



RNA干扰的实验方法及应用

作者:吴丹 胡兰 石娇等

期号:2007年第5期

RNA干扰(RNA interference, RNAi)就是把与内源mRNA编码区同源的长度为19~23 bp的外源双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)导入细胞中,通过一系列细胞内反应引发细胞中相应mRNA的降解,从而导致特定基因表达沉默的一种技术;是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵,抑制转座子活性及基因表达的监控机制。《Science》和美国科学促进会将RNAi技术列为2002年度最重大的十大科学成就之首,《Nature》杂志也将该项技术评为2002年度最重要的科技发现之一,并在2000~2003连续四年列入十大科技进步成果之一。首次在《Nature》上报道该现象的Andy Fire和Craig Mello也因此而获得了2006年的诺贝尔生理学或医学奖。由于RNAi可以作为一种简单、有效的代替基因敲除的遗传工具,正在功能基因组学领域掀起一场真正的革命,并将加快这个领域的研究步伐。

1 RNAi技术的发现及发展

1995年,康乃尔大学的Su Guo[1]在利用反义RNA技术特异性地抑制秀丽新小杆线虫(C.elegans)中的par-1基因的表达时,发现反义RNA的确能够阻断par-1基因的表达。但奇怪的是,注入作为对照的正义链RNA,也同样阻断了该基因的表达。对这个奇怪的现象,该研究小组一直未能给出合理解释。直至1998年2月,Andrew Fire[2]等才首次解开这个疑问:Su Guo遇到的正义链RNA抑制基因表达的现象,是由于体外转录所得RNA中污染了微量双链RNA而引起,当他们将体外转录得到的单链RNA纯化后注射线虫,基因抑制效应变得十分微弱,而经过纯化的双链RNA却正好相反,能够高效特异性地阻断相应基因的表达。该小组将这一现象称为RNAi[3, 4]。1999年,Rita A. Tuschli等在哺乳动物中发现了RNA干扰。目前RNAi现象被广泛地发现存在于真菌、水螅、锥虫、斑马鱼和哺乳动物等大多数真核生物中。

2 RNAi的基本原理

RNA干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)机制,它通过一段dsRNA导致同源mRNA降解从而使目的基因失表达。目前的研究表明RNAi过程分4步进行,其具体过程如下:①dsRNA通过细胞膜进入细胞内,在胞浆内Dicer(是RNA酶III家族中的一种序列特异性的核酸内切酶)的作用下,被分解为21~22 bp, 3'端带有2~3核苷酸末端突出的双链siRNA(短干扰RNA)分子;②siRNA与AGO2等一些酶蛋白家族成员结合,形成RNA介导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),复合物分子量大约为500 kDa,其组成成分目前还没有完全弄清楚;③这种复合物在ATP供能的情况下,将其携带的双链siRNA变成单链siRNA分子,携带了单链siRNA的RISC就变成了具有活性的RISC,这种具有活性的RISC又被称之为Slicer;④Slicer同目的mRNA分子结合,会导致目的RNA分子的断裂,这些断裂的RNA小分子在核酸酶的作用下被降解,从而导致目的基因的沉默。

在线虫和植物中的遗传学分析表明,因为有依赖RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)存在,提出了一个随机降解的PCR(random degradative PCR)模式,即RdRp以配对的siRNA为引物,以靶RNA为模板,类似PCR扩增形成dsRNA,然后由Dicer切割形成新的siRNA,进入下一步的反应。此模型可能解释了RNAi的高效性。与此相对应的是在哺乳动物和果蝇中的高效性是因为活性RISC是一种“酶”,可以催化多轮剪切反应,因此,无论是体内还是体外,少量dsRNA就能有效地抑制大量基因的表达。

