[文章编号] 1003－4684(2025)05-0074-05

小鼠精子特异性 *ADAM3* 基因靶向 siRNA 的筛选研究

高 斯，赵 萍，刘晓雅，方桂杰

（湖北工业大学生命科学与健康工程学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 为在细胞水平靶向筛选出小鼠精子特异性*ADAM3*基因的最适 siRNA 序列，构建*ADAM3*过表达载体，将其转染至 GC-2 细胞后，通过 Western Blot 检测*ADAM3*蛋白表达情况；同时基于*ADAM3*基因序列设计并合成 3 对 siRNA 序列，将*ADAM3*过表达载体与各 siRNA 共转染至 GC-2 细胞，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测 siRNA 干扰效率，筛选干扰效率最高的 siRNA 序列。结果显示，*ADAM3*过表达载体在 GC-2 细胞中成功表达，*ADAM3*蛋白表达显著升高；设计合成的 3 对 siRNA 均能有效干扰*ADAM3*基因的表达，与未干扰组相比差异具有统计学意义（$P<0.05$），其中*ADAM3*-siRNA-2 干扰效率最高，约 76.33%。实验成功实现了*ADAM3*基因在 GC-2 细胞中的异位表达，并在细胞水平筛选出干扰小鼠*ADAM3*基因的最适 siRNA 序列，为后续研究奠定了基础。

[关键词] 解聚素与金属蛋白酶 3；基因表达；siRNA；GC-2 细胞；干扰效率

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是现代生物学领域重要的技术突破，是由双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）介导的、特定酶参与的特异性基因沉默现象[1]。该技术在阐明生物途径、疾病相关基因分析及靶基因筛选等方面具有重要应用价值[2]。小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）是 RNAi 技术的核心因子，在发挥作用过程中，可成为 RNA 诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）的重要组成部分。RISC 通过识别靶基因对应的 mRNA，并在特定位点将其切割、降解，最终导致靶基因表达沉默，实现基因表达调控的目的[3-4]。

解聚素与金属蛋白酶 3（a disintegrin and metalloprotease 3，*ADAM3*）是一种特异性表达于睾丸组织的蛋白，参与调节精子细胞的能量代谢与蛋白生成，在减数分裂后期精子成熟过程中发挥关键作用[5]。*ADAM3*可参与精子细胞膜上多种金属蛋白酶的成熟及蛋白复合体的组装，而这些金属蛋白酶及其蛋白复合体在精子间凝集、精子在输卵管中的泳动、精子与卵母细胞透明带结合等生殖关键过程中不可或缺，因此*ADAM3*是雄性生殖的必需因子[6-7]。本实验以小鼠*ADAM3*为靶基因，旨在筛选针对该基因的最佳 siRNA 序列，为后续构建*ADAM3*基因干扰短发夹 RNA（short hairpin RNA，shRNA）载体提供实验依据，同时为精子特异性基因的细胞水平研究提供参考。

1 材料

1.1 实验材料

小鼠睾丸组织，由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所提供；小鼠精母细胞（GC-2），购自武汉普诺赛生命科技有限公司。克隆载体 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag 和红色荧光对照载体 pires2-DsRed，由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所提供。

1.2 实验试剂

DMEM 高糖培养基、0.25%胰蛋白酶、胚牛血清 FBS、Lipofectamine 3000 转染试剂、Trizol 提取试剂购自赛默飞世尔科技公司；2×PCR Mix、DNA Marker、胶回收试剂盒、反转录试剂、实时荧光定量 PCR 试剂、同源重组试剂、PAGE 凝胶制备试剂盒购自南京诺唯赞公司；SDS-PAGE 缓冲液、蛋白酶抑制剂、细胞裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、鼠抗 Flag 单克隆抗体（货号为 66008）、鼠抗 β-tubulin 单克隆抗体（货号为 10094）、HRP 标记山羊抗鼠二抗（货号为 SA00001），购自武汉三鹰公司。

