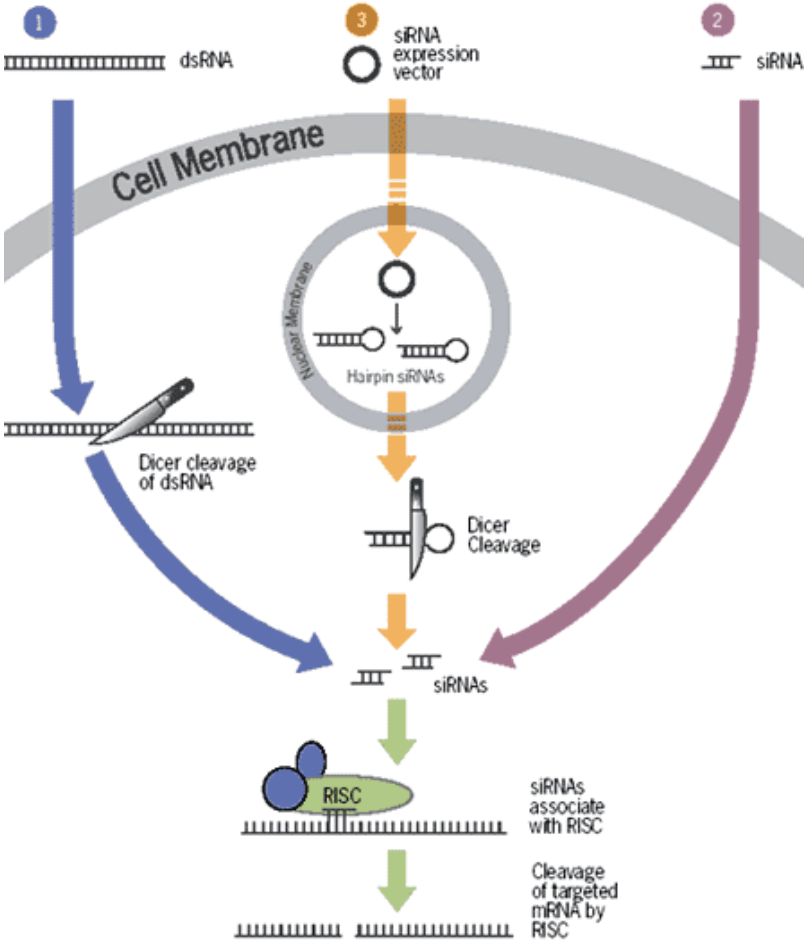
RNAi 实验 4 个要素和基本实验路线

RNA 干扰是一种自然发生的基因沉默机制，应用于基因功能研究和临床疾病治疗，就成为一种功能非常强大的工具。不过，开展 RNAi 实验并不难，不需要特殊的仪器，RNAi 实验所需的 4 大要素一点不复杂:

- 对应目标基因的 dsRNA(siRNA,长 dsRNA，shRNA 载体,看实验需要）；
- 适合的转染或者其他将 dsRNA 递送进入细胞的方法;
- 适当的对照;
- 检测目标基因表达情况的方法

1. **对应目标基因的 dsRNA**

在非哺乳动物细胞中，直接向细胞导入长双链 RNA(dsRNA)，在细胞质核酸酶 Dicer 的作用下可将长双链 RNA 降解为 21-23bp 的小分子干扰 RNA(small interfering RNAs，siRNAs)，这些小分子 RNAs 结合其他元件形成“RNA 诱导沉默复合物”(RNA-induced silencing complexes，RISCs)，并引导 RISCs 结合到与之互补的 mRNA 序列上，降解对应的 mRNA， 从而导致对应蛋白质水平下降，最终导致目标基因表达沉默(见下图：线路 1，蓝色)。



对于哺乳动物细胞来说，导入 30bp 以上的长双链 RNA(dsRNA)往往会诱发非预期的抗病毒应答反应，此路不通。所以常见的做法是直接制备 19-23bp 左右的 siRNAs，将 siRNAs 转入哺乳动物细胞(线路 2，红色)；或者是将短发夹结构 RNA(short hairpin RNAs，shRNAs)的 DNA 表达载体转入细胞，表达产生 shRNA，经过 Dicer 切割后得到 siRNA(线路 3，黄色)；最后 siRNAs 同样和其他元件组合成为 RNA 诱导的沉默复合物 RISCs，在 siRNA 指引下识别对应的 mRNA 序列并降解 mRNA，从而使特定基因表达沉默。线路 1 和 2 均为诱发瞬时基因沉默，持续时间约 3－7 天，根据目标基因而异，shRNA 表达载体则可以建立长效基因沉默的细胞株，进行功能缺失基因组筛选研究，也可用于体内 RNAi 研究。

市面上提供 RNAi 试剂的厂家越来越多，产品也格外丰富，如何选择呢？生物通参照这 3 条主要的 RNAi 实验线路的每个步骤，分别汇集介绍市售好用的相关产品，方便大家实验时作为选择的参考。

2. 适合的将 dsRNA 递送进入细胞的方法

一旦拿到 siRNAs 或者 dsRNA，还需要一种将双链 RNA 传递到细胞里的方法。传递的方法因细胞种类不同而异。对于线虫之类的低等动物活体进行体内 RNAi 实验，多见以喂饲或者浸泡方法将 dsRNA 导入体内。体外培养细胞，多数的贴壁细胞可以用脂质体或者多胺类试剂来进行有效的转染；对于原代细胞或者悬浮细胞，如果常规转染方法不行，可以用电转，甚至显微注射等，或者通过病毒载体感染等方法进行，病毒载体还可以作为哺乳动物体内 RNAi 实验的手段。