3 获得siRNA的方法

通过RNAi的作用原理,我们知道在RNAi实验中真正发挥作用的是siRNA。获得 siRNA有两种途径,一个是外源性的,另一个是内源性的。外源性的包括化学合成siRNA,体外转录获得siRNA和利用Dicer或RNase消化长的dsRNA成siRNA;细胞内源性siRNA的形成包括基因组中DNA反向重复序列的转录产物、同时转录反义和正义RNA,病毒RNA复制中间体,以单链RNA为模板,由细胞或病毒的RNA依赖RNA聚合酶(RdRp)催化合成dsRNA, RNAi二元表达载体,在胞浆内Dicer的作用下,形成siRNA。

体外制备siRNA的方法分为3种。①化学合成:根据设计好的siRNA序列进行化学合成[5]。该方法制备的siRNA纯度高,合成的量不受限制,可以大规模合成,能被标记,且容易转染,但是价格较昂贵,合成周期长,不可以进行抗生素筛选,也不能用于长期筛选研究。需要大量进行研究时,可用已知有效siRNA。②体外转录获取siRNA: T7启动子和目标序列正反两条链退火合成一条DNA双链,逆转录后形成正、反两条RNA链,杂交后用RNA酶消化形成siRNA。该方法简单、成本低、速度快、毒性小、稳定性好、效率高,可以进行标记,转染效率高,但是反应规模和量始终有一定的限制,不可以进行抗生素筛选,也不能用于长期研究。花费中等,需要筛选时可制备多种siRNA[6]。③利用Dicer或RNase消化长的dsRNA获得siRNA:目标序列进行PCR扩增,逆转录合成RNA,退火后Dicer酶复合物消化成siRNA。该方法可以制成多种siRNA混合物,保证有效的目的基因沉默,可以进行标记,容易转染,但是有可能引发非特异的基因沉默,大规模合成受限,不可以进行抗生素筛选,不能用于长期研究及某一特定siRNA的研究,不能用于基因治疗。费用低,可用来快速研究单基因功能缺失表型[7]。

细胞内制备siRNA的方法分为4种。①依赖表达质粒在细胞内获取siRNA: siRNA载体依赖RNA聚合酶III启动子(polIII),操纵一段小的发夹siRNA在哺乳动物细胞中的表达,可使用人源和鼠源的U6启动子和人H1启动子, polIII可在哺乳动物细胞中表达许多的小分子RNA,并通过添加一串(3~6个)U来终止转录,该方法需要2段编码短发夹RNA序列的DNA单链,退火后再克隆到载体的polIII启动子下游。该方法因为载体可在细胞中持续抑制靶基因达数周或更久,所以可用于长期基因沉默的研究,很容易转染,可以进行抗生素筛选;有可能进行大规模合成,但是克隆周期长,表达效率低,不可以进行标记,并且工作量很大,费用中等[8]。②依赖病毒载体获得siRNA,其优势在于可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究,避免由于质粒转染效率低而带来的种种不便,而且转染效果更加稳定。这种方法最适用于已知一个有效的siRNA序列,需要维持较长时间的基因沉默;不适用于筛选siRNA序列(其实主要是需要多个克隆和测序等较为费时、繁琐的工作)。③通过PCR介导的siRNA表达试剂盒获取siRNA:基于PCR的siRNA表达框架(siRNA expression cassette, SEC),它由RNA polIII启动子、发夹结构siRNA、RNA polIII终止位点组成,制备方法为PCR,无需克隆和测序。该方法直接由PCR得到,简便、省时,但是不易转染到细胞中(晶赛公司的protocol可以解决这个问题),结果可能不理想,且不可以进行标记和抗生素筛选,大规模合成受限,不能进行长期研究,费用中等,适用于筛选siRNA序列[9]。④RNAi二元表达载体:通过RCR获得目的基因,克隆后与表达载体连接。这种方法使用的表达载体有三种形式:单一启动子,它介导反向重复序列的转录进而退火而形成;双启动子体系,就是一个基因片段从两个方向进行转录;双向启动子。这种方法的优点是可使用不同的选择性标志,通过构建可诱导的表达系统,可以在特定的时间表达dsRNA,可进行大规模筛选并且成本低。但是质粒表达的dsRNA在体细胞中能否克服dsRNA产生的非特异性反应还有待证实。

