

SiRNA 与 RNAi 实验技术手册

RNA 是生物体内最重要的物质基础之一, 它与 DNA 和蛋白质一起构成生命的框架, 但长久以来, RNA 分子一直被认为是小角色。然而, 一系列发现表明——这些小分子 RNA 事实上操纵着许多细胞功能。它可通过互补序列的结合反作用于 DNA, 从而关闭或调节基因的表达。甚至某些小分子 RNA 可以通过指导基因的开关来调控细胞的发育时钟。RNA 干涉 (RNAi) 是在线虫中发现的, 在 1998 年的一篇 Nature 论文中被公诸于众。此后, 科学家们还明白, RNAi 还有其他形式, 它既是一种了解基因功能的强大工具, 又是很多生物的基因组所采用的一种在演化上来讲很古老的防卫方法。

一、什么是 siRNA 和 RNAi?

双链 RNA 经酶切后会形成很多小片段, 称为 siRNA, 这些小片段一旦与信使 RNA (mRNA) 中的同源序列互补结合, 会导致 mRNA 失去功能, 即不能翻译产生蛋白质, 也就是使基因“沉默”了, 双链 RNA 对基因表达的阻断作用就被称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。

二、RNAi 的作用机制是什么?

目前 RNAi 的作用机理主要是在线虫, 果蝇, 斑马鱼等生物体内阐明的。生物体内的双链 RNA 可来自于 RNA 病毒感染、转座子的转录产物、外源导入的基因。这些来源的双链 RNA 诱发了细胞内的 RNAi 机制, 结果是病毒被清除、转座子的表达被阻断、外源导入基因表达被阻断, 同时与其同源的细胞基因组中的基因表达也被阻断。

通过生化和遗传学研究表明, RNA 干扰包括起始阶段和效应阶段 (initiation and effector steps)。

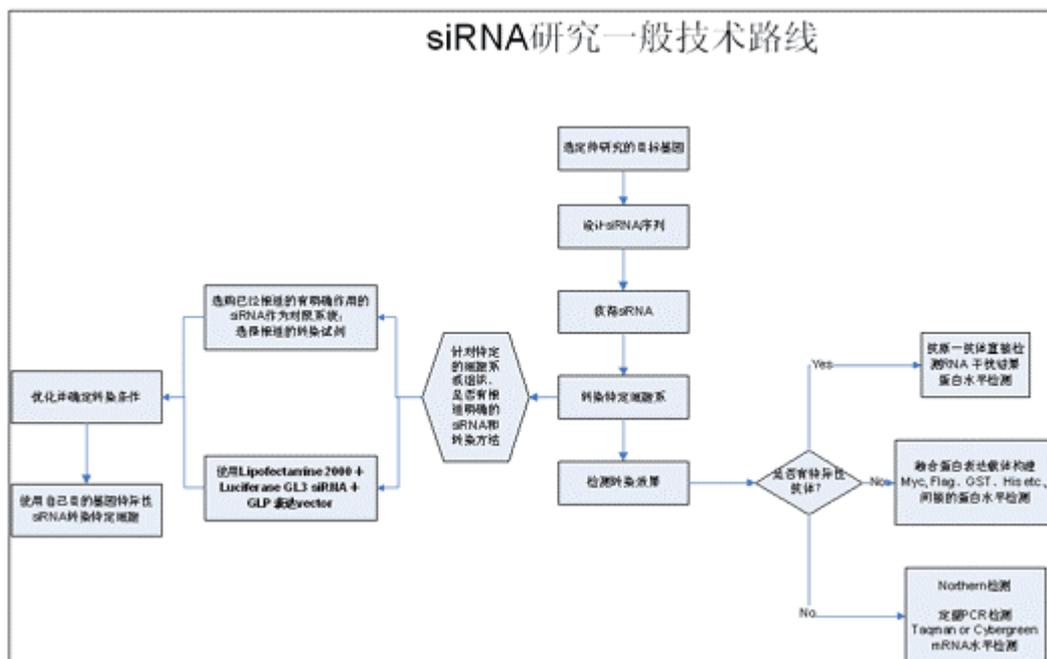
A、在起始阶段, 加入的小分子 RNA 被切割为 21-23 核苷酸长的小分子干扰 RNA 片段 (small interfering RNAs, siRNAs)。证据表明; 一个称为 Dicer 的酶, 是 RNase III 家族中特异识别双链 RNA 的一员, 它能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入或者由转基因病毒感染等各种方式引入的双链 RNA, 切割将 RNA 降解为 19-21bp 的双链 RNAs (siRNAs), 每个片段的 3' 端都有 2 个碱基突出。