[收稿日期] 2024－04－11

[第一作者] 高 斯（1994－），男，湖北潜江人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为动物基因组编辑技术。

[通信作者] 方桂杰（1974－），女，黑龙江宝清人，工学博士，湖北工业大学副教授，研究方向为生物医药。

2　方法

2.1　细胞培养

DMEM 完全培养基于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 GC-2 细胞，每隔 48 h 换液一次，细胞汇合度达到 90%左右，消化传代。

2.2　RT-PCR 鉴定*ADAM3*在 GC-2 细胞中的表达

Trizol 法分别提取 GC-2 细胞、小鼠睾丸组织总 RNA，反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板扩增 PCR 产物。PCR 扩增体系：上、下游引物各 0.5 μL，模板 1 μL，2×PCR Mix 10 μL，ddH_2O 8 μL 补齐至 20 μL。PCR 扩增程序：预变性 98℃ 45 s；变性 98℃ 10 s，退火 60℃ 30 s，延伸 72℃ 20 s，35 个循环；终延伸 72℃ 5 min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

2.3　*ADAM3*过表达载体的构建

以小鼠睾丸组织 DNA 为模板，PCR 扩增含 15 bp 同源臂的*ADAM3*CDS 区序列（扩增引物见表 1）。利用同源重组方法将*ADAM3*CDS 区序列连接在线性化 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag 空载中，构建一个能表达 *Flag* 和*ADAM3*融合蛋白的重组质粒，命名为 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag-*ADAM3*。重组质粒进行双酶切验证和测序检测。

表 1　扩增*ADAM3*CDS 区序列引物

引物名称	引物序列(5′-3′)	扩增片段/bp	退火温度/℃
HA-ADAM3	F：gatgatgacgataaaATGGATAAAGCCATGTTTGACCA R：tcagcgggtttaaacTTACTGCTGGCTGTCGTTACCG	1917	61

2.4　Western Blot 检测*ADAM3*过表达载体的表达

GC-2 细胞铺板于 12 孔板，待状态良好的细胞汇合度达到 60%时，使用 Lipofectamine 3000，将 2 μg 过表达质粒转染至 GC-2 细胞，设置 3 组重复。阴性对照组转染 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag 质粒转染，其中，技术对照组转染 pires2-DsRed，与上文一致。转染 48 h 后，收集细胞，加入细胞裂解液，4℃离心收集上清，紫外分光光度计测定上清液中总蛋白浓度，加入适量裂解液和 5×SDS-PAGE 缓冲液调整总蛋白浓度为 1 μg/μL，15 min 98℃煮蛋白，制备蛋白样品。10 μL/孔蛋白通过 10% PAGE 凝胶电泳，湿转法转膜 1.5 h，5%脱脂奶粉封闭液封闭 2 h，封闭完后一抗孵育 2 h（Flag 1∶2000 稀释、β-tubulin 1∶50 000 稀释），二抗孵育 2 h（1∶5000 稀释）；孵育完成后 ECL 显色。每组实验样品进行 3 次重复。

2.5　siRNA 的设计与合成

根据 NCBI 公布的*ADAM3*CDS 区序列，设计合成 3 对 siRNA 序列（表 2）及阴性对照 siRNA-NC。

2.6　实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 干扰效率

GC-2 细胞铺于 12 孔板中，待细胞汇合度达到 80%时，Lipofectamine 3000 共转染 1 μg 过表达质粒和 2.5 μL siRNA 储存液（20 μmol/L）于 GC-2 细胞。阴性对照组中过表达质粒与 siRNA-NC 共转染与上文一致。