4 转染方法

4.1 磷酸钙共沉淀

将氯化钙、RNA(或DNA)和磷酸缓冲液混合,沉淀形成包含DNA且极小的不溶的磷酸钙颗粒。磷酸钙-DNA复合物粘附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质。沉淀物的大小和质量对磷酸钙转染的成功是至关重要的。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准,保证质量,因为即使偏离最优条件十万分之一的pH值都会导致磷酸钙转染失败。

4.2 电穿孔法

会员登录

用户名:

密码:

验证码: 9700

相关文章

- 鸡肝脏组织中防御素基因片段...
- 原生质体融合技术在饲料开发...
- 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴...
- 白腐真菌和黑曲霉对甘蔗渣降...
- 利用产阮假丝酵母转化无机硒...
- 利用双外流连续培养系统研究...
- 传统技术与现代分子生物学技...
- 硅藻土共固定化淀粉酶和糖化...
- 饲用酶制剂中木聚糖酶嗜学性...
- 再生红球藻规模化培养工艺的...
- 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条...

合作伙伴



电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高电场电脉冲中传导分子。将细胞悬浮液置于电场中会诱导沿细胞膜的电压差异，此差异会导致细胞膜暂时穿孔。电脉冲和场强的优化对于成功的转染非常必要，因为过高的场强和过长的电脉冲时间会不可逆地伤害细胞膜而裂解细胞。成功的电穿孔过程都伴随高水平(50%或更高)的毒性。

4.3 DEAE-葡聚糖和polybrene

带正电的DEAE-葡聚糖或polybrene多聚体复合物和带负电的DNA分子混合使得DNA可以结合在细胞表面。通过使用二甲基亚砜(DMSO)或甘油获得的渗透休克将DNA复合体导入，DEAE-葡聚糖仅限于瞬时转染。

4.4 机械法转染技术

也包括使用机械的方法，比如显微注射和基因枪(biolistic particle)。显微注射使用一根细针头将DNA、RNA或蛋白质直接转入细胞质或细胞核。基因枪使用高microprojectile将大分子导入细胞。

4.5 阳离子脂质体试剂

在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时，它可形成微小的(平均大小约100~400 nm)单层脂质体。这些脂质体带正电，可以靠静电作用结合到DNA的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面，形成DNA-阳离子脂质体复合物，容易导入培养的细胞，一个约5 kb的质粒会结合2~4个脂质体。

5 提高siRNA和表达载体转染效率的方法

为了达到高的转染效率，在转染实验过程中，需要注意以下几点。

5.1 纯化siRNA

在转染前要确认siRNA的大小和纯度。为得到高纯度的siRNA，推荐用玻璃纤维结合，洗脱或通过15%~20%丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸、小的寡核苷酸、蛋白质和盐离子。尤其是化学合成的RNA通常需要PAGE胶纯化。

5.2 避免RNA酶污染

微量的RNA酶将导致siRNA实验失败。由于实验环境中RNA酶普遍存在，如皮肤、头发及所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等，因此保证实验每个步骤不受RNA酶污染非常重要。

5.3 健康的细胞培养物和严格的操作

通常健康的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验，推荐用50代以下的转染细胞，否则细胞转染效率会随时间明显下降。

5.4 避免使用抗生素

Ambion公司推荐从细胞种植到转染后72 h期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素，有些细胞和转染试剂在siRNA转染时需要无血清的条件，这种情况下，可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验，以得到最佳转染效果。

5.5 选择合适的转染试剂

针对siRNA制备方法以及靶细胞类型的不同，选择好的转染试剂和优化的操作对siRNA实验的成功至关重要。

5.6 通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对于大多数细胞，管家基因是较好的阳性对照。将不同浓度阳性对照的siRNA转入靶细胞，转染48 h后统计对照蛋白质或mRNA相对于未转染细胞的降低水平。过多的siRNA将导致细胞毒性以至死亡。