B、在 RNAi 效应阶段, siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成所谓 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。激活 RISC 需要一个 ATP 依赖的将小分子 RNA 解双链的过程。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上, 并在距离 siRNA3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA。尽管切割的确切机制尚不明了, 但每个 RISC 都包含一个 siRNA 和一个不同于 Dicer 的 RNA 酶。

另外, 还有研究证明含有启动子区的 dsRNA 在植物体内同样被切割成 21-23nt 长的片段, 这种 dsRNA 可使内源相应的 DNA 序列甲基化, 从而使启动子失去功能, 使其下游基因沉默。

三、如何进行 RNAi 试验的设计?

RNAi 研究的一般技术路线一般如下:



由上述的路线可以看出, 获得高纯度的siRNA产物是进行实验的第一步, 而转染的效率则是非常关键的因素。

A、设计siRNA序列

1、在设计RNAi实验时, 可以先在以下网站进行目标序列的筛选

http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html

<http://www.ic.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html>

<http://design.dharmacon.com/rnadesign/default.aspx?SID=45358710>

2、RNAi 目标序列的选取原则

(1)、从转录本 (mRNA) 的AUG起始密码开始, 寻找“AA”二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的siRNA靶位点。有研究结果显示GC含量在 45%—55%左右的siRNA要比那些GC含量偏高的更为有效。

Tuschl等建议在设计siRNA时不要针对 5' 和 3' 端的非编码区 (untranslated regions, UTRs), 原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域, 而这些UTR结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响siRNP核酸内切酶复合物结合mRNA从而影响siRNA的效果。

(2)、将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人, 或者小鼠, 大鼠等等) 进行比较, 排除那些和其他编码序列/EST同源的序列。例如使用BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)。

(3)、选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的siRNA, 以找到最有效的siRNA序列。

3、阴性对照

一个完整的siRNA实验应该有阴性对照, 作为阴性对照的siRNA应该和选中的siRNA序列有相同的组成, 但是和mRNA没有明显的同源性。通常的做法是将选中的siRNA序列打乱, 同样要检查结果以保证它和目的靶细胞中其他基因没有同源性。

4、目前已证实的siRNA可以在下面的网页找到

<http://design.dharmacon.com/catalog/category.aspx?key=49>

http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_502.html

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/siRNADB.html>

http://python.penguindreams.net/Order_Entry/jsp/BrowseCatalog.jsp?Category=Published

B、siRNA的获得

目前为止较为常用的方法有通过化学合成、体外转录、长片断dsRNAs经RNase III 类降解 (e.g. Dicer, E. coli, RNase III)、体外制备siRNA, 以及通过siRNA表达载体或者病毒载体, PCR制备的siRNA表达框在细胞中表达产生siRNA。

1、体外制备

a、化学合成法

许多国外公司都可以根据用户要求提供高质量的化学合成siRNA。主要的缺点包括价格高, 定制周期长, 特别是有特殊需求的。由于价格比其他方法高, 为一个基因合成3—4对siRNAs的成本就更高了, 比较常见的做法是用其他方法筛选出最有效的序列再进行化学合成。

最适用于: 已经找到最有效的siRNA的情况下, 需要大量siRNA进行研究。

不适用于: 筛选siRNA等长时间的研究, 主要原因是价格因素。

b、体外转录

以DNA Oligo为模版, 通过体外转录合成siRNAs, 成本相对化学合成法而言比较低, 而且能够比化学合成法更快的得到siRNAs。不足之处是实验的规模受到限制, 虽然一次体外转录合成能提供足够做数百次转染的siRNAs, 但是反应规模和量始终有一定的限制。而且和化学合成相比, 还是需要占用研究人员相当的时间。值得一提的是体外转录得到的siRNAs毒性小, 稳定性好, 效率高, 只需要化学合成的siRNA量的1/10就可以达到化学合成siRNA所能达到的效果, 从而使转染效率更高。