表 2　小鼠 ADAM3 siRNA 靶序列

序列名称	靶序列(5′-3′)
ADAM3-sgRNA-1	GCATACGATGACGTCTACA
ADAM3-sgRNA-2	CCTGTATAAGGATCATCCT
ADAM3-sgRNA-3	GACAGTGATGTTAAACTCT

转染 24 h 后，消化收集细胞，Trizol 法提取细胞总 RNA，反转录制备 cDNA。以过表达质粒上的 *KanR* 基因作为内参基因（引物见表 3），检测 *ADAM3* mRNA 的表达。实时荧光定量 PCR 反应体系：上、下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1.5 μL，2×qPCR Master Mix 10 μL，ddH_2O 8 μL 补齐至 20 μL。反应程序设置：预变性 95℃ 30 s；变性 95℃ 10 s，退火 58℃ 30 s，共 40 个循环。熔解曲线 95℃ 15 s，58℃ 60 s，95℃ 15 s 共 1 个循环。每组样品设计三个技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法整理数据，计算各实验组 *ADAM3* mRNA 的相对表达量，得出各组 siRNA的干扰效率，筛选出干扰效率最佳的siRNA。

2.7　统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件分析处理数据。t 检验法对样本进行显著性差异分析，$P<0.05$ 认为差异显著，$P>0.05$ 认为差异不显著。

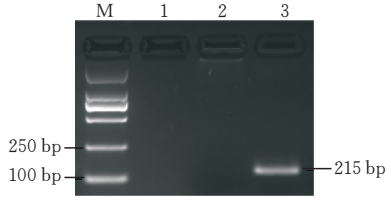
表 3　实时荧光定量 PCR 引物信息

引物名称	引物序列(5′-3′)	扩增片段大小/bp	退火温度/℃
ADAM3	F：CGCAGGAATTGCTCTGCATC R：ATGCATGTGCTTCCTGGACA	215	58
KanR	F：GCCCTGAATGAACTGCAGGA R：TTCAGTGACAACGTCGAGCA	212	58

3 结果与分析

3.1 *ADAM*3在 GC-2 细胞中的表达结果

以 GC-2 细胞的 cDNA 为模板，使用表 3 中的 *ADAM*3基因特异性引物，通过 RT-PCR 技术扩增长度为 215 bp 的目的片段。RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析，以检测 *ADAM*3基因的表达情况（图 1）。结果显示：对于以 GC-2 细胞 cDNA 为模板的实验组未检测到预期的 215 bp 目的片段，而对于以睾丸组织 cDNA 为模板的阳性对照组，可清晰检测到目的片段。上述结果表明，*ADAM*3 基因在 GC-2 细胞中不表达。

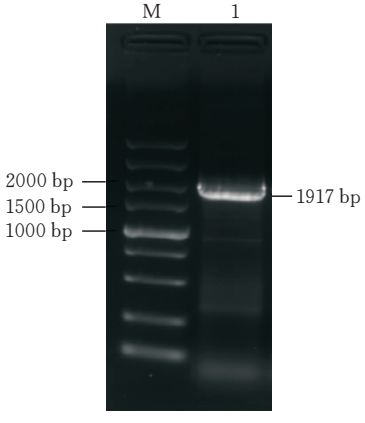


M－DL-2000 Marker；1－无模板阴性对照；
2－GC-2 细胞 cDNA 模板；3－睾丸组织 cDNA 阳性对照

图 1 *ADAM*3在 GC-2 细胞和睾丸组织中的表达鉴定结果

3.2 *ADAM*3过表达载体的构建

PCR 扩增含有 15 bp 左右同源臂的小鼠 *ADAM*3基因 CDS 区序列，PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示，PCR 扩增产物条带大小与 1917 bp 的目的片段大小一致（图 2），并对该产物进行胶回收纯化。将 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag 线性化空载与 1917 bp 的纯化产物通过同源重组反应，构建得到 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag-*ADAM*3重组质粒（图 3）及双酶切验证结果（图 4）。