5.7 通过标记siRNA来优化实验

荧光标记的siRNA能用来分析siRNA稳定性和转染效率。标记的siRNA还可用作siRNA胞内定位及双标记实验(配合标记抗体)来追踪转染过程中导入了siRNA的细胞，将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。

6 siRNA干扰效果的检测方法

6.1 核酸水平

可以运用荧光定量PCR方法检测目的基因或者病毒全长是否转录，转录量是否减少。

6.2 蛋白水平检测

检测目的基因的蛋白产物是否减少，可以运用western blot或者细胞免疫化学法，也可以在目的基因前后连接一个标记蛋白(如EGFP)，运用此蛋白的荧光强度间接测出目的基因的表达量。

6.3 动物实验或TCID50检测

对于动物病毒，可在给动物攻毒后及时给予siRNA，以动物死亡数作为干扰效果的指标；也可以将病毒进行细胞培养后，给予一定量的siRNA，检测病毒的TCID50。

7 RNAi的应用

7.1 在基因功能的研究方面

在哺乳动物中，同反义RNA和核酶技术相比，RNAi在体内表达时间长；对同一靶基因作用，其用量低于其 $10^3 \sim 10^4$ 倍[10~13]；对基因抑制水平比核酶更有效[14]；在被降解的mRNA中，被降解的小片段的RNA分子部分被用来继续作为小的siRNA分子，增加干扰的时限和干扰的效率[15]；同时对多个基因进行作用[16]。这些优点使RNAi在真核基因功能的研究方面在近几年内得到广泛的应用，成为一个很有潜力的基因功能研究工具。在鼠的基因功能研究方面，RNAi的重组载体在小鼠的细胞系内已经能成功的传代[17]。理论上，目前可以利用RNAi技术制造出同一染色体上两个近距基因敲除的小鼠。在人类基因功能的研究方面，Huang等利用RNAi研究网格蛋白介导EGF受体的细胞吞引作用机制，他运用RNAi技术同时抑制了HeLa细胞中13种内吞蛋白的表达，这对于运用核酶技术和反义RNA技术是很难实现的。目前应用RNAi对基因功能的研究已经成为基因功能研究的主要工具之一。

7.2 全基因组基因功能扫描

在人类基因组测序工作基本结束之后，下一步的重要工作是研究每一个基因的功能。RNAi技术的突破，使得对某种基因的敲除变得更系统和准确。另外，RNAi对于一些必需基因的研究具有自己独特的优势，它可以研究生物体基因敲除死亡前的一些表现型[18]。这对于基因完全敲除技术来说是不能实现的。通过对线虫全基因组的功能扫描，确认了一些决定线虫细胞分裂、凋亡、细胞形态学的基因[19, 20]。近来RNAi对哺乳动物全基因组基因功能扫描的研究也在进行，通过对这些基因功能的研究，已经发现了细胞凋亡、信号传导、蛋白功能调节的一些基因[21]，显示了它在基因功能研究中的较大潜力。但是它也有一些缺点，对于一些基因RNAi的抑制效果并不理想，目前对于这种现象的原因尚不清楚。

7.3 疾病的基因治疗

大量在体外和体内应用RNAi的研究证实了RNAi的潜在基因治疗效果，如艾滋病、流感、病毒性肝炎、帕金森、肌萎缩性(脊髓)侧索硬化、癌症、风湿性关节炎、II型糖尿病等都取得了令人欣慰的成果。Tian等[22]发现，hTERT dsRNA可以特异性地沉默hTERT基因，从而抑制肺癌细胞A549的增殖。C-Myc在乳腺癌的研究中起很重要的作用，通过RNAi降低MCF-7细胞中c-Myc蛋白的表达水平，可以抑制肿瘤细胞体内外的增长，暗示了RNAi通过抑制过表达基因如c-Myc而达到治疗乳腺癌的可能性[23]。