最适用于: 筛选siRNAs, 特别是需要制备多种siRNAs, 化学合成的价格成为障碍时。

不适用于: 实验需要大量的, 一个特定的siRNA。长期研究。

c、用RNase III 消化长片断双链RNA制备siRNA

其他制备siRNA的方法的缺陷是需要设计和检验多个siRNA序列以便找到一个有效的siRNA。而用这种方法——制备一份混合有各种siRNAs“混合鸡尾酒”就可以避免这个缺陷。选择通常是200—1000碱基的靶mRNA模版, 用体外转录的方法制备长片断双链dsRNA, 然后用RNase III (or Dicer) 在体外消化, 得到一种siRNAs“混合鸡尾酒”。在除掉没有被消化的dsRNA后, 这个siRNA混合物就可以直接转染细胞, 方法和单一的siRNA转染一样。由于siRNA混合物中有许多不同的siRNAs, 通常能够保证目的基因被有效地抑制。

dsRNA消化法的主要优点在于可以跳过检测和筛选有效siRNA序列的步骤, 为研究人员节省时间和金钱(注意: 通常用RNase III通常比用Dicer要便宜)。不过这种方法的缺点也很明显, 就是有可能引发非特异的基因沉默, 特别是同源或者是密切相关的基因。现在多数的研究显示这种情况通常不会造成影响。

最适用于: 快速而经济地研究某个基因功能缺失的表型。

不适用于: 长时间的研究项目, 或者是需要一个特定的siRNA进行研究, 特别是基因治

疗。

2、体内表达

前面的3种方法主要都是体外制备siRNAs,并且需要专门的RNA转染试剂将siRNAs转到细胞内。而采用siRNA表达载体和基于PCR的表达框架则属于:从转染到细胞的DNA模版中在体内转录得到siRNAs。这两种方法的优点在于不需要直接操作RNA。

a、siRNA表达载体

多数的siRNA表达载体依赖三种RNA聚合酶III 启动子(pol III)中的一种,操纵一段小的发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)在哺乳动物细胞中的表达。这三类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的U6 启动子和人H1 启动子。之所以采用RNA pol III启动子是由于它可以在哺乳动物细胞中表达更多的小分子RNA,而且它是通过添加一串(3到6个)U来终止转录的。要使用这类载体,需要订购2段编码短发夹RNA序列的DNA单链,退火,克隆到相应载体的pol III 启动子下游。由于涉及到克隆,这个过程需要几周甚至数月的时间,同时也需要经过测序以保证克隆的序列是正确的。

siRNA表达载体的优点在于可以进行较长期研究——带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达,持续数星期甚至更久。

病毒载体也可用于siRNA表达,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。

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(其实主要是指需要多个克隆和测序等较为费时、繁琐的工作)。

b、siRNA表达框架

siRNA表达框架(siRNA expression cassettes, SECs)是一种由PCR得到的siRNA表达模版,包括一个RNA pol III启动子,一段发夹结构siRNA,一个RNA pol III终止位点,能够直接导入细胞进行表达而无需事前克隆到载体中。和siRNA表达载体不同的是,SECs不需要载体克隆、测序等颇为费时的步骤,可以直接由PCR得到,不用一天的时间。因此,SECs成为筛选siRNA的最有效工具,甚至可以用来筛选在特定的研究体系中启动子和siRNA的最适搭配。如果在PCR两端添加酶切位点,那么通过SECs筛选出的最有效的siRNA后,可以直接克隆到载体中构建siRNA表达载体。构建好的载体可以用于稳定表达siRNA和长效抑制的研究。