M－DL-5000 Marker；
1－含 15bp 左右同源臂的*ADAM*3CDS 区序列

图 2 扩增含有 15 bp 左右同源臂 *ADAM*3 CDS 区序列结果

3.3 *ADAM*3过表达载体的表达检测

技术对照组转染 pires2-DsRed 质粒。该质粒

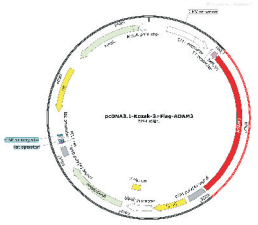
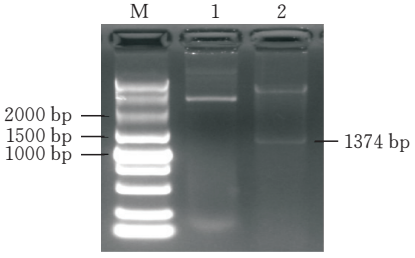


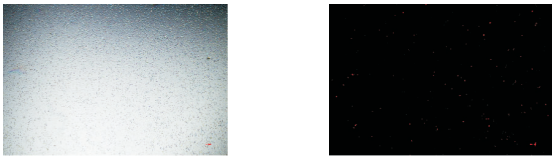
图 3 pcDNA3.1-Kozak-3×Flag-*ADAM*3重组质粒图谱



M－DL-5000 Marker；1－重组质粒；
2－双酶切重组质粒

图 4 双酶切验证重组质粒结果

发红色荧光，通过观察红色荧光的表达量来评估质粒的转染效率（图 5）。通过 Western Blot 检测过表达载体中 *ADAM*3 蛋白表达量（图 6），结果显示 *ADAM*3 过表达载体在 GC-2 细胞成功表达 *ADAM*3蛋白。



(a)转染pires2-DsRed 质粒白光观察　(b)转染pires2-DsRed 质粒荧光观察

图 5 pires2-DsRed 质粒转染效率结果（40×）

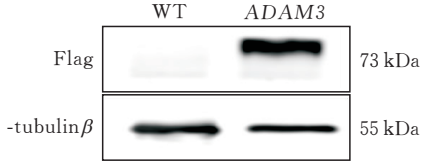


图 6 Western Blot 检测过表达载体*ADAM*3蛋白表达

3.4 最佳干扰序列 siRNA 的筛选

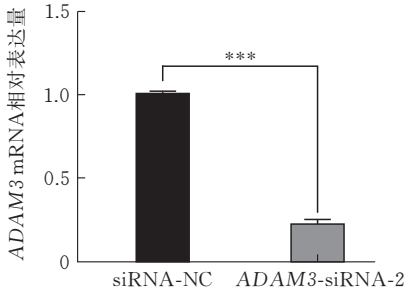
*ADAM*3过表达载体与 siRNA 共转染 GC-2 细胞 24 h 后，采用荧光定量 PCR 检测各组数据。与阴性对照组相比，各实验组 siRNA 均能干扰 *ADAM*3的表达，干扰结果都具有统计学意义（$P<0.05$），其中 *ADAM*3-siRNA-2 的干扰效率最高（表 4）。

表 4 *ADAM*3 mRNA 相对表达量及干扰效率

组别	$2^{-\Delta\Delta Ct}(\bar{x}\pm s)$	干扰效率/%	P
过表达＋NC	1±0.0.1	—	—
过表达＋siRNA-1	0.45±0.0.2	55.26	＜0.001
过表达＋siRNA-2	0.14±0.04	85.66	＜0.001
过表达＋siRNA-3	0.42±0.0.3	58.33	＜0.001

3.5　最佳干扰序列 siRNA 的验证

将筛选出的*ADAM3*-siRNA-2 重复实验，实时荧光定量 PCR 检测*ADAM3*-siRNA-2 的干扰效率。与阴性对照组相比，*ADAM3*-siRNA-2 表现出了显著的干扰效果(图 7)。结果显示，*ADAM3*-siRNA-2 的干扰效率为 76.33%。