7.4 蛋白质功能的研究

在RNAi发现之前，对蛋白质功能的研究是通过分析基因表达产物的分析、功能克隆的研究来对蛋白质的功能进行分析。随着人们对全基因组测序的完成，人类对基因的研究进入后基因组时代，即基因功能和蛋白质功能的研究。如前述RNAi已经用于对基因功能的扫描，在对基因功能的研究中起到了很大的作用，同样，RNAi在对蛋白质的功能研究中也得到了应用。如Saijou等通过RNAi技术对RDB-1蛋白的功能进行了研究，发现它同18S核糖体的关系[24]。Huang等通过RNA干扰技术，研究了网格蛋白同EGF受体的吞引关系。这些研究说明在蛋白质功能的研究中，RNA同样能发挥重要作用。它又为蛋白质功能的研究提供了一个有力的工具。

参考文献

- Guo Su, Kempthues K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81(4): 611~620
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6 669): 806~811
- 曹国军, 邵宁生. RNA干涉. *生命科学仪器*, 2004(2): 39~41
- 朱睿, 张开立, 邹向阳. RNA干扰(RNAi)技术及其在功能基因组学中的应用. *大连医科大学学报*, 2003, 25(2): 105~107
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7 006): 343~349
- Xia Y, Lin R X, Zheng S J, et al. Effective siRNA targets screening for human telomerase reverse transcriptase. *World J*

- Gastroenterol, 2005,11(16):2 497~501
- 7 Hagerkvist R, Mokhtari D, Myers J W, et al. siRNA produced by recombinant dicer mediates efficient gene silencing in islet cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005(1 040):114~122
- 8 Qian Z K, Xuan B Q, Min T S, et al. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*, 2005,11(9):1 297~1 302
- 9 Wang W, Wang C Y, Dong J H, et al. Identification of effective siRNA against K-ras in human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2 by siRNA expression cassette. *World J Gastroenterol*, 2005,11(13):2 026~2 031
- 10 Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2003(13): 1~7
- 11 Kretschmer-Kazemi F R, Sezakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 2003,31: 4 417~4 424
- 12 Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, et al. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.*, 2003,31(12):3 185~3 193
- 13 Xu Y, Zhang H Y, Thormeyer D, et al. Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs. *Biochem Biophys Res. Commun*, 2003,306(3):712~717
- 14 Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al. siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem Biophys Res. Commun*, 2004(14):283~291
- 15 Svoboda P, Stein P, Hayashi H, et al. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, 2000,127: 4 147~4 156
- 16 Huang F, Khvorova A, Marshall W, et al. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of EGF receptor by RNA interference. *Biol. Chem.*, 2004,279(16): 16 657~16 661
- 17 Carmell M A, Zhang L, Conklin D S, et al. Germline transmission of RNAi in mice. *Nature Struct. Biol.*, 2003(10):91~92
- 18 Carpenter A E, Sabatini D M. Systematic genome-wide screens of gene function. *Nature Rev. Genet*, 2004(5):11~22
- 19 Ashratl K, Chang F Y, Watts J L, et al. Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003,421:268~272
- 20 Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, et al. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol.*, 2001,11(3):171~176
- 21 Aza-Blanc P, Cooper C L, Wagner K, et al. Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol. Cell*, 2003,12(3):627~637
- 22 Tian F J, Wang Z Y, Ma J Y, et al. Inhibitory effect of hTERT dsRNA on telomerase activity in lung carcinoma cell line A549. *Ai Zheng*, 2005,24(3):257
- 23 Wang Y H, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of C-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res.*, 2005,7(2):R220
- 24 Saijou E, Fujiwara T, Suzaki T, et al. RBD-1, a nucleolar RNA-binding protein, is essential for *Caenorhabditis elegans* early development through 18S ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(3):1 028~1 036

(编辑: 崔成德, cuicengde@tom.com)

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有: 饲料工业杂志社 Copyright © <http://www.feedindustry.com.cn> 2004-2005 All Rights 辽 ICP 备 05006846 号

饲料工业杂志社地址: 沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编: 110036 投稿: E-mail: tg@feedindustry.com.cn 广告: E-mail: ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部: (024) 86391926 (传真) 编辑二部: (024) 86391925 (传真) 网络部、发行部: (024) 86391237 总编室: (024) 86391923 (传真)