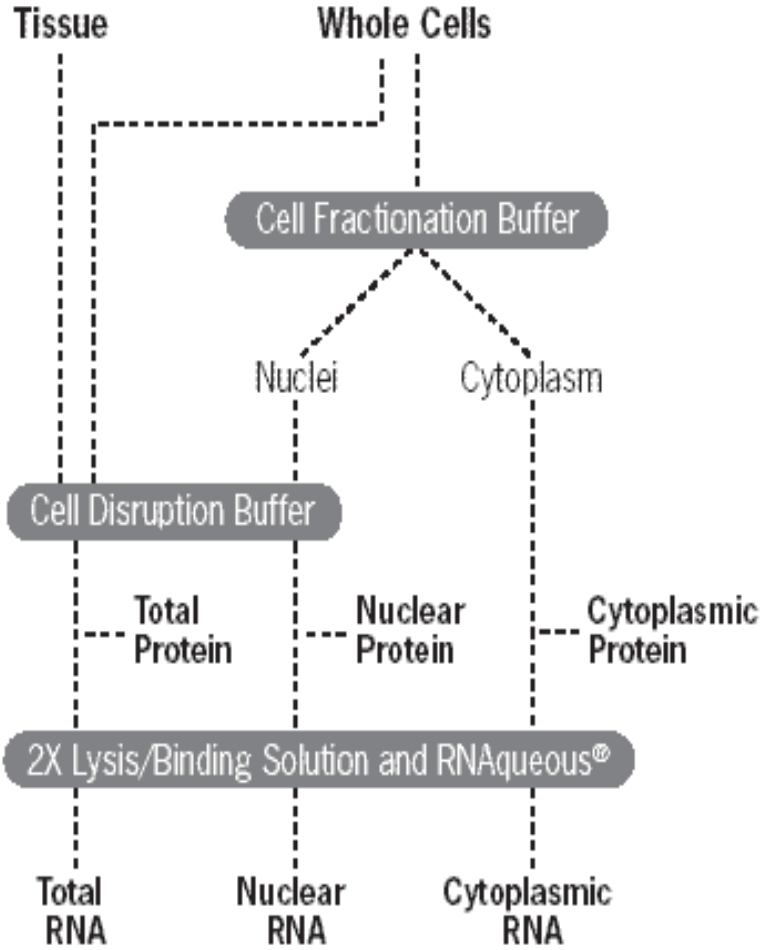
实验结果分析

由于目标基因千差万别，检测基因沉默的方法各异。由于 RNA 干扰首先表现在 mRNA 水平降低，其次是蛋白质水平的降低，然后才是表型或者功能的变化。所以最简单通用的方法首先就是转染后 24-48 小时做定量 RT-PCR，检测 mRNA 的水平。其次是通过 Western Blot 或者免疫印迹，流式等方法检测蛋白质水平的下降。由于和 siRNA 关系密切的 microRNA 可以在不影响 mRNA 水平的情况下在翻译水平上抑制蛋白的表达，所以，在检测 mRNA 水平之余，多数研究人员同意需要检测蛋白质水平的下降----如果你的 siRNA 实验中检测不到明显的 mRNA 水平下降而又检测到蛋白水平的下降，那么可以推测该 siRNA 以 microRNA 的作用方式调控蛋白表达。

要检测 mRNA 水平，首先要纯化细胞 RNA。这一步有很多种选择，生物通将另文综述 RNA 纯化方法。其次是做荧光定量 RT-PCR。这部分内容在生物通新技术专栏的定量 PCR 专辑已经有详细介绍。而 Western Bolt：生物通新技术专栏此前已经有做 Western Blot 专辑，并将于近期做修补和订正，由于篇幅巨大，在此就不再重复，请读者留意。

Ambion有个PARIS试剂盒能同时提取RNA和蛋白质，对于既需要提RNA做荧光定量，又要做Western Blot或者 2D 电泳、免疫沉淀等后继实验的RNAi实验结果分析来说就比较方便且节省精力。PARIS适用于小量细胞或组织（10^7个细胞或者 75mg组织）的蛋白和RNA提取，只要将细胞或组织加入Cell Disruption Buffer，得到的匀浆液一部份留做Western Blot或者免疫沉淀等蛋白实验用----Cell Disruption Buffer特别设计，不会干扰下游的蛋白质检测工作。另外一部份加入裂解液，直接过柱纯化RNA----这一步动作要快，严防死守RNase，如果样本经过RNAlater处理就会不用担心RNase。不过如果样品是经过RNAlater处理，由于RNAlater会使蛋白失活，则蛋白样品部分只能用于Western Blot 或者 2D 电泳，不能用于蛋白活性检测。试剂盒里还有分离细胞核和细胞质的分离液，可将全细胞先分离为细胞核和细胞质部分，然后分别提取蛋白和 RNA。试剂盒包含 RNA 纯化需要的纯化柱和各种溶液，50 次反应价格 4026 人民币。