*** 表示差异性极显著($P<0.001$)

图 7　实时荧光定量 PCR 验证 *ADAM3*-siRNA-2 的干扰效率结果

4　讨论

*ADAM3*是一种富含半胱氨酸且存在糖基化修饰的膜蛋白，其翻译后修饰需在内质网中完成[8]。该蛋白最初在圆形精子细胞中合成为分子量 110 kDa前体。当精子进入附睾后，前体被加工成 42 kDa的成熟蛋白。成熟*ADAM3*定位于获能精子的头部，且在钙离子载体 A23187 诱导的顶体反应过程中，会迅速从头部区域移除[9]。上述结果表明，*ADAM3*特异性表达于减数分裂后期的单倍体精子细胞，在体细胞中不表达。本实验为在细胞水平研究*ADAM3* 的表达干扰机制，通过扩增 *ADAM3* CDS 区序列，构建*ADAM3*过表达载体，最终成功实现了*ADAM3*的异位表达。该方法为开展 *ADAM3* 的细胞水平研究提供了思路。同时，此类功能性基因的异位表达，对深入解析基因调控机制、推动药物开发、探究个体差异及进化等领域均具有重要意义。

研究表明*ADAM3*缺失小鼠的精子发生、精子数量与正常小鼠保持一致，但*ADAM3*缺失小鼠精子在雌性生殖道中的迁移存在缺陷，无法与卵子的透明带结合，从而导致不育[10-11]。*ADAM3*缺陷小鼠的表型与人不明原因男性不育症(UMI)非常相似，这使得*ADAM3*成为研究人类男性不育症状的潜在靶点，被认为是哺乳动物生育能力质量控制的关键基因[12]。*ADAM3*作为一反映精子泳动活力的分子标志物，通过抑制该蛋白或促进该蛋白的表达，可以改良哺乳动物受孕效果[12-13]。本研究基于 RNAi 技术，化学合成 3 对 siRNA，旨在快速筛选出能有效抑制*ADAM3*表达的最适 siRNA 序列，为后续构建稳定的 shRNA 干扰载体奠定基础。同时，该研究为在小鼠个体水平上有条件地永久“敲除”靶基因表达，实现靶基因组织特异性沉默提供前期支持。此外，本研究设计合成的 3 对 siRNA 均能有效抑制靶基因的表达，但干扰效率存在差异。因此，运用合理的 siRNA 设计规则和有效的实验验证方法是筛选靶基因最适 siRNA 的必要条件。

5　结束语

本研究成功构建了*ADAM3*过表达载体，并实现了*ADAM3*基因在 GC-2 细胞中的异位表达。同时，针对*ADAM3*基因设计并合成 3 对 siRNA 序列。经筛选确定干扰效果最佳的序列为*ADAM3*-siRNA-2，其干扰效率达 76.33%，为后续构建针对*ADAM3*基因的 shRNA 干扰载体奠定了坚实的基础。此外，本研究为哺乳动物生殖领域中*ADAM3*基因的细胞水平研究提供了新思路。通过特异性抑制*ADAM3*等与精子泳动相关基因的表达，可为从遗传角度探索哺乳动物性别控制技术提供可行方案，这对于进一步研究*ADAM3*在哺乳动物遗传育种中的功能与作用机制具有重要的理论和实践意义。

[参 考 文 献]

[1] ALSHAER W, ZUREIGAT H, AL KARAKI A, et al. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 905: 174178.

[2] FRIEDRICH M, AIGNER A. Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future perspectives[J]. BioDrugs, 2022, 36(05): 549-571.

[3] BACK S, MANFREDI J J. Knockdown of target genes by siRNA In vitro[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2267: 159-163.

[4] RANASINGHE P, ADDISON M L, Dear J W, et al. Small interfering RNA: discovery, pharmacology and clinical development-an introductory review[J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(21): 2697-2720.

[5] VORONINA V A, HARRIS F M, SCHMAHL J, et al. Deletion of Adam6 in Mus musculus leads to male subfertility and deficits in sperm ascent into the oviduct [J]. Biol Reprod, 2019, 100(03): 686-696.

[6] CHO C. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization[J]. Nat Rev Urol, 2012, 9(10): 550-560.

[7] NISHIMURA H, MYLES D G, PRIMAKOFF P, et al. Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm[J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17900-17907.