3 设置适当的参照

生物通 RNAi 实验特别 ebioTips1：

- 设置好参照：适当的参照对于每个实验来说都是关键的，必须的，非常重要的。RNAi 实验也不例外。缺少适当的参照，RNAi 实验的结果就无从分析。
- 未转染细胞对照：不加转染试剂的空白对照，用于排除转染试剂对细胞活力的影响（这个可以在摸转染条件时先做）
- 空白对照：只加转染试剂(如果实验用到载体则可做一组空载体对照)，用于排除 siRNA 转染对细胞活力的影响
- 负对照：设置不针对目标细胞内源任何基因的 siRNA 对照，用以排除转染 siRNA 对基因表达可能造成的任何非特异影响。
- 正对照：设置针对易于检测的参照基因的 siRNAs，用于确证 siRNAs 的递送、转染以及反应条件环境是可行的。也有建议选择和目标基因同一信号通路的另一个基因作为参照，便于排除脱靶等副反应，以及进一步确认目标基因的功能。
- 好的实验设计应该选择至少 2 个以上针对同一目标基因的**有效** siRNAs 同时平行做实验，以相互验证实验结果确实是由于目标基因沉默而引起的，并非个别 siRNA 的特异现象。
- 可选：荧光标记的 siRNAs 对照便于检测 siRNA 递送效果

4. 检测目标基因表达情况的方法

RNAi 实验使得特定细胞中的目标基因在 mRNA 水平上降解从而导致表达沉默，相当于暂时“敲除”目标基因，通过研究目标基因缺失的情况下细胞发生的变化，因而得以研究目标基因在细胞中的功能。目标基因不同，可以采用的检测目标基因表达状况的方法也千

差万别。在各种检测方法之前，你首先要确认目标基因的 mRNA 确实被 siRNA 介导降解了。由于 siRNA 作用在 mRNA 水平上，所以最常用的检测方法之一是通过实时定量 qRT-PCR 来检测目标基因的 mRNA 水平，比较实验组和负对照组(用非特异的参照 siRNA 平行实验）的差别。

生物通 ebioTips2: 在做实时荧光定量 RT-PCR 实验时注意选择 Primer 针对的区域是 siRNA 对应的同一区域，以免存在不同的 mRNA 剪接形式影响对结果的判断。通常 Taqman 探针法优于 SYBR Green 法，因为 TaqMan 探针法可以检测同一样本中 2 个以上不同的 mRNA 水平，便于在检测目标基因的同时检测参照。

由于蛋白质才是最终行使功能的载体，除了在 mRNA 水平上检测目标基因的 mRNA 是否下降，严谨的研究人员还会在蛋白表达水平上检测目标基因表达产物水平的下降幅度，也就是基因“沉默”的程度。Western Blot，免疫荧光等方法都是常用的方法。

siRNA/dsRNA 递送到细胞内后，应该什么时候做 qRT-PCR 检测，什么时候做蛋白检测呢？转染 8-48 小时后就可以检测到 mRNA 水平的逐步下降，转染 48 小时后检测 mRNA 含量通常会得到相对漂亮的结果；48-72 小时后可以检测到蛋白质表达的下降。因为 siRNAs 的沉默效果是有时效性的，探讨最佳的基因沉默效果落在哪个时间点上，就需要多个时间点进行检测，可以得到 siRNA 的量、mRNA 的量、蛋白的量之间的关系，需要花费更多的功夫。瞬时 RNAi 而诱导的基因沉默通常可延续 3－7 天，视目标蛋白在生命中的周期而不同。而 shRNA 表达载体则可以借助选择压力或者整合等方式，长时间持续沉默目标基因的表达。确认目标基因沉默，产物表达下降后，在此基础上研究人员就可以分析目标基因沉默对细胞功能和形态的影响，从而研究基因的功能。如果是已知基因，可以用相应的功能检测试剂盒进行定量检测。

除了严谨全面的对照体系，特别严谨的实验还会设计 Rescue 实验来排除假阳性：目标基因 mRNA 序列对应 siRNA 的位置引入点突变（不影响产物表达），使得 siRNA 不能作用于这种外源设计的 mRNA，并引入 RNAi 实验中看是否能回复由 RNAi 引起的变化。过表达目标基因、dominant negative expression，或者刺激同一信号通路下游以观察是否能回复 RNAi 引起的变化，都有助于验证 RNAi 实验的严谨性。不过这些方法如何调节调控以免引起新的问题，还有待研究。,

由于不断有文章指出高浓度的 siRNA(超过 100nM）容易引发抗病毒相应，除了需要摸索条件选择 siRNA 最低的有效用量来避免非预期反应，严谨的实验最好能检测细胞体系内的抗病毒反应----虽说芯片是检测全局的最佳方式，你并不一定需要如此高昂的代价——检测某些基因的变化可以提示是否出现抗病毒响应——如 2'5' oligoadenylate synthetase, STAT1，RNase L 等。

好，了解 RNAi 实验 4 大要素后，让我们沿着实验线路，一步一步了解 RNAi 实验，以及如何选择所需用到的产品。