这个方法的主要缺点是①PCR产物很难转染到细胞中(闪晶公司的Protocol可以解决这

一问题)②不能进行序列测定, PCR和DNA合成时可能差生的误读不能被发现导致结果不理想。

最适用于: 筛选siRNA序列, 在克隆到载体前筛选最佳启动子。

不适用于: 长期抑制研究。(如果克隆到载体后就可以了)。

小结

运用RNAi来诱导基因表达的沉默是一种制备基因功能缺失表型的有效的新方法。下表总结了 5 中不同的制备siRNA的方法。

比较项目	化学合成	体外转录	RNase III 降解 dsRNA	siRNA 表达载体	PCR 表达框
材料需求	21-mer RNA oligos(一对)	29-mer DNA oligos(一对)	转录模版 (200-1000bp, 两侧带 T7 启动子)	55-60-mer DNA oligos(一对)	~50-mer DNA oligos(一对)
全部制备/合成 时间所需时间	4天—2周	24 小时 + DNA oligo 合成时间	1 天 + 转录模 版制备时间	5 天以上 + DNA oligo 合 成时间	~ 6 小时 + DNA oligo 合成时间
个人所需操作 时间	几乎不需要 *	中等	中等	多	中等
是否需要验证 和寻找最有效 siRNA	需要	需要	不需要	需要	需要
能否标记 siRNA (例如用于荧光 显微镜分析 siRNA 进入细胞 过程或者在细	能	能	能	不能	不能

胞中的定位)					
转染的相对难易程度	好	好	好	差	差
可筛选性 (例如抗生素筛选)	不可以	不可以	不可以	可以	不可以
能否用于长效抑制	不可以	不可以	不可以	可以 (抗生素筛选)	不可以
能否大规模制备	可以	有限	有限	可以	有限
检测总体转染效率	不可以	不可以	不可以	可以	不可以
每个基因的相对费用 (不包含人力)	高	中等	低	中等	中等
*取决于合成后是否包含纯化、去保护, 以及厂家提供的是已经退火的即用型双链还是冻干的单链					

C、siRNA 的转染

将制备好的 siRNA, siRNA 表达载体或表达框架转导至真核细胞中的方法主要有以下几种:

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于磷酸钙转染的成功至关重要。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准, 保证质量, 因为甚至偏离最优条件十分之一 pH 都会导致磷酸钙转染的失败。

2、电穿孔法

电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子。将细胞悬浮液置于电场中会诱导沿细胞膜的电压差异, 据认为这种电压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重要, 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。一般, 成功的电穿孔过程都伴随高水平 (50%或更高) 的毒性。

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 分子使得 DNA 可以结合在细胞表面。通过使用 DMSO 或甘油获得的渗透休克将 DNA 复合体导入。两种试剂都已成功用于转染。DEAE-葡聚糖仅限于瞬时转染。

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 或蛋白直接转入细胞质或细胞核。基因枪使用高压 microprojectile 将大分子导入细胞。

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, 其可以形成微小的 (平均大小约 100-400nm) 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。因此使用阳离子脂质体转染的原理与以前利用中性脂质体转染的原理不同。使用阳离子脂质体试剂, DNA 并没有预先包埋在脂质体中, 而是带负电的 DNA 自动结合到带正电的脂质体上, 形成 DNA-阳离子脂质体复合物。据称, 一个约 5kb 的质粒会结合 2-4 个脂质体。被俘获的 DNA 就会被导入培养的细胞。现存对 DNA 转导原理的证据来源于内吞体和溶酶体。

注: 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:

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, 蛋白和盐离子。注意: 化学合成的 RNA 通常需要跑胶电泳纯化 (即 PAGE 胶纯化)。

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, 所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等, 此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。

3、健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

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。

4、避免使用抗生素

Ambion 公司推荐从细胞种植到转染后 72 小时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、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。

6、通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对大多数细胞, 看家基因是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的 siRNA 转入靶细胞 (同样适合实验靶 siRNA), 转染 48 小时后统计对照蛋白或 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。

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。

D、RNAi 的效果分析

RNAi 分子水平的检测主要通过 mRNA 和蛋白两个方面进行检测。对于 mRNA, 可以采用 RT-PCR、荧光定量 PCR 或 Northern 杂交等, 通过信号强弱判断目的基因的沉默效果。由于生命的执行者是蛋白, 因此还需要对蛋白水平进行检测, 可通过 Western 杂交, ELISA, 免疫荧光等。当然 RNAi 最大以及最终的效果是细胞的代谢过程、生理生化系数等表型参数发生明显的变化。