[8] 张海航. 胰蛋白酶样因子 TRYX5 在小鼠精子运行到

输卵管过程中的功能研究[D].南宁:广西大学,2021.
[9] KIM E,NISHIMURA H,IWASE S,et al. Synthesis, processing,and subcellular localization of mouse ADAM3 during spermatogenesis and epididymal sperm transport[J]. J Reprod Dev,2004,50(05):571-578.
[10] YAMAGUCHI R,MURO Y,ISOTANI A,et al. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse[J]. Biol Reprod,2009,81(01):142-146.
[11] HAN C,KWON JT,PARK I,et al. Impaired sperm aggregation in Adam2 and Adam3 null mice[J]. Fertil Steril,2010,93(08):2754-2756.
[12] XIONG W,SHEN C,LI C,et al. Dissecting the PRSS37 interactome and potential mechanisms leading to ADAM3 loss in PRSS37-null sperm[J]. J Cell Sci,2021,134(10):jcs258426.
[13] 尚璇. 睾丸特异性丝氨酸蛋白酶 PRSS55 在雄性生殖中的作用及分子机制研究[D].上海:上海交通大学,2020.

Screening and Research on Sirna of Mouse Sperm-Specific *ADAM*3 Gene

GAO Si,ZHAO Ping,LIU Xiaoya,FANG Guijie
(*School of Life Science and Health Engineering*,*Hubei Univ. of Tech.*,*Wuhan* 430068,*China*)

Abstract: To screen the optimal siRNA sequence for the mouse sperm-specific *ADAM*3 gene at the cellular level,an *ADAM*3 overexpression vector was constructed,the overexpression vector was transfected into GC 2 cells and Western Blot was used to detect the expression of *ADAM*3. At the same time,three pairs of siRNA sequences were designed and synthesized based on *ADAM*3,and the *ADAM*3 overexpression vector and siRNA were co-transfected into GC 2 cells. The siRNA interference efficiency was detected by real-time fluorescence quantitative PCR,and the siRNA sequence with the highest interference efficiency was screened out. The results showed that the *ADAM*3 overexpression vector was successfully expressed in GC 2 cells,and the expression of *ADAM*3 protein increased significantly; the 3 pairs of siRNA designed and synthesized could effectively interfere with the expression of *ADAM*3,and the difference was significant compared with the non-interference group ($P<0.05$),among which ADAM3 siRNA 2 has the highest interference efficiency,with an interference efficiency of approximately 76.33%. The experiment successfully achieved the ectopic expression of *ADAM*3 in GC 2,and the optimal siRNA sequence for interfering with mouse *ADAM*3 was screened at the cellular level.

Keywords: *ADAM*3; gene expression; siRNA [责任编校:张 众]

(上接第 68 页)

A Modified Hybrid Breeding Optimization Algorithm Based on Invasive Weed Behavior

YAO Yun, YE Zhiwei
(*School of Computer Science*,*Hubei Univ. of Tech.*,*Wuhan* 430068,*China*)

Abstract: Aiming at the low convergence accuracy of the basic hybrid breeding optimization algorithm,a modified hybrid breeding optimization algorithm based on invasive weed behavior is proposed. The invasive weed renewal mechanism is introduced into the hybrid breeding optimization algorithm,which can enhance the population diversity in the early stage and accelerate the convergence to the optimal solution in the later stage. The comprehensive performance of the modified algorithm is verified by testing on benchmark test functions,and it is compared with four other heuristic algorithms and the basic hybrid breeding optimization algorithm. Experimental results show that the combination of invasive weed behavior with the basic hybrid breeding optimization algorithm makes it could balance global exploration and local exploitation. The modified algorithm improves both the searchability and the convergence speed compared with the basic hybrid breeding optimization algorithm,which can obtain the best performance on most of the benchmark test functions,and has good application potential in practical engineering and machine learning optimization problems.

Keywords: Heuristic algorithm; Hybrid breeding optimization algorithm; Invasive weed optimization algorithm; Function optimization [责任编校:闫 品]