qPCR 检测感染 48 h 和 7 d 后睾丸中 Sox30 mRNA 水平(两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$); B: Western blot 检测感染 48 h 和 7 d 后睾丸中 Sox30 蛋白表达水平; C、D: RT-qPCR 检测感染 48 h 后睾丸中 Sox 家族同源基因 Sox5(C)和 Sox6(D)mRNA 水平($n=3$); E: Western blot 检测感染 48 h 后睾丸中 Sox 家族同源蛋白表达水平。对照组为注射 shScramble, 实验组为注射 shSox30。

图3 Sox30 敲降小鼠睾丸 mRNA 和蛋白表达水平

Figure 3 The expression of mRNA and protein level from mouse testis treated with shSox30 lentivirus



A: 荧光显微镜观察睾丸组织中 shRNA 感染的细胞类型, 标尺为 20 μm ($\times 200$); B: PNA 染色观察圆形精子发育情况, 标尺为 20 μm ($\times 200$)。PNA 红色信号为圆形精子顶体蛋白, DAPI 蓝色信号为细胞核组份。C: 伊红-苏木素染色观察睾丸组织整体发育情况, 标尺为 20 μm ($\times 200$)。Ser 为支持细胞, PL 为前细线期精母细胞, Zyg 为偶线期精母细胞, Pac 为粗线期精母细胞, RS 为圆形精子细胞, MI 为减数第一次分裂中期细胞。对照组为注射 shScramble, 实验组为注射 shSox30。

图4 Sox30 敲降雄鼠生殖表型分析

Figure 4 Analysis of the reproductive phenotype of male mice with Sox30 knockdown

早阶段就敲除了目的基因而导致精子发生阻滞在早期阶段, 导致无法研究这一基因在精子发生晚期阶段的表型和功能。借助本平台可以根据实验需要, 在第一波生精波发生的相应时间点将慢病毒敲

降载体注射进入小鼠睾丸生精管腔中, 从而可以达到在特定时间点完成目的基因的敲降工作。传统的基因敲除模型通过 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术进行基因打靶工作, 但是此技术存在脱靶效应。同

时,基因编辑技术是在基因组层面上进行操作,基因打靶脱靶至基因组其他基因位点后可能导致不可逆的功能和表型改变。而且,脱靶后的位点很难被检测到,可能会产生实验者无法解释的实验结果。慢病毒敲降平台在基因敲降应用上具有显著优势。一方面,该平台靶向转录组 mRNA 设计 shRNA 敲降序列,即使出现脱靶效应也不会改变小鼠的基因组序列,产生可遗传的变异;另一方面,慢病毒敲降载体注射至小鼠睾丸生精小管中,仅在注射部位局部发挥敲降功能,并不会通过血睾屏障传递至全身,脱靶效应也只发生在睾丸中。虽然直接注射 siRNA 或者反义寡核苷酸也可以达到敲减基因表达的功能,但是有研究指出 siRNA 在注射后 48 h 达到最高敲降效率,此后由于无法持续表达扩增而慢慢失效。而本研究注射的是 shRNA 载体,在感染细胞后会迅速入核并在细胞核内持续表达加工形成前体 shRNA,再转位至胞质经过加工获得 siRNA,敲降持续时间较久。

本研究前期已构建 Sox30 基因全身性敲除小鼠,并系统阐述了 Sox30 全敲小鼠的睾丸表型,以及 Sox30 在精子发生过程中的作用机制。在 Sox30 全敲小鼠睾丸中,精子发生阻滞在 2~3 步的圆形精子阶段。然而 Sox30 蛋白的表达一直持续到精子变形的晚期,Sox30 全敲小鼠模型无法研究其在精子变形的中晚期是否发挥作用。因此,利用慢病毒敲降平台构建的 Sox30 敲降小鼠模型为研究 Sox30 在精子变形晚期的功能机制奠定了研究基础。

[参考文献]

- [1] CHEN Y, ZHENG Y X, GAO Y, et al. Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis [J]. *Cell Res*, 2018, 28 (9) : 879-896
- [2] ERNST C, ELING N, MARTINEZ-JIMENEZ C P, et al. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1) : 1251
- [3] GRISWOLD M D. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99 (1) : 87-100
- [4] GOU L T, KANG J Y, DAI P, et al. Ubiquitination-deficient mutations in human piwi cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis [J]. *Cell*, 2017, 169 (6) : 1090-1104
- [5] TRABER G M, YU A M. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2023, 384: 133-154
- [6] IWAKAWA H O, TOMARI Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex [J]. *Mol Cell*, 2022, 82: 30-43
- [7] ZHU K Y, PALLI S R. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference [J]. *Annu Rev Entomol*, 2020, 65: 293-311
- [8] EDWARDS S A, SLOTKIN R K. Broken up but still living together: how ARGONAUTE's retention of cleaved fragments explains its role during chromatin modification [J]. *Genes Dev*, 2023, 37: 69-71
- [9] KWON S C, JANG H, SHEN S, et al. ERH facilitates microRNA maturation through the interaction with the N-terminus of DGCR8 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 11097-11112
- [10] ZHANG X, LIU F, YANG F, et al. Selectivity of Exportin 5 binding to human precursor microRNAs [J]. *RNA Biol*, 2021, 18: 730-737
- [11] LIU Z, WANG J, CHENG H, et al. Cryo-EM structure of human dicer and its complexes with a pre-miRNA substrate [J]. *Cell*, 2018, 173: 1191-1203
- [12] LIU C, WANG J, ZHANG Y, et al. Efficient delivery of PKN3 shRNA for the treatment of breast cancer via lipid nanoparticles [J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, 69: 116884
- [13] LU J, LIU J, GUO Y, et al. CRISPR-Cas9: A method for establishing rat models of drug metabolism and pharmacokinetics [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 2973-2982
- [14] CHEN M, MAO A, XU M, et al. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges [J]. *Cancer Lett*, 2019, 447: 48-55
- [15] DAI J Q, VOLOSHIN O, POTAPOVA S, et al. Meiotic knockdown and complementation reveals essential role of RAD51 in mouse spermatogenesis [J]. *Cell Rep*, 2017, 18 (6) : 1383-1394
- [16] CHEN Z H, LING L, SHI X L, et al. Microinjection of antisense oligonucleotides into living mouse testis enables lncRNA function study [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11 (1) : 213
- [17] RAO D D, VORHIES J S, SENZER N, et al. siRNA vs. shRNA: similarities and differences [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (9) : 746-759
- [18] BAI S, FU K, YIN H, et al. Sox30 initiates transcription of haploid genes during late meiosis and spermiogenesis in mouse testes [J]. *Development*, 2018, 145 (13) : 164855
- [19] 薛江阳,高亭亭,邵彬彬,等.小鼠精原干细胞系自我更新和分化能力的体外观察 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36 (2) : 155-159

[收稿日期] 2022-11-29

(本文编辑:陈汐敏)