四、siRNA 实验成功的要点

1、对每个基因设计并检测两到四个 siRNA 序列

为了找到潜在靶位点, 扫描靶基因中的 AA 序列。记录每个 AA 3' 端 19 个核苷酸作为潜在 siRNA 靶位点。潜在靶位点需通过 GENBANK 数据库的 BLAST 分析, 去除那些与其它基因明显同源的靶位点。如果可能, siRNA 应根据 mRNA 低二级结构的区域设计。美国著名 RNA 产品公司 Ambion 提供网上在线设计工具, 帮助您更快地完成这项工作。网址为: www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html

2、选择低GC含量的siRNA

Ambion公司研究发现GC含量在 40-55%的siRNA比 55%以上的活性高。

3、纯化体外转录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 (Ambion siRNA体外合成试剂盒中已包括纯化柱保证siRNA纯度) 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, 蛋白和盐离子。注意: 化学合成的RNA通常需要跑胶电泳纯化 (即PAGE胶纯化)。

4、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, 所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品...因此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。Ambion 公司在这方面有一整套的产品线, 如除 RNA 酶的喷剂, 拭纸及液剂, 检测和去除 RNA 酶。

5、健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

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。

6、避免适用抗生素

Ambion 公司推荐从细胞种植到转染后 72 小时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。QIAGEN 推出的专门针对 RNA 转染的试剂。

7、选择好的转染试剂转染 siRNA

针对靶细胞类型, 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。siRNA 实验要求选择适合转小的 RNA 的转染试剂 (目前大多数转染试剂都针对转染比较大的质粒 DNA, 而非小的 RNA 分子, 宿主范围大小也不同)。Ambion 公司的 Silencer siRNA Transfection Kit, QIAGEN 的 Transmessenger Transfection Reagent 都是专门针对转 siRNA 优化的转染试剂, 是您的理想选择。

8、通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对大多数细胞, 看家基因是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的 siRNA 转入靶细胞 (同样适合实验靶 siRNA), 转染 48 小时后统计对照蛋白或 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。Ambion 公司提供多种靶基因的阳性 siRNA。

9、通过阴性对照 siRNA 排除非特异性影响

合适的阴性对照可通过打乱活性 siRNA 的核苷酸顺序设计而得。必须注意它要进行同源比较确保相对所要研究的生物的基因组没有同源性。

10、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。

五、RNA 操作时的注意事项与实验技巧

1、操作注意事项

由于 RNA 酶的广泛存在与难以灭活的顽固特性。使得 RNA 的提取纯化和后续工作变得非常困难。为了保证 RNA 的研究工作成功, 请仔细阅读下列注意事项, 相信它能帮助您解决常见的问题。

归根究底, RNA 工作的主要问题是防止 RNA 酶的污染。RNA 酶无处不在, 在实验操作的任何一步, 任何偶然的疏忽或不当操作都有可能造成 RNA 酶污染, 从而导致整个实验失败。因此, 严格控制实验条件, 避免任何可能的污染是保证实验成功的关键, 必须做到以下几点:

1)、如果可能, 实验室应辟出专门 RNA 操作区, 离心机、移液枪、试剂等均应专用。RNA 操作区应保持清洁, 并定期进行消毒。

2)、操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套, 并经常更换, 以避免将手、臂上的细菌和真菌以及人体自身分泌的 RNA 酶带入试管或污染用具。尽量避免使用抛弃式塑料手套。塑料手套不贴身, 常常造成操作不便, 而且多出部分还容易在器具上遭 RNA 酶污染并向未污染处传递, 扩大污染。

3)、尽量使用一次性枪头、离心管等塑料制品, 尽量避免与其它实验共享器具, 以防止交叉污染。推荐使用出厂前已经灭菌的枪头和离心管, 大多国外厂商供应的无菌塑料制品很少有 RNA 酶污染, 买来后可直接用于 RNA 操作。许多研究者用 DEPC 等处理的塑料制品, 往往由于二次污染而带有 RNA 酶, 从而导致实验失败。

4)、配制溶液用的酒精, 异丙醇、Tris 等应采用未开封的新品。溶液需用 DEPC 水配制 (加 0.01%(体积比)DEPC 至重蒸水或 Mili Q 级水中, 处理过夜, 灭菌即成 DEPC 水)。

5)、所有玻璃制品都必须在 240℃ 烘烤 4 小时。所有旧塑料制品都必须用 0.5M 的 NaOH 处理 10 分钟, 并用 DEPC-H₂O 彻底冲洗后灭菌, 也可考虑用 0.01% 的 DEPC 水浸泡过夜, 然后灭菌, 烘干。无法用 DEPC 处理的用具可以用氯仿擦拭若干次, 这样通常可以消除 RNA 酶的活性。

2、样本保存的注意事项

样本一旦从生物体中分离后, 细胞内的 RNA 就变得非常不稳定, 容易降解。因此取样后, 如何保证取样前后基因的表达模式不变, 就变得非常重要。传统方法是用液氮速冻, 再放到超低温冰箱中保存。

目前有些厂家开发出专门的 RNA 保护剂, 如 Qiagen 公司的 RNeasy 是具有抑制 RNase 和稳定 RNA 作用的试剂, 将采集的组织样本等直接放入到 RNeasy 中, 即可起到稳定样本中 RNA 的作用。无需液氮或干冰, 方便安全地在室温下保存一段时间, 低温可长期保存。还有对细菌样本专用的 RNeasy Bacteria Reagent 及对血液样本专用的 PAXgene™ Blood RNA System。

3、RNA 的定量与纯度

RNA 通常用分光光度计定量, 测量在 260 nm 处的吸收值 (A₂₆₀)。通常分光光度计 A₂₆₀ 的读数要介于 0.15-1.0 之间才是可靠的, 因此 RNA 提取结束后, 要根据大概产量稀释 (推荐用 10 mM Tris.HCl, pH 7.0 稀释) 到适当浓度范围, 再用分光光度计测量。A₂₆₀ 为 1 相当于 RNA 的浓度为 40 μg/ml。

为了检测 RNA 的纯度, 可以测量 A₂₆₀ 与 A₂₈₀ 的比值, 通常纯 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9-2.1。

常见细胞与组织的 RNA 含量:

样本来源		Total RNA (μg)	mRNA (μg)
细胞培养物*	-	30 - 500	0.3 - 25
	NIH/3T3	120	3
	HeLa	150	3
	COS-7	350	5

小鼠 — 发育期†	Unfertilized egg	0.43 ng	nd
	Oocyte	0.35 ng	nd
	2-cell	0.24 ng	nd
	8 - 16-cell	0.69 ng	nd
	32-cell	1.47 ng	nd
	13-day-old embryo	450	13
小鼠组织‡	Brain	120	5
	Heart	120	6
	Intestine	150	2
	Kidney	350	9
	Liver	400	14
	Lung	130	6
	Spleen	350	7

10^7 cells

† Per organism

‡ 100 mg

nd = not determined

六、问题与猜想

A、问题

在 siRNA 与 RNAi 的研究中, 仍有许多的问题:

蛋白是如何与 siRNA 组合在一起的, 如何成为活性形式? 对靶 RNA 的剪切作用, 其相关的分子机制如何, 是需要特异的蛋白来剪切靶 RNA, 还是引导的 siRNA 本身即有剪切作用等。哺乳动物与人的 RNAi 机制是否与简单的真核生物类似, RNAi 的进化地位如何等。

B、猜想

1、疾病治疗: 主要的问题还是转运系统的选择, 如何找到一种高效而低毒的用于人体的转运载体是摆在所有 RNAi 应用面前的最大敌人。依靠免疫系统寻找转运载体可能成为途径之一, 而免疫系统中本身可能也有 RNAi 参与。细胞中是否普遍存在 RNAi 或进行 RNAi 的潜力呢? 细胞的凋亡机制可能也与 RNAi 有关。

病毒的蛋白质复制途径可能有多种, RNAi 是否能像人们期待的那么有效?

- 2、如果 siRNA 可以永久地关闭或者删除 DNA 片断, 而不仅仅是短期的抑制它。那么动物细胞全能性受抑制的程度可能远远高于过去人们所想象的。干细胞的可塑性可能是由于可以产生特异的 siRNA 或其前体。干细胞通过细胞内的 RNAi 机制在发育过程中关闭或开放基因的表达, 从而指导着细胞的定向分化。其中的 siRNA 有可能来自 DNA 的内含子。
- 3、在研究基因时, 可通过短期的抑制干细胞某个基因的表达来得知其功能。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn

