

1998 年 Fire 和 Mello 等人首次证实双链 RNA 分子可诱导同源 mRNA 降解，导致目标基因表达沉默，命名为 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）。借助 RNAi 机制，研究人员得以迅速简便地降低细胞中某个特定基因的表达，实现类似“基因敲除”的效果，从而分析目标基因表达改变对细胞产生的影响，研究目标基因的功能。生物通早在 2002 年 10 月已经率先在国内大力推广介绍 RNAi 技术（参看 2002 年生物通新技术专栏：生物通技术特刊 [RNAi 技术专辑](#) 之一 [RNAi——回顾](#)；[RNAi 研究相关的产品介绍系列文章](#)；.....）。同年年底，siRNA 被 Science 杂志评选为 2002 年度 10 大重要突破之首，倍受瞩目。

5 年过去了，RNAi 技术已成为基因功能研究的重要武器，市面上提供 RNAi 实验相关试剂的品牌和种类也越来越多。生物通在这里回顾这 5 年来 RNAi 技术已经取得的重要成果，总结最新的 RNAi 技术线路，并分步综合比较市面上可供选择的各种产品及特点，搜罗行家高手的经验谈等，汇集为生物通周刊 ebiotech 之特刊《RNAi 5 年回顾及技术宝典》。

一、RNAi 技术 5 年回顾

RNAi 机制研究进展

RNAi 技术作为基因功能研究工具的应用进展

RNAi 在临床医药领域方面的进展和市场前景

二、RNAi 实验四个要素和三大基本实验路线

三、RNAi 实验预备：严防死守 RNase

四、非哺乳动物体系 RNAi 实验要素和选择

五、siRNA 的设计、合成、服务比较

预验证 siRNA 和 siRNA 文库

siRNA 设计要素

siRNA 制备的 4 种方法比较

siRNA 的 2 种转染方法和同类产品比较

siRNA 实验设计：参照

六、shRNA 表达质粒载体、病毒载体之比较

质粒载体的要素和选择

各种病毒 shRNA 表达载体和文库

七、实验结果分析

八、体内 RNAi 实验大家谈

九、microRNA



RNAi 5 年成果回顾



1998 年 Andrew Fire 和 Craig Mello 等人首次证实双链 RNA 分子可诱导同源目标 mRNA 降解, 导致特定基因表达沉默, 并将其命名为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。2001 年 Tuschl, Phil Sharp 等人在 Nature 上首次证实哺乳动物细胞中也存在 RNAi 机制, 并指出长度为 21-25 nt 的 siRNA 瞬时转染体外培养的哺乳动物细胞能诱导 RNAi, 但并不启动细胞凋亡或者干扰素响应。Tuschl 提出 21bp、3' 末端带有 2 个碱基突出的 siRNA (正符合 Dicer 酶切产物的特征) 最有效。如果说 2001 年权威期刊《Science》10 大突破之一的“RNA 新功能”中提及 RNA 干扰现象, 算是一次暂露头角的前奏, 那么 RNAi 真正大放异彩成为“主角”则是在 2002 年——siRNA 当选《Science》2002 年度 10 大重要突破之首。打那之后, 5 年来, RNAi 研究和应用达到了前所未有的新高度——从 RNAi 机制原理、RNAi 技术在基因功能研究领域的应用, 乃至临床应用等众多领域都有大量突破性成果涌现——RNAi 已经成为基因功能研究和基因治疗研究等领域的最热门技术之一, 仅仅在首次命名 RNAi 的 8 年之后, Andrew Fire 和 Craig Mello 因此荣获 2006 年诺贝尔生理医学奖。

1. RNA 干扰机制研究——生物体内广泛存在的 RNAi 作用是什么?

(1) 病毒防御

RNA 沉默被认为是低等生物和植物抗病毒防御系统的一道防线, 2002 年 5 月《Science》的一篇封面文章将这一范围扩大到了动物领域: 加州大学里弗塞德分校的 Shou-Wei Ding 等人首次证明动物细胞也利用 RNA 沉默来抵御病毒侵染, 这也是首次为证明动物和植物王国抗病毒通路的高度保守性提供了实验证据。之后法国科学家进一步将这一范围扩大到了哺乳动物。2006 年 Eugene Koonin 等人又证明原核生物里存在类似于真核生物 RNA 干扰系统的 RNA 沉默机制。

(2) 基因调控

多年来 DNA 和蛋白质一直是基因组研究中的主角, 而 RNA 只是被看作来往与 DNA 和蛋白质间的信使而已。然而越来越多的证明表明了 RNA 的重要作用。在小分子 RNA 中



发现了一类与调节基因表达密切相关的分子 micro RNA (miRNA)。这种内源性的小分子 RNA 针对 3' 端非编码区, 有着极高的保守性, 并在组织中广泛表达, 可在转录后以及

翻译水平上调控基因表达。有人推测 siRNA 实际上不过是外源或病毒的 dsRNA 闯入内源 RNAi 通路的结果而已。寻找这类调节分子及其靶基因已成为研究的热点。2005 年 Whitehead 和 MIT 的研究人员发现 miRNA 调节着成千上万个人类基因, 这些基因所占比例超过基因组蛋白编码区域的三分之一。这首次证明了 miRNA 影响着很多的生命功能。在解开 miRNA 如何影响生物体发育的这一未解之谜的道路上, Gaul 等人证明了 miRNA 调节着许多发育中基本的过程, 包括身体形态、形态发育学、神经系统和肌肉的发育, 尤其是对细胞存活意义重大。另一方面, David Bartel 等人发现在植物中存在的 miRNA 也控制发育过程中的基因表达。



2005 年《Nature》的一篇综述“Gene regulation: expression and silencing coupled”中提到, RNAi 不仅可以通过促使 mRNA 分解以进行转录后调控, 而且 RNAi 也在另外一个基因调控的过程——染色质的修饰中扮演了重要的角色, 这一过程主要是通过控制组蛋白甲基化等修饰来实现的。这说明了 RNA 干扰的一部分作用机理: 由于只有在 DNA 未折叠的情况下基因才会表现, 因此 miRNA 凭借甲基化等修饰组蛋白而影响局部 DNA 的折叠, 从调控大区域的基因表现, 在发育及分化的过程中扮演了极为重要的地位。miRNA 所诱发的染色质修饰需要 RNA polymerase II 的参与, 而也就说明了这种凭借甲基化染色质来抑制基因表达的过程, 可能也是需要先转录成 RNA, 然后制造 siRNA 以进行染色质的修饰, 抑制基因的表达。

2006 年 David Corey 还在 Nature Chemical Biology 发表文章提出 siRNA 不单可以沉默目标基因的表达, 在某种情况下还可以激活目标

基因的表达。同年的 Science 上发表了第一个 Dicer 酶的晶体图片, “dsRNA 结合部分和 RNase III 类似结构部分是分开的, 中间间隔一个带正电的平台, 可以容下 25bp 的 RNA”, 为解释 Dicer 到底如何加工 siRNA 提供一些线索。

Alexander Murashov 等人则发现外周神经也能内吞 siRNA 并在轴突中运输 siRNA, 能检测到轴突本地蛋白表达的下降。随后又发现在外周神经损伤或者脊柱神经损伤后的某些时间点有特定的 miRNA 产生, 表明 RNAi 机制在神经细胞修复过程中可能起某些作用, RNAi 甚至可能应用于脊柱神经损伤的治疗。

2006 年冷泉港实验室 Gregory Hannon 等人发现了一类关闭基因表达的新小 RNA 分子——Piwi-干扰 RNA, 大量存在于老鼠和人的睾丸中, 科学家相信, 与 piRNAs 有关的 Piwi 基因在多种生物中负责调控精细胞的发育和维持。这被《Science》评为 2006 年十大进展。

2. 技术应用

了解基因的功能才能获得相应的专利以及由此带来的巨大经济利益, 在全基因组测序已经不是难题的今天, 如何能尽快从已经公布的测序结果中挖掘出基因并研究得到其功能, 是当今最受关注的难题。由于可以方便快捷的临时关闭特定基因的表达, 从而研究由于目标基因关闭而导致的变化, 进而推测该基因的功能, RNAi 技术已经迅速成为研究基因功能的利器。从 2001 年《Nature》杂志上首家报道在哺乳动物培养细胞中通 siRNA 成功诱导了特异性靶基因表达沉默后, RNA 干扰技术就作为一项特异性基因沉默的有效工具从低等生物成功进军哺乳动物领域。

(1) 基因沉默工具

Tuschl 在 2001 年 Nature 的文章提及, 只有 21-25nt, 带有 3' 突出末端和 5' 磷酸化的 siRNA 才是有效的 siRNA, 其中以 21nt 效果最佳。这成为之后的 siRNA 设计法则“Tuschl 法则”。

原有的 siRNA 转染技术只能达到瞬间的基因失活作用, 2003 年 Shunsuke Ishii 等人构建了一个新 RNAi 载体表达 shRNA 即短发夹 RNA (short hairpin RNA)。这种方法既避免了引起干扰素应答, 又允许组织特异性抑制基因表达。这个载体被命名为 pDECAP, 标志着 RNAi 转基因技术取得重大突破, 这一新系统可作为传统小鼠基因敲除技术的一个有效替代方法。



同年 Robinson DA 等在 Nature Genetics 上报道用病毒系统在原代哺乳动物细胞,干细胞和转基因小鼠都取得了 RNA 干扰成功,大大扩展了这项技术的应用范围。

2005 年 M. D. Anderson 癌症中心的研究人员利用逆转录病毒将 shRNA 传递进一个小鼠的乳腺癌细胞系中,永久性沉默了活化形式的 STAT3 基因。同年 Rossi 等人发表文章提出 27 个碱基的 siRNA 作为 Dicer 底物进入 RNAi 途径,在很低浓度下 (50pmol-200pmol) 效果比 21nt 的 siRNA 更好更稳定。这个结论推翻了 Tuschl 原来认为 25nt 以上的 siRNA 不能作用的说法。27nt siRNA 从此进入市场。不过研究人员同样指出,由于 27nt 的 siRNA 需要经过 Dicer 酶切,所以不适于目前的修饰方法,否色无法被 Dicer 酶切。2006 年 Dharmacon 则发表文章指出 27mer siRNA 可能引发潜在的 IFN 响应而质疑其应用前景。但是 27bp siRNA 依然受到关注,并且与 Rossi 实验室合作的 Integrated DNA Technology 公司技术负责人之一的 Mark Behlke 表示后继的体内实验中 27bp siRNA 表现出色。

2006 年 Finkel 等人在 Journal of Immunological Methods 发表文章,联合了三种技术——细胞核转染技术 (nucleofection, 利用专门的溶液和电脉冲临时开启细胞核膜,以便外源核酸进入细胞核中,是 Amaxa 公司的保密技术, Finkel 本人将此技术描述为“就是一个黑盒子”,但是相当有效)、靶向 HIV 生存相关的 HALP 基因的 siRNA 表达框架 (siRNA expression cassettes, SECs) 悬浮的人类 T 细胞进行了操作---旨在阻断和消灭已感染 HIV 的 T 细胞。不过,为将来在临床上得到应用, Finkel 转用慢病毒来进行针对感染 HIV 的 T 细胞研究。

获得能够区分出等位基因的 siRNAs 一直

是 RNAi 应用的一个难题,2006 年 Phil Zamore 等人在 PLoS Genetics 上介绍了如何设计 siRNA 使得其可以识别存在单个 SNP 的等位基因,并强调了第 16 位碱基在识别单碱基多态性的目标序列时的重要性,提高了 siRNA 作为潜在药物治疗由单碱基变异而引起的遗传疾病的可能性。此外,由果蝇胚胎裂解物构成的“无细胞 RNAi 系统”也为 RNAi 的研究提供一种新的途径。

2006 年 Dharmacon 公司在《Nature Methods》上发表的文章首次证明了基因沉默中的“脱靶效应 (“off-target effects”, OTEs)”主要原因是 siRNA 反义链的 “Seed Region” (反义链 2—7 核苷酸序列) 活性所引起的;因此,单独对正义链的失活将无助于降低脱靶效应。在《RNA》上发表的文章再次提出 23bp 以上的 siRNA,特别针对 27bp-29bp 的 Dicer 底物可能影响细胞活力,并引发潜在的 IFN 响应,特别是 dsRNA 受体 (Toll-like Receptor 3) 的显著上调,引发对 27bp Dicer 底物在科研和临床的应用前景的质疑。

同年 Eriks Rozners 提出以蛋白质氨基酸键代替 siRNA 中的磷酸二酯键骨架,得到具有蛋白质结构特征的 siRNA,预期这种修饰会增加 siRNA 稳定性和对核酸酶耐受性,且减少的负电荷有助于分子穿越细胞膜进入细胞,增加的疏水性有利于运输蛋白的运输。此研究得到 NIH 为期 5 年的资助,并吸引的 RNAi 研究市场巨头 Dharmacon 的格外关注。

(2) RNAi 文库

随着人类基因组计划的完成和蛋白质组研究的开展,我们的视野不再局限于单个的基因,整个研究领域都在期待呼唤更为强大的、全基因组高度的基因功能研究工具。RNAi 文库 (RNAi library) 是人工构建的能通过诱导沉



默众多不同基因表达的组合文库,可以用于建立功能缺陷(loss of function) 的生物或细胞库, 进行表型的筛选。

2003 年《Science》杂志上一篇文章利用 RNAi 筛查 Hedgehog 通路关键的细胞信号传导级联反应有关的数千个果蝇基因, 这是 RNAi 技术首次成功用于筛选如此多的基因。

2004 年美国国家环境卫生研究中心建立了集中研究与环境健康和毒理学有关基因的 RNAi 库; 2005 年发表于《Nature》上的两篇文章利用 Ambion 公司的 RNAi 产品完成了当时 siRNA 文库进行的最大规模的筛选, 确定了 210 种不同的涉及内吞作用的人类激酶。同年 PloS 报道了利用 RNAi 文库对线虫进行筛选得到的延长寿命的克隆, 鉴定了 23 个与长寿相关的新基因。

2005 年 Dharmacon 公司(现 ThermoFisher

公司一员)完成世界上第一个完整覆盖人类全基因组的短干扰 RNA (siRNA) 文库。之后 Open Biosystems 公司于 9 月也宣布完成了覆盖小鼠全基因组的含有 microRNA (shRNA (mir)) 序列的 RNAi 产品。

2006 年美国国立癌症研究院 (NCI) 的 Louis Staudt 利用 RNAi 技术对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤进行 2500 个基因的“功能缺失”RNA 干扰筛查, 找到一个新的对某一 B 细胞淋巴瘤亚型有效的潜在治疗位点。这个方法也为寻找癌症治疗新位点开拓有用的思路。文章发表在 Nature 上。

通过病毒载体能构建出含有不同基因的 shRNA 表达文库, 这有利于长效抑制靶基因, 突破转染技术的限制。2006 年 Stephen Elledge、Brian Cullen 等人利用细胞内源 RNA 干扰机制构建了 shRNA 第二代文库。

3. 临床医药应用

RNA 干扰技术的发展一日千里, 迅速从实验室研究向临床应用方向挺进, 而且进展令人惊叹----目前已有 4 个产品进入临床试验, 最快的今年底将进入 III 期临床试验, 预计在 2010 年左右会有一个真正意义上的 RNA 干扰药物成功上市。这对于生物技术行业是一个极大的刺激——自从 20 世纪七八十年代基因重组和单克隆抗体技术之后的二三十年里, 虽然时时有新的生物技术如基因治疗、反义核酸技术、生物芯片受到追捧, 但最终都是希望落空, 整个行业都在期待新的有突破性应用前景的生物技术出现; 另一方面, 新药研发近年来屡屡陷入投资稳步增长, 效率低下, 周期延长, 失败率增大, 而新产品逐年减少的“怪圈”, 制药巨头们纷纷寻求能够成为下一个“重磅炸弹”式药物的新型候选化合物, 而 RNAi 技术具有吸引力的一个特点是药物开发速度比传

统药物开发技术快得多, 而且功能强大, 因而很可能成为万众期待的候选者。

(1) 疾病治疗

2002 年《Genes & Development》的一篇文章发现人类脆性 X 染色体综合征中的智力低下蛋白在果蝇中存在的形式与 RNA 干扰 (RNAi) 通路的构成有关, 这说明脆性 X 染色体综合征的分子机制可能与 RNA 干扰相关过程有关联。

同年著名的《新英格兰医学杂志》文章报道认为 RNAi 有望成为治疗艾滋病病毒 HIV 的新策略。MIT 的 Novina 最早利用 RNAi 来对付 HIV, 开启了利用 RNAi 治疗病毒性疾病的先河。Novina 与哈佛大学 Shankar 教授合作, 试图利用 RNAi 来治疗 AIDS。他们的研究成果发表在 2002 年 7 月的 Nature Medicine



上。不久哈佛的宋尔卫博士和 Shankar 继续 RNA 干扰 HIV 方面的研究, 并利用 RNAi 进行体内抗 HBV 研究。Ramratnam 等人则致力关注 RNAi 用于防疫----在粘膜表面的靶向 CCR5 的 siRNA 是否能阻断 HIV 传播途径。

2004 年 Beverly Davidson 首次利用包装入病毒载体中的小分子 RNA 对有遗传疾病的小鼠进行治疗。这一成果提高了 RNA 干扰技术能够运用在人类临床试验上的可能性。

美国费城 Acuity 制药公司 (Acuity Pharmaceuticals 公司) 应用 RNA 干扰技术开发出的第一个 RNAi 药物 Bevasiranib 即将诞生。2004 年 Bevasiranib 首获 FDA 批准进入 I 期临床。2006 年 9 月, Bevasiranib 在一项有 129 名湿性老年性黄斑变性 (AMD) 患者参与的 II 期临床试验中大获成功。试验表明, 以 siRNA 为基础的 Bevasiranib 能够减缓眼睛中致病性血管的生长并能改善视力, 应用最低剂量的患者维持治疗效果达到了数月时间, 而接受最高剂量的患者其治疗效果一直维持到研究结束, 更重要的是除了药物注射部位发生红肿之外, 没有观察到其他任何副作用。Bevasiranib 的 III 期临床试验有望在 2007 年底启动, 并于 2009 年获得最终试验结果。

2005 年 Sirna 治疗学公司 (Sirna Therapeutics) 宣布实现了 RNAi 应用于治疗中的重大突破, 成功抑制了乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 在人体内的 95% 的表达。此公司原来叫 Ribozyme, 后来乘机改名为 Sirna, 目前他们开发治疗 ADM 的 RNAi 药物 Sirna-027 已经进入 I 期临床, 其他方面的应用如治疗 Huntington 病和哮喘以及 COPD 也进入临床前研究阶段。

Alnylam Pharmaceuticals 也在进行 RNAi 药物的开发, 其股东正是 1993 年 Nobel 医学和生理学奖的获得者 Phillip Sharp, 他们开发

的 RNAi 药物用来治疗呼吸道合胞病毒、流行性感、帕金森病和高胆固醇血症等。

同期中国旅美生物医学博士陆阳等人以及之后的 Intradigm Corporation 公司两篇《Nature》子刊文章证明了 siRNA 剂对恒河猴 SARS 冠状病毒 (SCV) 呼吸道感染能起到预防和治疗作用。2006 年《Nature》更是公布在 RNAi 治疗研究的一大突破: 研究人员沉默了一个猴致病基因, 这是首次在非人类灵长类动物中有关 RNAi 的全身用药 (systemic administration) 研究。

Mary Crowley 医学研究中心的 John Nemunaitis 已经开始探讨将 RNAi 技术引入癌症治疗的个性化治疗方案中。由于疾病的个性化差异, 一种新的药物或者方法要通过 FDA 是相当困难的。对于个别病例中某些已知过表达的基因而导致的癌症, RNAi 关闭癌症基因的表达将是很有前途的工作。

然而, 利用 siRNA 治疗疾病需要解决几个问题: (1) 给药, 也就是 siRNA 导入和定向的问题, 如何使用高效载体定向传递 siRNA 到目标细胞而不影响其他无关细胞, 甚至包括在释放时间上的控制; (2) siRNA 稳定性, 包括修饰或者用递送试剂包埋等方法提高或者控制 siRNA 稳定性; (3) 安全问题。

(2) 产业投资和专利

各个生物技术在 RNAi 技术领域的竞争日趋激烈, 德国的 Ribopharma 公司是第一个获得 siRNA 沉默基因专利的公司, Sirna 和 Alnylam 公司拥有使 RNA 分子保持稳定的重要专利, Intradigm 等公司主要研究其他能包裹 siRNA 进入细胞的分子载体, 而 Dharmacon、Qiagen 以及 Ambion 则占据了 RNAi 实验试剂市场, Acuity 有治疗老年性黄斑变性的药物即将进入 III 期临床试验。



RNAi 技术具有吸引力的一个特点是药物开发速度比传统药物开发技术快得多，RNA 干扰技术已经吸引了许多大型制药公司的投资。RNA 干扰技术发现者刚获得诺贝尔奖的当月（2006 年 10 月），默沙东以 11 亿美金抢先收购了前面提到的 Sirna Therapeutics，购得该公司 100% 的股权，这是一家拥有 2 个药物上临床试验、50 个专利、250 个专利申请案，覆盖几百个疾病和基因的新药研发公司。今年 7 月 5 日，阿斯利康和一家 RNA 干扰技术公司英国 Silence 治疗公司达成类似交易，涉及 4 亿美元的技术合作及转让。7 月 9 日，罗氏制药与前面提到的美国 Alnylam 制药公司签订了一项价值高达 10 亿美元的协议，而此时 Alnylam 公司市值才不到 6 亿美元——Alnylam 公司自 2002 年成立以来，凭借其在 RNAi 治疗领域的技术领先优

势，已向包括 Dharmacon、Sigma-Aldrich、Invitrogen 等 14 家公司进行了专利授权，早在 2005 年诺华制药就已经收购了 Alnylam 公司 19.9% 的股份。

一些制药业巨头如美国雅培制药、辉瑞制药这样的生物技术巨头也开始投入 RNAi 的研发，各大制药厂商纷纷抢夺治疗性 RNA 干扰技术的相关专利，以尽快占据市场制高点，令这一领域近来变得越来越炙手可热，预期这不仅能引起新一轮的 RNA 干扰技术应用大赛，而且能加快新型 RNA 干扰药物成功上市以及扩大适应症范围的进程。

这些激动人心的发现呼唤着一个崭新的 RNA 时代的到来，谁能抢先一步获得这科学上的圣杯，其所作出的贡献必将留于生物学研究的史册上。你，做好准备了吗？来吧！



基因公司携手 Ambion 助您
完成 RNA 干扰实验



基因有限公司携手 Ambion 公司，为您带来全套的 RNA 干扰解决方案。Ambion 公司提供的 RNA 干扰研究产品主要包括：

Silencer® Pre-designed siRNAs	使用领先的 Cenix siRNA 序列设计算法，预先合成的高纯度 siRNA，目前支持数千种基因，可在 Ambion 网站在线查询。
Silencer® Validated siRNAs	使用领先的 Cenix siRNA 序列设计算法，预先合成的高纯度 siRNA， 确保有效！ 欢迎登录 Ambion 网站在线查询。
Silencer® Control siRNAs	Ambion 公司为您提供性能可靠的阴性对照和阳性对照 siRNA，完善您的实验数据。
pSilencer® siRNA 表达载体	各种启动子、各种抗性标记的表达载体，帮助您在胞内表达 shRNA，完成实验。 更有腺病毒系统和逆转录病毒系统供您选用！
siPORT™ 系列转染产品	NeoFX™ 是全新的 siRNA 转染试剂，为您的 siRNA 实验保驾护航；更有 siRNA 电转试剂盒，从此细胞不再难转！



RNAi 实验 4 个要素和基本实验路线



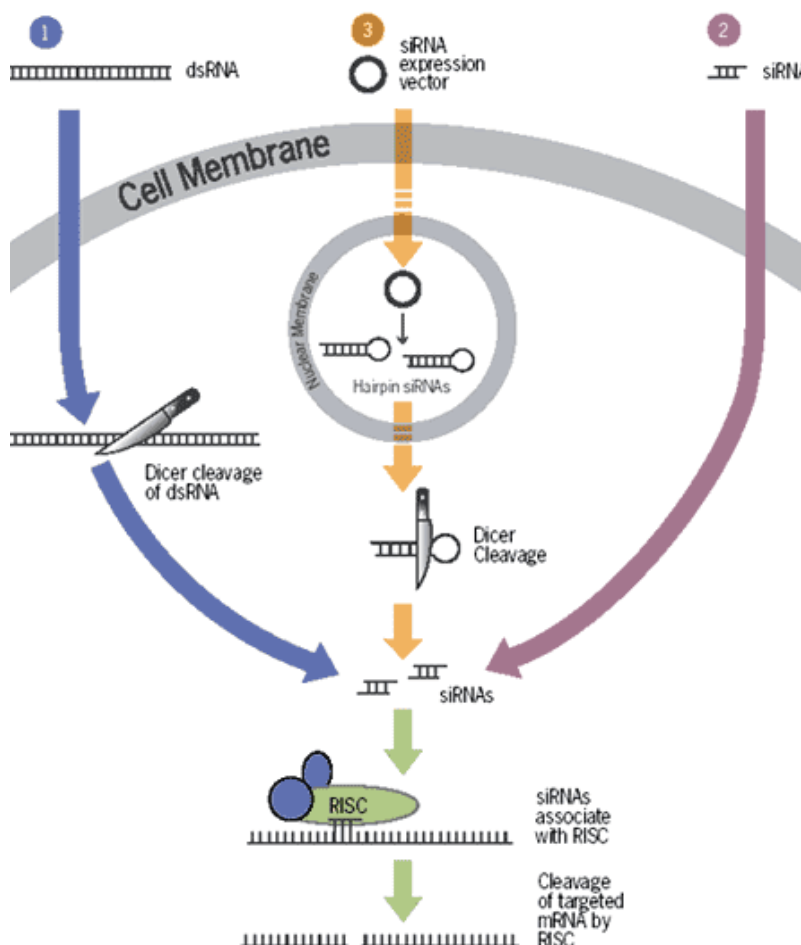
RNA 干扰是一种自然发生的基因沉默机制，应用于基因功能研究和临床疾病治疗，就成为一种功能非常强大的工具。不过，开展 RNAi 实验并不难，不需要特殊的仪器，RNAi 实验所需的 4 大要素一点不复杂：

- 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（这个可以在摸索转染条件时先做）

- 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。



RNAi 实验之前：严防死守 RNase

虽说有的 RNAi 实验过程可以不涉及 RNA，比如用载体表达 shRNA，可是涉及 RNA 合成，后继的 RNA 纯化和定量 RT-PCR，还是和其他涉及 RNA 的实验一样要求严格避免 RNase 污染。痕量的 RNase 就可以严重破坏实验结果，不可不防——

实验用到的试剂和耗材如指管和移液枪头都要求是无 RNase 污染的，或者 DEPC 处理过的（注意含 Tris 的溶液不能直接用 0.1%DEPC 处理，详见 Tips）。戴手套，不小心接触各种表面后，比如桌面啊，冰箱把手啊，门啊什么的，要勤换手套。

生物通 eBioTips 3: DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 是强 RNase 抑制剂。0.1%DEPC 处理溶液或者器皿表面，可以通过共价修饰使 RNase 失活。DEPC 按照 0.1: 100 的比例加入试剂中，37 度保温 12 小时，高温消毒 15 分钟可以除去 DEPC 残留，最后得到 DEPC 处理过的溶液，这个浓度对于一般的实验室内去 RNase 污染处理已经足够，对于 RNase 特别高的溶液则可能需要提高 DEPC 处理浓度。但是 DEPC 会和 Tris 的氨基反应而降解，失去灭活 RNase 的能力，所以不能用 0.1% DEPC 直接处理含有 Tris 的溶液。通常可以改用 DEPC 处理过的水来配置 Tris 溶液。已经配好的含 Tris 的溶液，可以用 1% 的 DEPC 处理以灭活 RNase。不过过高的 DEPC 残留可能会影响后继实验。

生物通 eBioTips 4: 溶液残留的痕量 DEPC 会通过羧甲基化修饰 RNA 嘌呤基团，羧甲基化修饰 RNA 在无细胞体系中翻译效率非常低。不过除非大量的嘌呤基团被修饰，通常这种羧甲基化修饰 RNA 和 DNA 或者 RNA 之间的杂交性不受明显影响。所以，对于 0.1%

的 DEPC，一定要 100 度加热处理 15 分钟以上去除溶液中的 DEPC，再进行 RNA 相关实验。

DEPC 产品价格: Sigma 原装 DEPC 是 100ml 的，价格 2700 上下，胜在 Sigma 的金字招牌。市面上有不少分装 Sigma 的小包装 DEPC，虽然价格便宜和国产一样，5ml 价格都在 150-300 元之间。但是很多人还是会心存疑虑，无从得知是否真的进口分装，此前我们见过有试剂公司被投诉用国产试剂冒充进口分装试剂的案例。

DEPC 溶液主要用于处理容器和溶液中的 RNase，对于工作台，加样器等较大面积的表面处理，一些去除环境中 RNA 酶污染的辅助产品更加适合，虽然不是必需的，可要帮助实验室严防死守 RNase，还是挺好用的。RNA 干扰属于探索性的研究，万一得不到预期的结果，到底是由于环境污染破坏还是由于实验设计上的问题，分析起来可就麻烦了，因小失大，耽误文章发表，甚至丢掉唾手可得的成果，岂不冤哉？

Ambion 公司的 RNaseZap 和 RNaseZap

Wipes: 一种含有 3 种有效成分的溶液，接触表面同时就能立即灭活 RNase，对于不适宜烘干或者消毒的表面处理，比如工作台桌面，加样枪表面，或者其他玻璃表面、塑料表面，非常方便，喷一喷，擦一擦，轻轻松松除 RNase。RNaseZap 还可以用来处理指管表面，去除



RNase 污染的同时也不会残留影响酶切反应的残基。RNaseZap 有多贵？250ml 要 825（不能稀释的），4 升 7722 人民币（2007 年公开报价）。Wipes 就类似浸透 RNaseZap 的湿巾，一筒 100 张，报价 908。每次揪一张出来，直接擦拭表面就行，特方便，特适合工作台，加样枪，手套，门把手，电泳槽什么的。3 筒补充装要 2063。用一次要 6 块多到 9 块钱，不过与其出了问题花更多的试剂和精力去重复劳动来弥补漏洞，还不如一开始花费少点来预防。

生物通 eBioTips 5: 如何维持实验室无 RNase 污染？

- 经常定期处理各种表面，防止 RNase 污染。
- 实验全程戴手套，一旦手套触及其他
- 表面立即更换。
- 加样枪专用，
- 选择无 RNase 污染的指管枪头和试剂
- 减少 RNA 实验区通风或者空气流动。

Get Started with RNAi

Silencer® siRNA Starter Kit

- The perfect choice for those new to siRNA experiments
- Includes transfection agent, siRNAs, and three different systems for assessing knockdown
- For use with human, mouse, and rat cells

Just starting siRNA experiments in human, mouse, or rat cells? The *Silencer*® siRNA Starter Kit is perfect for researchers new to RNAi. It provides all of the reagents, protocols, and instructions necessary to help you get underway with siRNA transfection and to ensure that your gene knockdown experiments are successful. The *Silencer* siRNA Starter Kit joins Ambion's suite of products for RNAi research, including guaranteed to silence siRNAs, siRNA delivery agents, and much more.



Gene Company Limited
基因有限公司

A Gene Group Company

基因公司携手Ambion助您
完成RNA干扰实验

Ambion®
THE RNA COMPANY®



香港：852-28966283
广州：020-85524840
武汉：027-87166462
济南：0531-86560825
西安：029-82501170

北京：010-51665161
天津：022-88293136
昆明：0871-5199992
南京：025-83248693
杭州：0571-87229824

上海：021-64951899
成都：028-85254936
沈阳：024-23341315
长沙：0731-4476562
重庆：023-68614842



线路一：非哺乳动物细胞体系的 RNAi 实验和选择

比如果蝇，线虫，拟南芥等低等生物和植物，由于不涉及抗病毒免疫应答反应，通过体外转录即可制备目标基因的 dsRNA(通常 200bp 或以上)，直接用长双链 RNA 进行 RNAi 实验，不需要另外设计 siRNA，因而比较简单。长双链 RNA 的制备很容易，省掉了设计合成单个 siRNA 的麻烦，并且长双链 RNA 在生物体内会被 Dicer 酶降解为多个 siRNAs 混合物，因而往往比单个 siRNA 更有效。长链 dsRNA 的递送方法依细胞种类而异，果蝇培养细胞转染、饲喂或者浸泡线虫、乃至显微注射等方法均可将 dsRNA 递送到目标细胞。dsRNA 得到的是瞬时基因沉默。

体外转录：

常规的体外转录试剂盒通常是设计为体外转录合成单链 mRNA 而设计的，你可以分别合成 2 条单链 RNA，再合并退火。不过你也可以将两个带相同启动子的模板合并一起做体外转录，最后再退火而得到 dsRNA，还可以节省试剂。另外如果 PCR 时在模板两头带上同样的 RNA 聚合酶启动子，就可以用同一个模板在体外转录过程中同时合成双链 dsRNA，省却退火一步，结果只是 dsRNA 两端多了启动子的序列。我们也可以将片段克隆到带 2 个反向相同 RNA 聚合酶启动子之间的载体上达到同样的目的。体外转录试剂选择的要点就是产量，速度；由于要避免 dsRNA 部分序列和其他基因重叠，避免非目标基因的沉默或者脱靶，通常不会选择太长的片断作为 dsRNA 的模板，因此对试剂盒合成 dsRNA 的长度，倒是不一定要求太高。

1. 号称 RNA 公司的 Ambion 是最早推广 RNAi 试剂的厂家之一，去年初被生命科学领域的巨头 ABI 以 2.73 亿美金高价收购其 RNA 部门而震动业界，2006 和 2007 年连续成为美国 The Scientist 杂志最受欢迎的 RNAi 产品品牌大奖，可见其产品声誉和影响力之大。Ambion 特别为非哺乳动物细胞体系的 RNAi

实验推出了 MEGAscript RNAi Kit (20rxns)，以目标基因两端带 T7 聚合酶的 PCR 产物或者质粒为 DNA 模板，提供除模板外，体外转录反应涉及的各种试剂，每次反应可得到高达 80ug 的纯化的 dsRNAs，最长可达 1.2kb。体外转录得到 dsRNA 后，利用试剂盒提供的 DNase 和单链特异的 RNase 降解反应产物中的 DNA 模板和单链未配对的 RNA，最后用试剂盒提供的纯化柱去除蛋白质，核苷酸等杂质后得到纯化的、立即可用于 RNAi 实验的 dsRNA。这个试剂盒的特点是 Ambion 专利的 MEGA 体外转录技术，使得产量高于普通体外转录试剂盒，试剂盒包含了体外转录合成 dsRNA 和后继纯化所需试剂，包括 DNase (消化 DNA 模板)，单链特异的 RNase (用于消化未匹配为双链的单链 RNA)，和 RNA 纯化柱等成分，对以异常敏感的 RNA 实验来说可以省却不少麻烦。4600RMB/20 次反应(每次反应成本 230 多，不计折扣)，——用这种方便齐全又好用的试剂盒做实验，实验过程也是快乐流畅滴。至于付款时的烦恼，留给亲爱的老板吧。

2. 纽英伦 (New England Biolabs) 的 HiScribe RNAi 试剂盒也是一个合成双链 RNA 的试剂盒。这个盒子的特点在于提供了 eBioTech 特刊 <<RNAi 5 年回顾及技术宝典>>



LITMUS 克隆载体,这个载体多克隆位点的两端有反向 T7 启动子序列,将目标基因克隆到载体中后,即可以用试剂盒提供的 T7 引物 PCR 得到两端带 T7 序列的模板,也可以分别用 T7 启动子后的 2 个酶切位点分别单酶切线性化质粒,使酶失活后再混合,得到 2 种不同的模板,再同时进行体外转录,退火,得到除多克隆位点外不含其他冗余序列的 RNA,避免 T7 聚合酶在合成目标基因 RNA 时通读载体上的序列,影响 RNAi 结果。除体外转录试剂外试剂盒提供载体和对照载体, T7 引物,分子量 Marker 等,还需要自行购买 DNase,单链特异 RNase (核糖核酸酶 I) 以及 dsRNA 纯化工具。试剂盒 2007 年价格在 3969 元人民币,可合成总量高达 2mg 的 dsRNAs,长度可达 1.3kb。

3. Promega 公司的 T7 RiboMAX Express RNAi System 也是一个体外合成 dsRNA 的试剂盒。特点是合成速度很快,30 分钟完成体

外转录,适合合成 200-400bp 或者更长的 dsRNA,还可以用于合成 21bp 的 siRNA。产品提供 T7 RNA 聚合酶, Buffer(含 NTP), 消化 DNA 模板用的 DNase 和消化单链 RNA 用的 RNase, 对照模板,最后需要用异丙醇沉淀来纯化得到的 dsRNA。整个试剂盒足够合成最高可达 2mg 的 dsRNA,由于没有配纯化的离心柱,可根据需求决定每次使用试剂的量。不带 Marker 和引物等对照,价格 3195,真不愧是美国“大宝”,价格便宜量又足啊。

4. 如果不怕麻烦,小米加步枪也可以的。通过 PCR 的方法,或者克隆的方法得到两端带有 T7 启动子的基因片段模板,自行组装试剂组合---T7 RNA 聚合酶,单链 RNase, DNase, NTP 等等,也不难,要注意防止 RNase 污染。纽英伦 (New England Biolabs) T7 RNA 聚合酶参考价格为 5000U (50U/ul)才人民币 696 元。



A Better Choice.

Ambion's

siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent

- Works with a broad range of cell lines
- Produces consistent results, lot-to-lot, plate-to-plate, and well-to-well
- Allows use of low siRNA concentrations, which minimize nonspecific effects
- Reverse transfects cells as they are plated, saving a day



Gene Company Limited
基因有限公司

A Gene Group Company

基因公司携手Ambion助您
完成RNA干扰实验

香港: 852-28966283
广州: 020-85524840
武汉: 027-87166462
济南: 0531-86560825
西安: 029-82501170

北京: 010-51665161
天津: 022-88293136
昆明: 0871-5199992
南京: 025-83248693
杭州: 0571-87229824

上海: 021-64951899
成都: 028-85254936
沈阳: 024-23341315
长沙: 0731-4476562
重庆: 023-68614842

Ambion
THE RNA COMPANY®





线路二：哺乳动物细胞 RNAi

实验：siRNA 的设计，合成

前面说过，哺乳动物细胞导入 30bp 以上的长双链 RNA (dsRNAs) 往往会诱发非预期的抗病毒应答反应，所以不能用体外合成成长的 dsRNA 直接导入细胞。常见的做法之一是直接制备 19—27bp 左右的 siRNAs，然后再将 siRNAs 转入哺乳动物细胞。

siRNA 的设计是决定 RNAi 实验成败关键性的第一步。虽然 siRNA 设计法则在不断地完善，可是并非每个设计出来的 siRNA 一定能有效沉默目标基因的表达，也没有办法 100% 预测设计出来的 siRNA 是否有效，所以设计出来的 siRNA 都必须经过实验证实。

直接购买已经证实有效的 siRNAs，好处是已经厂家荧光定量 RT-PCR 预证有效，无需设计、合成和验证，无需顾虑 siRNA 是否有效，便于研究人员把全部精力集中到目标基因功能的研究上，而不需要花费在其他地方——在全球科学家争分夺秒抢夺基因功能研究成果和专利的今天，时间就是金钱，为什么要把宝贵的时间和精力浪费在反复琢磨如何设计和验证 siRNA 上呢？除非你立志成为 siRNA 设计专家。

专业的设计，高质量的合成和纯化，往往只需要很低的浓度就可以达到不错的基因沉默效果，也有助于减少脱靶等非预期反应——需要特别说明的是大多数 siRNA 不能达到 100% 沉默基因表达的效果——毕竟不是基因彻底敲除，只是在转录后水平降解 mRNA，再加上 siRNA 转染本身很难保证 100% 的细胞被成功转染，未转染细胞在检测时也会影响结果——以 RNAi 试剂领域两大领先厂家 Ambion 和 Qiagen 为例，他们把能降低目标基因表达 70% 以上的 siRNA 称为有效，也有些公司的标准更高，如 Bio-Rad 标准是减低目标基因 85% 的表达，Dharmacon 和 Sigma 标准则是

75%。siRNA 算是非常高效的，只需很低的浓度就可沉默基因表达，达到有效浓度后再增加也不会提高基因沉默的效果，反而研究表明过高浓度的 siRNA（超过 100nM 以上）还有可能导致非预期的脱靶反应。所以在实验中，通常就需要摸索条件，以有效的最低浓度为最适浓度以期减少非特异反应。

因此在购买现成的 siRNA，同样的包装量，有效工作浓度不同，每次使用的成本就不用，比如 Bio-Rad 的 27bp siRNA 保证工作浓度是 5nM，Ambion 的保证有效的最高工作浓度是 30nM，多数厂家是 100nM，如果是荧光标记的 siRNA 工作浓度通常达到 100nM。假设同样的量，就算 Bio-Rad 的 27bp siRNA 比 100nM 工作浓度的其他品牌 siRNA 产品贵上 20 倍，二者每次实验使用成本也是一样的！因此，在考虑价格和包装时也要同时留意其有效工作浓度，才好比较价格。当然也需要同时考虑评估标准是用哪种细胞株。以 Qiagen 的资料为例，其验证 siRNA 用于 HeLa、A549 细胞工作浓度为 5nM 足够，用于 HepG2、HEK293、MCF-7 细胞则需要用到 25nM。

虽然很多厂家如 Qiagen 等都在持续进行 siRNA 验证工作，以满足更多研究人员的需求，但是毕竟预证有效的 siRNA 还是有限的，如果你的基因并不在此范围内，你也可以选择

1. 厂家设计定制——只要提供基因的信息，即可由厂家设计合成纯化，还可以按要求修饰和

ebioTech 特刊 <<RNAi 5 年回顾及技术宝典>>



标记。多个厂家提供 NCBI 的 RefSeq 数据库中已有的人类，大鼠或者小鼠的全部基因的 siRNA 定制合成服务，生物通在后面会介绍。对同一个基因通常需要设计 3-5 个不同的 siRNA 以保证其中至少 2 个 siRNA 是有效的，同时可做相互对照。同一基因定制多个 siRNA，相比设计合成单个 siRNA，厂家也会有“套餐”优惠

2. 自己设计再叫厂家合成---如果研究对象不在此列，也可以采用网上免费的 siRNA 在线设计工具来设计，生物通在随后附录一些在线工具的地址以供参考。不过，别指望用不同的设计工具对同一序列设计一定会得到类似的结果---不同的在线工具有不同的设计法则和评分标准，同一序列用不同的在线工具设计得到的结果也可能各不相同

生物通 eBioTips 6: 好的实验设计应该至少选择 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。严谨的实验态度是可靠结果的保证。如果未知是否有效，针对同一个基因选择 3-5 个 siRNA 平行实验是非常有必要的。自 03 年以来，不少文章从浓度、siRNA 作用机制上阐述了导致脱靶反应的原因，这种平行对照更加显得必不可少。

1. 商品化 siRNAs:

已经纯化、买来即用的 siRNAs，简单方便，适合瞬时基因沉默而不适合做长期沉默，不能重复使用。分为预证 siRNA 和定制 siRNA 两种，前者厂家预证有效，后者根据一定法则厂家设计，但是未经实验证实---不过通常能保证 3 个设计中至少 2 个有效，或者 5 个里有 3 个有效(目标基因 70%表达沉默称为有效)。合成好的 siRNA 通常以冻干或者溶液状态提

供，虽然 siRNA 可以在 4° C 条件下稳定 2 周，最好还是放 -20° C 冰箱，避免反复冻融，可稳定 6M 左右。若要长期保存以冻干形式为好。对于定制合成 siRNA，通常可以选择标准纯度(>85%)，HPLC 纯化(>97%)，PAGE 纯度(>97%) 和体内实验纯度。即使是标准纯度的 siRNA 也需要经过 MALDI-TOF 质谱和 HPLC 分析，退火后经过 PAGE 分析的，如果合成量不大，标准纯度已经足够普通的体外实验用，如果起始合成量较大，40nmol 以上或者经过修饰的 siRNA，则最好选择经过 HPLC 纯化。如果是计划做体内实验则需要购买去除内毒素，彻底脱盐的 siRNA。商品化的 siRNA 的量，国外厂家多以 siRNA 产物 nmol 数标识(Invitrogen 是以合成量来标识的，不同的纯化方法得到的产量有不同)，而国内的合成厂家则喜欢用 OD 值表示---由于 OD 值读数易受产物中的其他成分影响，因此需要留意产物纯化方式。参考 Sigma 的数据，1OD 的 19-23bp 产物差不多相当于 5nmol，可做 75 次 24 孔板转染，上海吉玛的数据则是 1OD 产物差不多相当于 2.5nmol。

Qiagen 自从几年前收购了全球知名的 RNA 合成厂家 Xeragon，凭借 Xeragon 在 RNA 合成领域的雄厚技术实力和声望，成功进军 siRNA 合成领域并迅速取得了领先地位。利用 BIOPREDSi 法则进行设计，Qiagen 的 HP Validated siRNAs 正在进行全球最大规模的 siRNA 验证工作，已经得到验证的有超过 2000 多个人类基因的 3500 多个有效 siRNAs。每个 siRNA 都经过至少 4 次独立转染，每次双份的转染实验从而得到 8 个基因沉默效率的数据，每次独立转染都必须经过比较同一个正对照(MAPK)的基因沉默效率(70%以上为有效)进行每次转染效率间的平衡、荧光定量



RT-PCR 同时检测目标基因和。经过和未转染细胞之间的比较，得到的数据经过 $\Delta\Delta CT$ 和管家基因 GAPDH 作为内参进行平衡，定量 PCR 还要通过实验排除污染，引物二聚体，引物发夹结构的影响，甚至连每个目标 mRNA 的溶解曲线也进行监控。这样得到最后能满足沉默效率在 70% 以上的 siRNA 才能被保留入选。这样严格的产业标准是一般实验室所无法实现的。现在 Qiagen 开放提供详细序列信息，每个 siRNA 5nmol 报价 Y4678，按照去年价格战的折扣，不到 3000。Qiagen 网站上还有 FlexiTube 订购组合，一次订购 4 个以上，每个 siRNA 1nmol 价格 90 美元不到，以如此严谨的评估标准得到保证有效的 siRNA，这个价格性价比颇高。1nmol 大约相当于 13-15ug siRNA。

已经验证的 siRNA 毕竟很有限，各厂家还有一种由厂家根据用户目标基因，提供设计合成服务的 Pre-designed 的 siRNA，虽然没有验证，但是经专家设计，并经过严谨筛选，成功率高，也很省事----对于研究基因功能的研究人员来说，集中精力专心研究目标基因的功能，尽快发表研究成果才是主要目标。以 Qiagen 为例，提供针对人类，小鼠，大鼠几乎全部基因的 siRNAs 设计合成。所有设计的序列都经过严格筛选：

----筛选最新基因组同源序列，以避免脱靶反应；

----SNP 筛选以避免 SNP 位点，

----干扰素结构域分析：已知一些结构域会引发干扰素相应，包含这些结构域的 siRNA 要被剔除。Hornung et al (Nature Medicine 2006) 研究表明免疫细胞，特别是浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells) 内吞 siRNA 后会分泌 I 型干扰素。作者还鉴别了 9 个碱基的结构域特别容易引发 IFN-I 分泌。所以，如

果 siRNA 会进入血液就要特别小心避免这类结构。

----3'UTR seed region 分析：有文章表明，某些 siRNA 反义链的 seed region(反义链的 2-8 个碱基)和一些非目标 mRNA 的 3'非编码区不完全匹配 (imperfect matches) 时有可能导致脱靶反应，使得非目标 mRNA 也发生降解。原因是这种 siRNA 可能模拟一个 miRNA 作用。Qiagen 的设计会对 RefSeq 数据库中人类大鼠和小鼠的 3'UTR 序列和 siRNA seed region 的互补性进行分析，并尽量避开潜在可能出问题的序列。(生物通编者注：完全避免这种 imperfect matches 很难，并且匹配并非意味必然会导致问题出现。只是在筛选过程中尽量避免潜在可能出问题的序列。)

这种 Pre-designed siRNA 单个报价不便宜。不过由于一个基因通常需要 3-5 个 siRNAs 同时平行实验，Qiagen 提供的 [FlexiTube GeneSolution](#) 一次订购 4 个不同的 1nmol 的 Pre-designed siRNA，总价格不到 300 美元，价格直逼国内 siRNA 合成价格，加上著名厂家设计合成，还是有吸引力的。Qiagen 还有提供一种根据已发表文献公布的 siRNA 序列合成的商品，如果自己能找到文献也可以直接合成。Xeragon 独有的 TOM RNA 合成专利使得合成 siRNA 纯度 90% 以上。

Ambion 独立的 Silencer Validated siRNAs —— 预证 siRNAs，已经实验验证能有效沉默目标基因 70% 或以上，大小为 21bp；3' 末端以 UU 结尾，涵盖人类 400 多个基因

(www.ambion.com/siRNA)，有 5nmol 和 20nmol 两种冻干粉包装提供。要特别说明的是，由于 Ambion 的 siRNA 3' 末端突出都是 UU 结尾的，完全模拟自然存在的 siRNA，由于在化学合成的过程中，添加 U 的试剂成本



要比 T 贵得多，难度大，UU 末端合成成本要远远高于 TT 末端或者其他末端，因此你会发现，Ambion 的商品 siRNA 要比其他品牌贵不少，有如川菜一般劲辣。同样的，在设计 siRNA 时，Ambion 的所有产品设计原则也是优先寻找 mRNA 序列中带有 AA 的下游 19 个碱基（得到 3' UU 末端），也就是务求令 siRNA 的 21 个碱基完全匹配 mRNA 序列。尽管 Tuschl 本人后来也表示 siRNA 3' 末端的 UU 作用并不很大，多数公司设计是直接找 19nt 序列后直接加 TT，这样设计难度也小很多，但是 Ambion 公司却一直坚守 UU 法则，不曾放弃。Silencer Validated siRNAs 现在的序列信息也免费开放提供，包括厂家验证的数据都一起提供。由于 Ambion 公司提供的预证 siRNA 工作浓度为 30nM，比多数厂家 100nM 的有效工作浓度要低很多，就算同样包装大小的 siRNA 比别人贵 3 倍，每次实验成本也还是 Ambion 的划算点。知识产权，或者说服务创造价值，大概就体现在这里吧。

由于 Ambion 给 ABI 收购了，所以买 Ambion 的 siRNA 还可以直接购买 ABI 公司提供的相应基因的 Taqman 荧光定量 RT-PCR 试剂盒，非常方便，用不着打着灯笼到处搜罗不同品牌的试剂，为联合国大军之间的配合作战而烦恼了。正好 ABI 公司大量人类基因的荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒也非常出名，这样就可谓一步到位，只可惜价格很高贵。

Silencer Pre-designed siRNAs——预设计 siRNAs，是 Ambion 公司联手 Cenix BioScience 公司以业内非常成熟的 siRNA 设计软件来设计。除了已知的公开法则，包括我们前面提及的坚持优先序列中的 AA 下游 19 个碱基，务求 21 个碱基完全和 mRNA 匹配，3' 端 UU 突出结尾等完全模拟自然 Dicer 酶

切结果，还包括了多年的实验心得，比如 siRNA 反义链的 3'端 GC 含量高，5'端 GC 含量低有助于提高 siRNA 效率；此外该软件并非只顾埋头设计，还会对已知序列进行检索以避免和其他基因同源而导致脱靶反应，还要检索已知的 SNP 库以避免 SNP 位点，已知的蛋白质结合位点如 CpG 位点也要避开（蛋白质结合位点会影响 RICS 复合物与 mRNA 的结合）等等工作；以沉默效率 70%以上作为评估成功标准对其设计进行验证测试：针对 400 多个人类内源转录本（包括难设计的基因）而设计的 1100 多个 siRNAs 成功率高达 82%以上——因此，Ambion 保证 3 个以上针对同一目标基因而设计的 siRNA 中至少有 2 个能使目标基因的沉默效率达到 70%或以上，同一基因你订购 3 个 Pre-designed 的 siRNAs 就可以了，3 个里正好有 2 个有效 siRNAs 可以作为平行对照。厂家提供 NCBI 的 RefSeq 上列出的人类、小鼠和大鼠的全部基因的 siRNAs，品种很齐全，是由化学合成的、已经纯化和退火的即用型 siRNA，当然，序列信息是提供给你的。5nmol 标准纯化的价格在 2600-3200 之间。

著名的仪器厂家 **Bio-Rad** 也加入 RNAi 产品大军中，根据 2005 年 Kim 和 Rose 等人在 Nature Biotechnology 上发表的文章，独树一帜地提出 27bp 的 siRNA（Bio-Rad 称之为 Dicer 底物 siRNA）能够在 RNAi 信号通路更上游环节——Dicer 酶切割双链 RNA 步骤中有效地激活 RNA 干扰信号通路，更加真实的模拟体内的 RNA 干扰发生过程。较之 21bp 的 siRNA，27bp 的 siRNAs 能够实现对目的基因的大于 100 倍的抑制效果，可以在低浓度水平实现对目的基因的高效抑制，减少了高浓度条件下 siRNA 分子的 off-target 效应。Bio-Rad



提供的siLentMer Validated Dicer-Substrate siRNA Duplexes, 均保证在 5nM的工作浓度下, 实现对目的基因>85%的干涉效率。

siLentMer 验证的siRNA 不仅可以用于实现对目的基因的高效抑制,而且可以用来作为实验的阳性对照或者阴性对照。基于生物通前面提及的理由,针对每一个目的靶基因,Bio-Rad 提供 2 对siLentMer 验证的siRNA,确保了目的基因特异干涉的可靠性。这个参数相当漂亮,工作浓度小到 5nM,基因沉默效率 85%以上,27bp的siRNA确实有过人之处,我们前面算过,就算同样包装的产品比其他工作浓度要达到 100nM的产品贵 20 倍,每次实验成本也是一样的。目前已经推出的有人类 30 多个基因的siRNA,即将再推出 30 多个基因的 siRNAs。就是品种太少(查询:

www.bio-rad.com/RNAi/)。对于前者没有的基因,可以尝试siLentMer non-validated siRNA,设计遵循同样的高级算法,针对每一个目的靶基因提供 4 对siLentMer非验证的 siRNA,确保了目的基因特异干涉的有效性。值得一试。值得注意的是 2006 年Dharmacon 公司在《RNA》上发表的文章提出 23bp以上的siRNA会影响细胞活力和引起IFN响应,因而提出应该关注 27bpDicer底物的非预期反应。这个不妨增加对相关的基因表达情况的检测来进行评估。另外 27nt 的siRNA由于还需要经过Dicer酶切,所以不适合目前过度修饰的方法,

Sigma 公司的化工试剂在业界的声望就如同 IBM 的金字招牌,近年也来大举进攻分子生物学领域的研究试剂。**Sigma** 拥有著名的 Proligo 公司强大的生产技术平台,是四大拥有 MIT 专利授权合成 siRNA 的公司之一,专利的合成技术令产品质量更有保障。采用著名

的 Rosetta siRNA 设计法则,TT 结尾设计,专职的 siRNA 设计专家可针对用户的要求与设想提供专业的设计服务,只需要提供 Gene ID 或基因名,可以选择位置偏好和种属特异性、纯化方法、产量,修饰等要求,就可以度身定制得到想要的 siRNA, **Sigma** 保证每 3 条 siRNAs 至少 2 条沉默效率 75%以上。事实上, **Sigma** 合成的 siRNA 纯度很高,完全不需特殊的 HPLC 或者 PAGE 纯化即可进行有效的 RNAi 实验。目前体验价仅为 ¥3120/3 对 siRNA 设计合成。价格可亲。

Dharmacon 公司早在 2004 年发表在 Nature Biotechnology 上的文章提出了 siRNA 设计的 8 大原则,包括 GC 含量控制,3'端碱基偏向性,减少重复序列、特异位点的碱基偏好性等等。随着研究的深入, **Dharmacon** 的 SMARTselection 参数设计在传统的 8 个控制参数基础上,增加诸如 SNPs 位点、高度冗余序列和高度同源序列、siRNA 反义链“seed region”以及某些毒性或者干扰素 motif 的过滤。**Dharmacon** 公司的 siRNA 商品和前面介绍的预证 siRNA 不同-----它不是一个一个单独验证有效,而是以 SMARTpool 形式提供,即将 4 条由 SMARTselection 技术设计的 siRNA 按照比例混合,确保对任何人、小鼠和大鼠三个物种已知基因有高效沉默性(证标准条件下沉默基因表达水平 $\geq 75\%$,超过 85%的 SMARTpool siRNA 试剂可以沉默靶基因表达水平至少 90%甚至更高)。混合 siRNA 提高了实验的成功率,5nM 的价格目前的市场报价为 3900RMB,不用验证也可确保有效沉默(很取巧的方法)。**Dharmacon** 还会根据最新的 NCBI 序列数据库中靶基因序列的更新而升级相关产品。

不过,鉴于混合 siRNA pool 无法了解到



底那个 siRNA 真正有效，混合 siRNA 有引发副反应的可能且难以排除，Dharmacon 也为已经买过 SMARTpool 产品的用户提供 SMART pool upgrade（如果你不买 SMARTpool，可以选择购买 Set of 4，设计方法都一样的，但价格要贵几乎一倍），即以 4 条单独的 siRNA 形式提供。4 条独立的 siRNA 针对目标基因的 4 个不同位点，提供序列信息；保证 4 条 siRNA 中有 3 条可以有效沉默目的基因表达水平至少 75%。由于单条的双链 siRNA 可以不受混合 siRNA 试剂的影响而对其功能进行单独分析；降低因个别序列引起的脱靶效应，有效降低实验结果假阳性，只需收获您的阳性结果，减少反复筛选实验的需要，一步到位沉默靶基因。如果每个 siRNA 2nmol，4 个报价 ¥3900（Set of 4 ¥7140，OnTarget Plus 的价格 ¥8400.）。如果你不想要 4 条——厂家保证 4 条里有 3 条 75% 有效，最差的也保证 50% 有效，单独购买每条报价 ¥2340（5nmol）。

Dharmacon 公司最新研究成果表明：siRNA 的 Seed Region（反义链 2-7nt 序列）和 mRNA 的 3'-UTR 的匹配关系与基因沉默中的脱靶效应相关，因此，单独对正义链的修饰失活并不能完全降低脱靶效应。Dharmacon 公司 ON-TARGETplus siRNA 不单通过修饰正义链阻止其与 RISC 的相互作用，并促进反义链与 RISC 的相互作用；并且通过修饰反义链的 Seed Region 从而将种子 Seed Region 相关的脱靶效应降到最低，结果表明双重修饰减少脱靶效应可达 90% 以上，真正意义上排除基因沉默中的脱靶效应，有助于提高 siRNA 的特异性，降低假阳性，增加基因沉默实验可信度。5nmol 的 SMARTpool ON-TARGETplus siRNA 报价 ¥5100，Upgrade 则 4860。

Dharmacon 所提供的 siGENOME 试剂是相当全面和灵活的基因沉默平台，它支持研究

的各个阶段，比如从最初的药物靶点筛选到后来临床治疗阶段效果的确认。目前为止已涵盖人、小鼠和大鼠三个物种的基因组范围内 NCBI 基因序列数据库中所有已知基因，有超过 81,000（包括人，小鼠，大鼠）个基因的 siRNA 试剂。

Invitrogen 的 Stealth™ RNAi 是经过修饰的 siRNA，由于 siRNA 双链中的任一条可以和 RISC 结合进入 RNAi 通路，不起作用的正义链进入 RNAi 体系潜在会和其他基因同源而引发脱靶反应，也可能影响 RNAi 效果。

Invitrogen 的 siRNA 经过修饰，正义链不会进入 RNAi 途径，而且据说能提高 siRNA 在血清中的稳定性，在细胞培养中效果最长可达 2 周。

除了那些赫赫有名的牌子，不少新兴公司也力争以更个性化的服务和更灵活的价格挤入 RNAi 这个新兴的市场。韩国 Bioneer 公司 AccuTarget validated siRNA 也是已证明敲除效率的 siRNA，当以 100nM 的浓度转染时，保证有大于 70% 的敲除效率。每个靶基因提供两条 Validated siRNA，同时出售 Validated real time PCR 引物，可以用实时定量 PCR 仪加 SYBR® 荧光染料进行敲除效率分析。AccuTarget 基因组预设计 siRNAs 包含人，小鼠，大鼠基因组的约 44,000 个基因，每个目的基因有三条得分最高的 siRNAs，当以 100 nM 浓度转染时，83.8% 的被测 siRNAs 诱导了大于 70% 的敲除，其中 38.1% 的被测 siRNAs 表现出大于 90% 的敲除率。

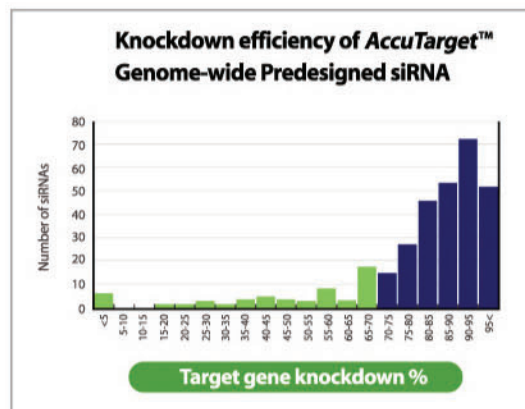
Santa Cruz: RNAi 真是火啊。连著名的抗体生产厂家 Santa Cruz 也加入了 RNAi 产品线，提供主要包括人类、小鼠在内的多种哺乳动物 10000 多个基因的 siRNAs（20-25nt），参考 2007 年生物通商城的标准报价是 3150，

AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNAs

- 含人, 小鼠, 大鼠基因组的约44,000个基因
- 每个目的基因有三条得分最高的siRNAs
- 当以100 nM浓度转染时, 三条候选siRNAs中至少有两可以使靶mRNA表达水平降低大于70%

图3. AccuTarget™预设计siRNAs的高效率

为检测预设计siRNAs的敲除率, 用100 nM 浓度的siRNA 转染HeLa细胞。转染后24小时, 提取总RNA并用实时定量PCR检测靶mRNA的表达水平。数据显示使用Bioneer Turbo si-Designer设计的siRNAs的效率: 83.8%的靶siRNAs诱导了大于70%的敲除, 38.1%的靶siRNAs表现出大于90%的敲除率。



AccuTarget™ validated siRNAs

已证明敲除效率的siRNA, 当以100 nM的浓度转染时, 保证有大于70%的敲除效率。每个靶基因提供两条Validated siRNA, 同时出售Validated real time PCR引物, 可以用实时定量PCR仪加SYBR®荧光染料进行敲除效率分析。

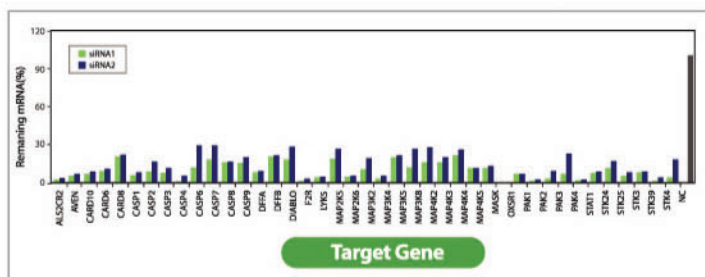


图4. Validated siRNA的敲除效率。用Validated siRNA转染HeLa细胞, 然后用实时定量PCR检测敲除率。靶向mRNA的表达水平用百分比表示。对比用Validated siRNA处理过的HeLa细胞和用Negative Control siRNA处理的HeLa细胞的mRNA表达水平。

AccuTarget™ siRNAs library for Human

Bioneer现提供24个siRNA文库, 每个靶基因可以任意选购1, 2或3条siRNA, 新的文库套装会不断更新。

AccuTarget™ siRNA library			
Gene Family/ Functional Class	Human Genes	Gene Family/ Functional Class	Human Genes
Caspase pathway	37	Isomerase	104
Kinase	701	Ligase	272
Phosphatase	188	Ligase	123
NF-κB pathway	22	Oxidoreductase	551
Apoptosis	290	Transferase	1432
Cell cycle	113	Motor	122
Antioxidant	38	Receptor	1526
Nucleic acid binding	2589	Ubiquitin	77
Cyclase	22	Tubulin	20
Deaminase	22	Transporter	1023
Helicase	115	Cytochrome P450	52
Peptidase	495	GPCR signalling	732

AccuTarget™ Control siRNAs

Positive Control siRNAs (Human GAPDH, GFP, Luciferase)

Negative Control siRNAs (commonly used for Human, Mouse and Rat)

● GAPDH-siRNA

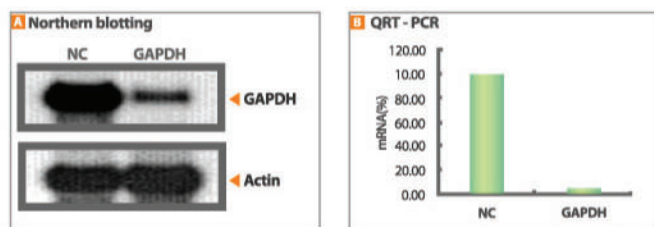


图5. 用浓度为100 nM GAPDH和NC(negative control)-siRNA转染HeLa细胞。转染24小时后, 从转染细胞中提取总RNA并用实时定量PCR和Northern blot 检验。从图. 1B中可以看出。转染24小时后, 用GAPDH-siRNA处理过的细胞中仅有3%的GAPDH mRNA残留。这表明使用Bioneer的Positive control GAPDH-siRNA可以轻易地高效率敲除GAPDH mRNA。

● GFP-siRNA

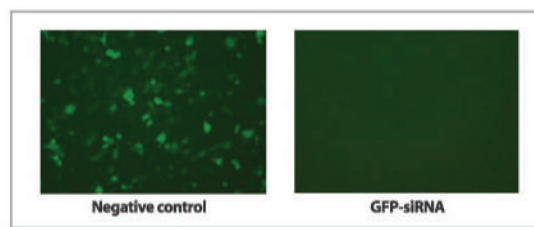


图6. HeLa细胞置于24孔板中, 同200 ng的CMV-GFP质粒和10 nM的GFP siRNA用转染试剂共同转染。隔夜, GFP的表达水平用Nikon公司的Eclipse TS epi-荧光显微镜进行观察。对比在NC-siRNA转染的细胞中出现明亮绿色荧光的GFP蛋白, 在GFP-siRNA处理的细胞中没有检测到荧光。表明使用Bioneer的GFP-siRNA可以轻易地高效率敲除GFP。

● Luciferase-siRNA

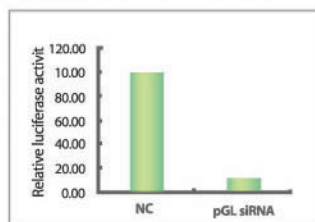


图7. HeLa细胞置于6孔板中, 同400 ng的CMV-luc质粒和10 nM的荧光素酶-siRNA用lipofectamine2000共同转染。隔夜, 收集细胞并检验荧光素酶的活性。从图6中可以看出共同转染细胞的敲除率。用Bioneer阳性对照荧光素酶-siRNA处理细胞导致了荧光素酶活性的有效降低(与NC-siRNA处理的细胞相比表现出85%-95%敲除率)。

• Negative control siRNA (NC-FITC)

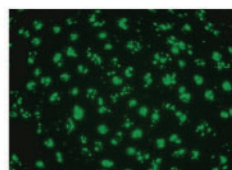


图8. 用FITC-标记的siRNA转染的HeLa细胞在共焦显微镜下观察。细胞中观测到荧光表明了靶细胞被siRNA成功转染。



足够做 50-100 次转染。异曲同工之妙，就妙在除了提供 siRNA 对应的 RT-PCR Primer(货号以 PR 结尾) 作为 mRNA 检测(用 SYBR Green 荧光定量法检测)，Santa Cruz 公司同时提供对应目标蛋白的自家抗体，你可以顺便购买相应的抗体(不用自己费心去找合适的抗体)，以便做完 siRNA 实验后检测目标蛋白沉默的效果。

2. 强大高效的 siRNA 文库

独立的 siRNAs 可用于研究单个基因的功能，可后基因组时代的今天，研究人员已经不满足于一次“缺失”一个基因这样的研究节奏，功能基因组学更需要能站在全局高度研究多个基因之间关系的工具，siRNAs 文库应运而生。如果说基因芯片可以全局高通量地研究缺失某个基因对整个基因组表达产生的影响，那么 siRNAs 文库则便于同时研究多个基因分别缺失时细胞的变化，从而进行大规模筛选研究基因和功能的关系。

Silencer® CellReady™ siRNA Libraries

可以说是 RNAi 芯片的雏形----我们在这里可以看到，源自高通量的矩阵芯片概念和 RNA 干扰结合，使得 RNA 干扰不再局限于一次一个基因样本沉默的实验，而可以象芯片一样，一次同时进行多基因高通量大规模批量筛选，从而得以站在全局的高度研究不同的基因沉默之间的相互关系！人类基因中特定的某些组，分装在 96 孔板的 siRNA 库，形成类似“矩阵”的组合，每孔 3pmol，可供一次直接转染使用，终浓度 30nmol (Ambion 公司 siRNA 保证有效作用浓度)。同样严谨的，每个基因对应 3 个不同的 siRNA，分别在 3 块 96 孔板的同一位置上以便相互参照平衡。每板留有 8 个空白孔和 8 个对照孔，用户可以选择多至 4

个 Ambion 的对照 siRNA (2x4)，空白孔留给你做无转染的空白对照或者不加 siRNA 的负对照。配合高效快速的反向转染技术----先用培养基稀释 siRNAs 于 96 孔版，批量加入用培养基稀释的转染试剂于 96 孔板中，温育形成转染复合物，再批量加入胰酶消化收获的细胞于 96 孔板中铺板，直接培养 24--48 小时即可检测。这种技术已经在 06 年在 Nature 上有发文章，可以参考生物通相关新闻。多么富有想象力的创新之作！在后基因组时代的今天，在这个全球研究人员不断加速研究各种基因功能以抢夺明日专利的时候，这个雏形的 RNAi 芯片，再次为我们的研究提速，提速。真的是只怕想不到，不怕做不到。生物通还会在后继的文章中详细介绍这种新技术。

更惊人之作来自赛默飞世尔旗下的 **Dharmacon** 公司。去年业界最大的一宗并购案是热电(Thermo Electric)和飞世尔(Fisher)合并为赛默飞世尔----当今业界最大的公司。旗下 Dharmacon 公司不愧是 RNAi 试剂市场上的领头羊之一，率先推出世界上第一个全基因组 siRNA 文库，靶向基因包含整个人类基因组共计接近 22000 条基因！毫无疑问，全基因组 siRNA 文库将大大加速药物的研发并增加科学家对疾病的机理了解。96 孔板提供，一次实验就可以分析上百条基因，实现真正意义上的高通量检测。而且保证靶基因沉默效果 75% 以上！今年 4 月发表于 Nature 的一篇文章表明，应用这个全基因组 siARRAY®文库中的 SMARTpool siRNA 文库研究一种肺癌细胞，发现分别沉默其中 87 个基因后可使肺癌细胞对紫杉醇药物敏感性提高 10000 倍！也就是说这 87 个基因中的某一个或者某一组将有可能与肺癌细胞耐受紫杉醇有关，又或者说针对这组基因中的某一个或者某几个的 siRNA 有可



能成为提高肺癌紫杉醇治疗方案的辅助药物。多么令人鼓舞的结果!对于制药业来说可能提供另一种全新的思路---在开发一种新药如此困难和高成本的今天,如果能找到短期提高药物敏感性成千上万倍的 siRNA 作为原有药物的辅助治疗手段,不也是一种有效的方法吗!如果不是 siRNA 文库的出现,要得到这样的成果需要花费多少时间和代价,简直难以估计。诚如文章作者怀特博士所说,这种 siRNA 必将大大加速药物的研发过程,并增进科学家对疾病的机理了解。这种新一代技术研究工具之强大,实在令人惊叹。

人类全基因组 siRNA 文库筛选虽然效率惊人,但也是相当奢侈的,好在除了人类全基因组 siRNA 文库, Dharmacon 还提供细分为不同信号通路或者基因家族共计 30 多种 siRNA 子文库,供不同的研究方向使用。此外 Dharmacon 公司还提供小鼠全基因组共计 16500 多个基因的 siRNA 文库和不同信号通路或基因家族的子文库。以 4 条 siRNA 混合的 SMARTpool 形式和单独 4 条 siRNA 的 Upgrade 或者 set of 4 这两种形式。

Dharmacon 最新提供 RTF 形式的文库,就是反向转染 Reverse Transfection Format---和 Ambion 设计一样, siRNA pool 混合试剂预先铺板在 96 孔培养板上,只要先加入培养基和转染试剂的混合物,温育形成转染复合物,然后再直接铺细胞培养。比传统转染方法节约一天的时间,对于 22000 多个基因如此庞大的容量, RTF 形式确实能减少很多工作量。另外对应每一种文库, Dharmacon 还有独特的 ON-TARGET 技术修饰的 siRNA 文库---研究表明 siRNA 中真正有效的是与 mRNA 互补的反义链,然而 siRNA 进入体内后,正义链和反义链都同样可以和 RISC 复合物结合进入 RNAi 信号通路从而影响基因沉默效果,正义

链还会增加脱靶反应的可能,经过 ON-TARGET 技术修饰的 siRNA 有效避免正义链与 RISC 结合,增强基因沉默特异性并最大程度降低脱靶效应。

生物通 ebiotips7: 对于超大型的文库,推荐首先选择 pool 混合 siRNA 形式进行初筛,一则能减少一半以上的工作强度,二则以混合 siRNA pool 的形式能确保有效基因沉默,减轻数据处理的工作量,更无需花精力来分析无效 siRNA 数据。但有资料表明,用 Pool 混合 siRNA 的形式做 RNAi 实验潜在有引起非特异抗病毒反应的可能,因此,初筛找到潜在目标后应该再单独购买独立的 siRNA 再进行平行验证实验(细筛),即可分析到底哪个 siRNA 有效,是否有脱靶反应等等,这样不单可以节约费用和实验操作、数据分析的精力,也同样能确保实验严谨。但是对于单个基因,我们还是更推荐单个 siRNA 平行进行实验,而非 pool 的形式。

生物通 ebiotips8: 对于大型 siRNA 文库,优先选择 RTF 形式的文库。相比传统的转染方法---可以节约 1 天的培养时间,也节省稀释 siRNA、加入转染试剂预混合温育,再转移到培养板上等移液步骤,节约不少手工操作和试剂,降低 RNase 污染,特别适合高通量大规模的 RNAi 实验。实验结果表明,反向转染得到的 RNAi 结果与传统方法结果一致,而且需要的转染试剂和 siRNA 的量更少,更节约。

现在几乎每个有提供 siRNA 销售的厂家都有提供包括人类全基因组、潜在药物靶基因、癌症、激酶,凋亡、GPCR,蛋白酶,核受体,离子通道的 siRNA 文库,也可以定制由客户指定的基因群的 siRNA 文库。这些成套定制的 siRNA 文库便于研究人员批量研究



不同基因功能缺失(loss-of-function)对细胞和其他基因的影响。每个厂家的产品大多围绕人类、小鼠、大鼠的基因组，药物靶基因、信号通路来设计，用户可以参考库容量(基因数目)和具体组成、每个基因 siRNA 数目，siRNA 量，以及对照的情况，当然还有价格来进行选择。Ambion 公司 **Silencer® siRNA Libraries**、Sigma 公司 Mission siRNA Libraries，Qiagen 的 siRNA Sets，Dharmacon 公司，韩国 Bioneer

的 AccuTarget Libraries 等都有类似的产品可供选择。详细信息可以到以上各公司网站查询。生物通小编本来做了一个针对各公司同类文库的库容量、siRNA 供应量、工作浓度、每基因 siRNA 数目、对照情况、操作性和价格等数据的比较，可是做着做着发现内容相当庞大，并且难以罗列具体的基因列表，加上随着研究的不断推进，这些 siRNA 文库也会不断升级，我们只好暂时放弃平行比较了。

Silencer® siRNA Libraries for RNAi Screening Projects Large and Small

- Human Genome
- Druggable Genome
- Kinase
- Transferase & Related
- GPCR
- Protease
- Transporter
- Receptor and Related
- Phosphatase
- Ion Channel
- Molecular Motor
- Neurotransmitter

And More...

Speed up functional analyses of important gene classes with libraries of highly effective siRNAs.

Ambion uses optimized design, extensive functional testing, state-of-the-art equipment, and rigorous quality control to produce our premium quality siRNA libraries, so you get results you can trust.

- **Effective** —
siRNAs designed for maximum potency and specificity
- **Convenient** —
Ready to use and plated to your specifications
- **Economical** —
Cost effective solutions for RNAi screening
- **Customizable** —
Custom aliquotting and custom libraries available



Gene Company Limited
基因有限公司

A Gene Group Company

**基因公司携手Ambion助您
完成RNA干扰实验**

Ambion
THE RNA COMPANY®

香港：852-28966283

广州：020-85524840

武汉：027-87166462

济南：0531-86560825

西安：029-82501170

北京：010-51665161

天津：022-88293136

昆明：0871-5199992

南京：025-83248693

杭州：0571-87229824

上海：021-64951899

成都：028-85254936

沈阳：024-23341315

长沙：0731-4476562

重庆：023-68614842





3. siRNA 设计和合成

市面上已经有人类、小鼠和大鼠的全部基因的 siRNA 可售，以及五花八门的各种基因 siRNAs，生物通小编正在整理有关数据，并准备将整理好的相关数据放在生物通商城中便于大家检索，工作正在进行中。。。尽管如此，还是有更多未开垦的处女地----对于没有已知有效的 siRNA 的基因，就只能自行设计和定制合成 siRNA。如果，不巧，你的实验找不到现售或者已知有效的 siRNA----实验不巧会麻烦一点儿，不过也说明你有机会得到前人没得到的结果，说不定更幸运呢！只是动作一定要快哦！

siRNA 设计

siRNA 的设计是决定 RNAi 实验成败关键性的第一步。并非每个 siRNA 都能有效引发基因沉默。和引物设计一样，设计有效的 siRNA 也有一些经过前人经验总结出的规则，而且这些规则随着对 siRNA 研究的深入也在不断完善之中。有一些开放的免费在线工具可用。付费的软件成功率比较高，3 个保证中 2 个。只是国人习惯了免费软件，愿意为软件或者实验设计付费的真不多，宁愿自己辛苦点。。。所以，生物通小编总结了部分成功经验以供参考。还有免费的在线设计工具一一。

生物通 eBioTips9: 如果是自行设计 siRNA 的话，一个目标基因至少设计 3-5 个以上的 siRNAs，平行实验以期提高成功率。据评估，随机设计的 siRNA 有 25% 的机会有效沉默基因表达（减少 75%-95% 以上的 mRNA），一半以上的几率能达到 50% 的沉默效果。

生物通 eBioTips10: siRNA 的反义链 3'

端最好以 UU 结尾，这被公认是最有效的的 siRNA 结构。现在以其他碱基结尾的 siRNA 也有报道能成功引发 RNAi，你可以尝试。不过如果是体外转录合成 siRNA，要避免以 G 结尾，因为后继处理时 RNase 会切除末端的 G。

生物通 eBioTips11: 多个 siRNAs 位点最好分散分布在 mRNA 全长上。没有数据表明 siRNA 在 mRNA 上的前后位置和 RNAi 效果有什么特别的关系。如果 siRNA 位点因为 mRNA 二级结构或者蛋白结合的屏蔽而影响 siRNA 效果，分散分布可以减少风险。不过，也有报道说，如果可能，最好能避开起始的 50—200 个碱基，以避免潜在的调控蛋白结合位点。

生物通 eBioTips12: 避开和其他基因同源序列，以免“误伤群众”。潜在的目标序列都到这里 BLAST 一下，
www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST，和其他基因有 16 个以上碱基同源的序列一定枪毙掉。

生物通 eBioTips13: GC 比例 30%-50% 比高 GC 含量的 siRNA 的成功率要高些。有较多选择时留意。不要有连续 9 个以上的 GC。也尽量避免出现连串的某个碱基。根据 Schwarzs 的文章，由于 siRNA 双链上只有一条链会结合 RISC 上，究竟哪条链取决于 RNA 解旋酶，而正义链 5' 端以 GC 开头，且 5' 端 1—4 个碱基 GC 含量高，且 16—19 位碱基 GC 含量低的序列得到的 siRNA 反义链 5' 端 GC 含量低 3' GC 含量高（也有研究表明反义链 5' 端前 7 个碱基至少有 5 个 AU），使得反义链比较容易正确结合 RISC，因而基因沉默效果比较好。



生物通 eBioTips14: 如果是 shRNA 表达载体, 用的是 RNA 聚合酶 III 类的启动子如 U6, 最适合的结构是 5'GN (19), 后面连续 4 个 U 结尾即可令转录终止, 要避免序列中 j 减出现连续的 U/A。

免费 siRNA 在线设计工具: 这里介绍的有知名厂家提供的免费设计工具, 也有来自学院派研究人员自行设计公开的在线工具。生物通前面也提到, 不同的在线设计工具采有不同的设计法则, 而这些年来这里设计法则还真不少, 各不相同----显然没有哪个设计工具或者设计法则是完美的----既然有这么多免费工具可用, 你总归会想都尝试一下, 将自己的目标序列分别用不同的在线工具设计, 期望得到相近的结果, 似乎更有把握些----别指望太高, 同一目标序列用不同的法则设计得到的结果很可能各不相同。很难说哪个比较好, 哪个不好。实践是检验真理的唯一标准(汗, 我现在才发现以前死记硬背的政治课不是白学的)。

芝加哥大学的 Anne Cahill 这样说: “我比较喜欢采用 siSearch 网站来设计 shRNA。我喜欢是因为它可以根据一些列公开的设计标准返回一个评分。我并不相信某一个网站或者某一类设计法则是完美的, 我曾经试过 8 个 siRNA 设计网站, 输入同一个序列, 希望找到一致的目标位点, 不过结果令人绝望。所以我不会仅仅盲目的选择 siSearch 评分最高的序列, 我会尝试其他标准比如预测反义链二级结构和目标 mRNA 上的定位, 同时再看看 RNAi Consortium 或者 RNAi Codex 有没有我的目标序列。”

以下列出了部分著名厂家的免费在线 siRNA 设计工具-----真正最好的设计只怕有所保留, 不然在商言商, 人家怎么赚钱呀----话说回来, 既是著名厂家提供的, 应该也会考

虑商业名誉, 因此多数是初级版(Ambion 就这么坦白说的)。此外生物通还列出一些学院派的研究人员自建的设计工具, 以及一些公开的 siRNA 信息数据库。仅供参考。

Whitehead Institute开发的工具: 这个可以自定义你认为有用的计算法则, 删除你认为不需要的法则, 非常灵活。而且会不断检索最新的法则并添加进去。

<http://jura.wi.mit.edu/siRNAext>

siSearch (这个前面提到的可以给设计结果评分的)

http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.7.html

sFold:

<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>

RNAi Consortium:

http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/rnai.html

RNAi Codex:

<http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl>

siRNA User Guide (by Tom Tuschl)

<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>

shRNA Designer

<http://shRNAdesigner.med.unc.edu>

厂家免费工具:

Ambion公司:

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

Dharmacon公司siRNA设计工具

<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>

Dharmacon公司Seed Locator

<http://www.dharmacon.com/seedlocator/default.aspx>

Promega公司:

<http://www.promega.com/siRNADesigner/>

Invitrogen公司:

<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>

Genelink公司:

<http://www.genelink.com/sirna/RNAicustomorder.asp>



韩国 Bioneer 与韩国国家基因组信息中心合作研发了一种专利的 siRNA 选择淘汰系统, 称为 Turbo siRNA designer。该系统能高效确认 siRNA 靶点, 有很高的成功率。Turbo si-designer 的性能评估通过设计数百个 siRNAs, 经实时 PCR 分析检测其敲除效率来

实现, 可以较高概率地预见到能够进行有效基因敲除的功能性 siRNA。评分低的 siRNAs 大多是无功能的, 无效的 siRNAs 被 Turbo si-designer 有效的去除。只需把靶基因序列 (名称和 Genbank 号) 发送至 ts@bioneer-bj.com 即可获得设计。

Move Your siRNA Experiments in Vivo



Silencer[®] In Vivo Ready siRNAs

- Ready for formulation or direct injection into animals
- Provided in convenient 100, 250, 1000, and 10,000 nmol sizes
- HPLC purified, salt free, sterile filtered, and endotoxin tested
- Quality you can trust

For siRNA induced gene silencing experiments in animals, high quality siRNA is critical. Ambion's Silencer In Vivo Ready siRNAs—the highest quality siRNAs available anywhere—provide the extra level of purification and testing required for injection into animals. After HPLC purification and annealing, each siRNA is dialyzed to remove salt, sterile filtered, and endotoxin tested. This extra level of attention enables dosing strategies in mice of up to 50 mg/kg.

 **Gene Company Limited**
基因有限公司 A Group Company

**基因公司携手Ambion助您
完成RNA干扰实验**

Ambion
THE RNA COMPANY[®]

香港: 852-28966283
广州: 020-85524840
武汉: 027-87166462
济南: 0531-86560825
西安: 029-82501170

北京: 010-51665161
天津: 022-88293136
昆明: 0871-5199992
南京: 025-83248693
杭州: 0571-87229824

上海: 021-64951899
成都: 028-85254936
沈阳: 024-23341315
长沙: 0731-4476562
重庆: 023-68614842





4. siRNA 的制备合成

设计完了，就到合成制备 siRNA 了。要得到小分子双链 RNA，除了简单方便的化学合成，也可以用体外转录合成小分子 RNA，此外还有体外转录长双链 RNA，模拟自然状态下 siRNA 生成过程----用 Dicer 酶或者 RNaseIII 切割为 siRNAs 碎片----这个方法不需要设计具体的 siRNAs，由于得到的是 siRNAs 混合物，基因沉默成功率比单一的 siRNA 要高。不过还是要按照一定的规则如避开与其他基因同源区域等原则选择体外转录的片段。用载体表达 shRNA(前面提到的线路 3)，我们留到后面讨论。

4.1 siRNA 4 种制备方法之比较:

- 化学合成----化学合成是最常用的方

4 种 siRNAs 合成方法各有所长。如何选择合适的自己实验需求的 siRNAs 合成方法？生物通小编在这里为你列表说明，我喜欢表格的简单，清晰，明确，虽然我写文章比较的罗嗦。

siRNA 制备法	化学合成	体外转录合成 siRNA	体外转录+Dicer 酶切	质粒/病毒载体表达 shRNA
siRNA 制备流程	1.自行设计长 20-25bp 的 siRNAs 2.选择可信赖的合成厂家，定制合成 siRNAs	1.自行设计 siRNAs 2.订购 DNA Oligos 引物 3.体外转录/退火 5.DNase 和单链特异的 RNase 消化未匹配的单链 RNA，DNA 6.过柱纯化	1.设计/制备目标长链 DNA 模板 (200-800bp，一端或两端带启动子) 2.体外转录/退火 3.Dicer 酶/RNaseIII 消化为 siRNAs 小片段混合物 4.过柱纯化	1.设计 55-60mer 短发夹结构 shRNA 2.定制合成 DNA Oligos 引物 3.DNA 产物克隆到载体中 4.分离鉴定转化子，测序 5.重组质粒扩增
荧光标记	可荧光标记 siRNA	可用荧光标记 siRNA	可用荧光标记 siRNA	不可标记 siRNAs
基因沉默时效	3-7 天短暂	3-7 天短暂	3-7 天短暂	> 2 周或以上可长期持续沉默基因表达
递送方法	脂质体转染 电转	脂质体转染 电转	脂质体转染 电转	质粒：脂质体转染，电转 病毒颗粒：感染各类培养细胞株，原代细胞、非分裂细胞、神经细胞
其他特点	即用,用完须重新订购		无需精确设计 siRNA，只要选择大段基因特异区域，混合物抑制成功率高. 无法确定最佳的 siRNA 适合只要求达到抑制结果无需知道哪个 siRNA 作用的实验，不适合长期持续性研究和 siRNA 分析	shRNA 克隆载体可以大量复制 有的载体可再生，可重复克隆使用

siRNA Products and Services

Custom siRNA synthesis and a wide array of pre-made and/or pre-designed siRNAs of exceptionally high quality.

Turbo si-Designer

- Bioneer专利siRNA设计软件
- 确定高效的siRNA靶点，成功率高。
- 高效选择功能性siRNAs: 80%被测试siRNA表现出高于75%的敲除率，38%的siRNA表现出高于90%的敲除率。

在培养的哺乳动物细胞中成功进行RNA干扰试验取决于多种因素。设计和确认特异而有效的siRNA位点，并将其高效的运送到预期的靶细胞是尤其重要的。为简化设计过程，Bioneer与韩国国家基因组信息中心合作研发了一种专利的siRNA选择淘汰系统，称为Turbo siRNA designer。该系统能高效确认siRNA靶点，有很高的成功率。Turbo si-designer的性能评估通过设计数百个siRNAs，经实时PCR分析检测其敲除效率来实现。与其他基于网络的设计软件相比，我们的软件可以较高概率地预见到能够进行有效基因敲除的功能性siRNA。值得注意的是，获得较低评分的siRNAs大多是无功能的，表明无效的siRNAs被Turbo si-designer有效的去除(图1)。详细资料请联系ts@bioneer-bj.com获取。

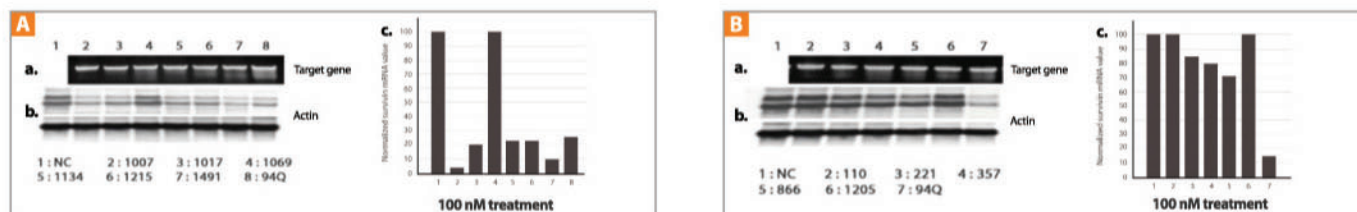


图1. 利用Turbo si-designer设计的siRNAs，通过Northern blot和实时定量PCR分析敲除效率。A) 高分siRNAs的敲除效率 B) 低评分siRNAs的敲除效率 (a: siRNA进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳; b: Northern blot分析; c: 实时定量PCR分析)

Custom siRNA

- 利用Bioneer专利384并行高通量合成仪在洁净室内合成
- 100% MALDI-TOF质量检测

Bioneer使用专利的Turbo si-Designer软件为您提供免费的siRNA设计，您只需把靶基因序列(名称和Genbank号)发送至ts@bioneer-bj.com即可获得设计。Bioneer输出的siRNA使用自主专利的384并行高通量合成系统，在洁净室中生产，并通过MALDI-TOF进行检测，以确保合成质量。还可提供多种包装方式和不同的修饰方式，包括荧光标记。更多合成资料敬请查看Bioneer中文网站: www.bioneer-bj.com。

MALDI-TOF和凝胶分析QC

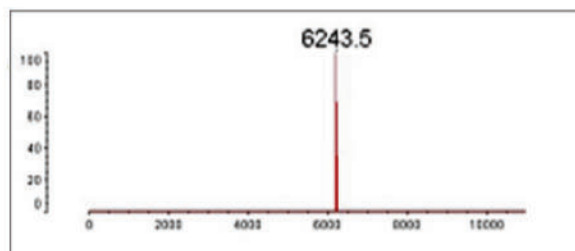


图2A. MALDI-TOF质谱分析合成的siRNA。所有合成后的siRNA都要通过质量控制过程的检测包括(MALDI-TOF和凝胶电泳)

siRNA生产室



图2B. Bioneer生产siRNA的洁净室



化学合成厂家及费用比较:

化学合成的 siRNA 通常可以选择的纯化方法有 4 种级别:

标准纯化包括脱盐,彻底去除碱基上的保护修饰。以 Ambion 为例,即使是一般常用的标准纯化,也要经过如下步骤:合成的单链 siRNA 经过 MALDI-TOF 质谱和 HPLC 分析,退火后经过 PAGE 检查退火效率。保证 80% 以上纯度,通常足以满足多数的培养细胞 RNAi 实验。

HPLC 纯化级别的纯度达到 97%,特别适合合成量较大(>40nmol)、或者修饰过的 siRNA 纯化。

PAGE 纯化对 30bp 以上长度的 dsRNA 纯化精度高于 HPLC,不过对于小于 30bp 的 siRNA 来说区别不大,都在 97%以上。

体内实验 (in vivo) 级别的 siRNA 除了要经过 HPLC 纯化,还要经过透析脱盐,内毒素检测等,可以直接用于动物实验。

国内厂家: 国内厂家 RNA 合成最大的优势是价格便宜,到货速度快。比如上海吉码、上海吉凯、武汉晶赛等等。上海吉码的价格较有优势: 500 元/siRNA(HPLC 纯),4OD, 货期 4 天,特惠套装有一个基因 3 个位点 (2OD), 外加正、负对照和荧光标记负对照, 价格 1680, 再加上荧光定量探针和一对引物则 2100 多。算是实惠之选。

国外厂家: 想要成功鉴定基因阻断的最佳序列,使用高质量无错误的 siRNA 寡核苷酸是重要的开端。虽然由于外币兑换、加上越洋运输和过海关,到货速度比国内慢,而且价格也就上去了,但是国际知名厂家的良好声誉,各自拥有 RNA 合成的专利技术,值得信赖的合成质量,让你用的更放心,国外高级期刊发表文章时更加有保障,不怕专家质疑。包括我们前面介绍的 Ambion、Qiagen、

Dharmacon、Sigma、Bio-Rad、Invitrogen、Bioneer 等公司都有提供定制合成的服务。通常提供同一基因 3 个位点中保证 2 个有效,或者 4 个位点保证 3 个有效的保障。以 Sigma 为例,旗下 Proligo 是四大拥有 MIT 专利授权合成 siRNA 的公司之一,拥有强大的生产技术平台和专利技术。生产基地经 ISO 9000 认证,提供产品质量 100%满意保障。而韩国 Bionner 公司除了使用严格的 MALDI-TOF 质谱来检测其合成的 siRNA 外,更提供包括 HPLC 检测、气相色谱分析、核磁共振分析、重金属含量检测、水分含量检测、生物负荷检测及内毒素检测等多种检测和分析。

4.2 体外转录 siRNA

体外转录可以做长片段,自然也可以做短片段。只是有个难题:体外转录要求 5'端开头的 2 个碱基为 GG 或者 GA 以提高转录效率, siRNA 则要求 3'端为 UU, 这样 2 个条件限制就使得一个基因里可供选择符合要求的位点很少或者没有。另外转录产物的 5'端通常带有几个多余的 GGG, 怎么办呢? 聪明的研究人员还是想出了办法,不单可以自己合成指定的 siRNA, 还可以利用很便宜的 DNA Oligo 合成 (现在一个碱基还不到 2 块钱!) 代替比较昂贵的 RNA 合成。就是操作起来实在有点麻烦。到底这种方法能省钱吗? 生物通小编在这里介绍一下原理和价格,意在给读者一个比较全面的 RNAi 方法小结,是否值得你自己看吧。

Ambion 公司的 Silencer siRNA

Construction Kit: 在设计好 21 碱基的 siRNAs 序列 3'端加上 5'-CCTGTCTC-3'序列 (和 T7 引物 3'端匹配), 分别合成这 2 个 29nt 的 DNA Oligos, 最少的量和脱盐纯化就可以。



试剂盒提供的 T7 引物分别和 DNA Oligo 退火, Klenow 大片段补齐得到带有 T7 启动子 + siRNA 序列的 DNA 片段, 分别体外转录, 得到的单链 RNA 产物合并退火, 用 DNase 去除模板, 单链特异的 RNase 消化未配对的单链 RNA 以及配对的 dsRNA 中 5' 突出端的 GGG, 注意, 单链特异的 RNase 对 UU 突出末端是不切的, 所以最后纯化得到的就是你想要的带有 3' 端 UU 突出, 21nt 的双链 siRNA, 可直接用于 RNAi 实验——如果要做同位素标记, 这个方法是兼容常规的同位素标记方法的, 记住不要标记 UTP, 因为试剂盒提供的 UTP 是经过修饰以提高转录效率的。本来也可以直接合成带有最小 T7 启动子序列的 DNA Oligo 的, 但是最小 T7 启动子转录效率比 T7 小, 并且通过和引物退火 Klenow 片段补齐, 就可以节省 2 条 DNA Oligo 的合成, 合成长度也短很多。

可惜说老实话, 试剂盒也是奔驰价格, 超辣手, 按照 07 年报价, 9158 元/15 次, 每个 siRNA 合成成本高达 600 元, 每次得到的产物足够做 100 次以上 24 孔板反应。试剂盒胜在提供包括引物、纯化柱, DNase, RNase 等在内的制备 siRNA 需要全部产品, 还包括 GAPDH 对照 siRNA, 保证 RNase free, 除了 DNA 模板。一旦有 DNA 模板, 24 小时内就能随时合成需要的 siRNA。

生物通 eBioTips15: 这个试剂盒其实也有个取巧的办法, 就是设计发夹结构的 shRNA 做 DNA 模板, 每对 siRNA 只需做一次体外转录, 得到 shRNA 再用单链特异的 RNase 消化处理, 也一样可以得到 siRNA, 这样试剂的使用次数就可以翻倍! 每次成本几乎减半(300 左右), 也可能要牺牲一点得率的——不过这样纯化柱子可就不够用了, 要自己做异丙醇沉

淀或者另外配了。这里的试剂也可以自备, 不过要保证 RNase free, 一定每步都严防死守 RNase。

前面介绍过的 Promega 的 T7 RiboMAX Express RNAi System 不单可用于长双链 RNA 合成, 也可以用于直接体外转录 siRNA。

Promega 的设计是用户自行合成带有 T7 启动子序列和 siRNA 序列的 DNA, 直接做体外转录。虽然转录只需要 DNA 中的一条作为模板, 实验表明, 双链 DNA 模板转录效率远高于单链 DNA 模板, 因此每条单链 siRNA 都需要合成 2 个独立的, 不同的 DNA 双链模板(共计 4 条单链)。选择目标 siRNA 序列结构为 5'G.N(17).C3', 正义链和反义链 5' 端分别加上 T7 最小启动子序列(24nt), 合成 4 条 DNA Oligo, 分别退火得到 2 条双链模板, 直接进行体外转录, 得到 2 条 siRNA 单链退火, 去除 DNA 模板, 异丙醇沉淀纯化。试剂盒本身很实惠, 总产量可达毫克级, 3100 多, 每次 20ul 体系足以做 50 次。虽说 DNA 合成现在已经很便宜了, 可是每个 siRNA 需要合成 4 条 43—45 个碱基的 Oligo, 还是有点费用的), 厂家还提供另一取巧的方法——合成带有 T7 启动子的 shRNA, 目的是体外转录得到 shRNA, 这样就只需要合成 2 条 60 多碱基的 Oligo。实验结果显示, shRNA 直接转染后, 基因沉默效果决不亚于 siRNA, 还比较省事呢。

4.3 体外转录+Dicer/RNaseIII 酶切:

我们前面的路线图可以看出, 细胞内的 RNAi 过程是 dsRNA 经过 Dicer 酶降解为 siRNAs, 然后再和其他元件结合为 RISC 发基因沉默。之所以我们这么煞费苦心的设计合成 siRNA 是因为在哺乳动物细胞内不能直接转



染 dsRNA，以免引发非特异的细胞毒抗病毒应答反应。那么在体外模拟 Dicer 酶切过程，将长双链 dsRNA 消化为 siRNAs 混合物后，再将 siRNAs 混合物转染到细胞中，是否行得通呢？答案是可以的。自从出现商品化的 Dicer 酶，以及类似功能的 RNaseIII 后，越来越多人采用这种方法以避免单个 siRNAs 的设计合成和验证这一系列的工作。实验表明，用这种方法得到的 siRNAs 混合物进行 RNAi 实验，目前的结果都没有显示出有细胞毒性，或者非特异干扰其他非目标基因，而且 RNAi 效率和成功率往往比单个 siRNA 更高。基本上，只要你能合成双链 dsRNA，就可以考虑自行配一个 Dicer 酶或者 RNaseIII，直接酶切已经纯化的 dsRNA，得到可用于 RNAi 的 siRNA 混合物。

合成长双链 dsRNA 可选择目标基因上 200—500nt 左右的片断作为模板，可以在两端引入反向 T7 启动子序列，以之作为体外转录的模板；也可以合成两段 5'端分别带有 T7 启动子序列的模板，混合两个模板再进行体外转录。

那么 Dicer 酶和 RNaseIII 这两种酶的使用上区别在哪里呢？体内自然发生的 RNAi 实验是经过 Dicer 酶降解得到 21-23bp 大小的 siRNA，理论上说用 Dicer 酶能更准确模拟哺乳动物细胞内真实的反应产物。只是 Dicer 酶的表达纯化有困难，纯化后的 Dicer 酶活性不高，反应时间比较长，需要 10 多个小时，价格非常贵--Ambion 公司提供的 Dicer 酶 250Unit 价格要 ¥9818。来自 E.coli 的 RNaseIII 酶切 dsRNA 得到的产物比较小，多在 12-15bp 之间，不超过 30bp（这个似乎通过调控 Mg 离子浓度可以令酶切得到稍大的产物），同样不会引发哺乳动物抗病毒应答，也同样能有效引发目标基因沉默，酶切 dsRNA 1 个小时足

够，价格不到 Dicer 的三分之一。

生物通 eBioTips16: dsRNA 模板的长度以 200bp-500bp 为佳。不必是全长基因。有实验表明 200bp-500bp 的 dsRNA 用 Dicer 或者 RNaseIII 酶切后得到的产物比较均一，siRNAs 种类虽然不如较长 dsRNA 酶解产物种类多，不过胜在浓度更高。因而 RNAi 的效率比那些更长片断酶切结果的效率更高。

我们前面提到过根据评估，针对同一目标基因随机设计的 siRNAs 大约有一半能达到 50% 的基因沉默效果，25% 的几率能达到有效的基因表达抑制。一段 200bp 长度的 dsRNA 被消化能得到 7—16 个 siRNAs 混合物，理论上几乎可以肯定能有效诱导 RNA 干扰，已经足够了。另外一个考虑是较小的 dsRNA 在体外转录法合成时比长链更为容易快捷，产量也更高。有人曾来 email 问生物通，目标模板应该选择在基因的什么位置比较好呢？C 端？N 端？还是中间？实验表明这个模板位于基因的哪一端，对 RNAi 结果都没有明显的影响。不过在设计时仍然应该回避已知的调控蛋白结合区域、以及那些高度保守的，和其他基因有同源区域的序列。

生物通 eBioTips17: 带反向 T7 启动子的单一模板在 800bp 以下时无需额外的退火，但是如果是分别带启动子的 2 个模板，无论单管内一起体外转录或者分开转录再混合，或者模板大于 800bp 的转录产物则需要经过 75 度保温 5 分钟后降到室温以帮助退火。

生物通 eBioTips18: Dicer 或者 RNaseIII 酶切产物需要经过 DNase 消化去除模板，RNase 去除未匹配单链 RNA，同样很重要的

是要去除没有被Dicer消化或者消化完全而残留的 dsRNA，如果这些较长的 dsRNA 混入 siRNAs 混合物中转染，就有可能引发非特异的细胞毒应答。

RNaseIII 价格比较:

New England Biolabs 的 ShortCut

RNaseIII: ¥1260/130Unit, ¥5040/650Unit

Ambion RNaseIII: ¥3053/250Unit

Epicentre: ¥663/50Unit

试剂盒比较:

Ambion Silencer siRNA Cocktail Kit

(RNase III), 2007 年价格 7053, 20 次反应, 每次得到的产物足够做 100 次以上 24 孔板反应。试剂盒包含体外转录所需试剂, RNaseIII, DNase, siRNA 纯化柱 (去除未降解完全的 dsRNA), 还有 GAPDH 模板以制备正对照的 siRNA 混合物。

New England Biolabs 有个 ShortCut

RNAi Kit, 实际上就是前面介绍的 HiScribe 长双链 RNA 体外转录试剂盒加上 130 个单位的 ShortCut RNaseIII 和 siRNA 分子量 Marker, 这个 RNaseIII 酶切得到的是 18-25bp 的双链 RNA 产物, 130Unit 足够酶切 100ug 的 dsRNA, 以 24 孔板为例整个试剂盒足够做 100

次转染。由于不带纯化柱等试剂, 需要自己另配, 不过就比较灵活些。这个 Kit 配的 RNaseIII 未免少了些---整个体外转录试剂盒最高可以合成 2mg 的 dsRNA, Kit 里配的 RNaseIII 却只够处理 100ug 的 dsRNA。价格 5040 人民币。不那么划算。

Roche 的 X-tremeGENE RNAi Dicer Kit,

也是建议用 PCR 方法制备带有 T7 启动子的目标模板, 体外转录, Dicer 酶切, 去除未降解完全的长 dsRNA 以免引发非特异反应, 最后纯化 siRNA。包含足够做 10 体外转录和 Dicer 酶切, siRNA 纯化所需的完整试剂, 每次反应得到 10-30ug siRNA 混合产物, 价格 7326。每 1ug siRNA 相当于 70pmol 左右 (21bp)

生物通 eBioTips19: PCR 制备带有 T7 启动

子的 DNA 模板时, 可在引物 5'端加入 24-26 碱基的 T7 启动子序列, 通常再接 25 个基因特异的序列, 如果是质粒载体做 PCR, 20 个基因特异的碱基就可以了。

生物通 eBioTips20: Dicer 酶不可以过量,

否则会得到更碎的产物。由此可以联想, 大幅减少 RNase III 酶的量, 延长反应时间, 是否会得到较长的产物?



New genomewide solutions from QIAGEN provide potent, specific siRNAs and matching, ready-to-use, validated primer sets for SYBR® Green based real-time RT-PCR assays.

- **One database** — easy online access to RNAi and gene expression solutions at the GeneGlobe™ Web portal
- **Two matching solutions** — siRNAs and matching real-time RT-PCR assays you can rely on
- **Three complete genomes** — siRNAs and RT-PCR assays are available for the entire human, mouse, and rat genomes



Gene Company Limited

基因有限公司 A Gene Group Company





5 siRNA 专用转染试剂

5.1. 如何将 siRNAs 递送至哺乳动物细胞中？

将 siRNA 完整高效地传递到特定细胞内，是 RNAi 实验的第二个关键要素。转染效率低和细胞活性低往往是基因沉默实验失败的常见原因。虽然 siRNA 比质粒 DNA 更容易转，不过依然需要优化转染条件，否则，一个有效的 siRNA 就可能因为转染效率不高而得不到理想的结果。一旦一种细胞株建立了标准方法，以后就容易得到可重复的结果。

由于没有抗生素筛选压力，siRNA 转染本身很难保证 100% 的细胞被成功转染----实际上除了荧光标记的 siRNA 参照，并无法区分已经转染的细胞和未转染的细胞。而混迹其中的未转染细胞内由于没有发生 RNAi 反应，因而目标基因的表达不会下调，在后继的 RNA 纯化和荧光定量检测中就很可能会干扰结果----生物通编者为此特地请教过 Qiagen 新加坡的技术专家，他们也认为除去以荧光标记对照评估转染效率，目前也没有很好的方法。用 18s 来平衡检测结果可以减少因细胞数目变化而对结果产生的影响，却也不能区别出未转染细胞。siRNA 和带报告基因的质粒共转染虽然可行，但是过多的外源干涉可能会增加结果分析的复杂性。因此通过实验优化条件找到转染效率高的转染试剂，建立对某种细胞株的标准转染方法，对 RNAi 实验来说格外重要。

目前较常用的 siRNA 转染方法有 2 种：脂质体类转染试剂和电转染。随 RNAi 热遍全球，各厂家纷纷推出了各种 siRNA 转染试剂，绝大多数的贴壁细胞都可以用适当的转染试剂转染，生物通小编随后会逐一介绍比较。并非所有细胞都可以用脂质体转染试剂成功转

染的。对于部分特别难转染的细胞株，悬浮细胞，原代细胞来说，当转染试剂不管用时，电转染是行之有效的另一个选择。我们前面提及 RNAi 实验不需要特殊的仪器，但是如果有适当的仪器，比如电转移仪，实验会更方便。我们平时使用的 DNA 转染试剂是否可用于 siRNA 转染？不是不可以，只是效果不是最佳，所以还是建议选择专用的 siRNA 转染试剂。

脂质体转染也可分为 2 种方法，一种是常规的转染方法：细胞铺板后等第二天长到 50%—80% 之间（不同的转染试剂有不同要求，生物通小编个人经验是转染试剂细胞毒性高的要求长满一些，细胞多一些，就算死伤惨重也还能留下多些活口，嘿嘿，对于质粒转染来说这并非评判转染试剂好坏的标准，毕竟只要转进去就算 OK 了，但是对于 RNAi 实验来说就不同了），将 siRNA 和转染试剂混合物加入共同温育一段时间，更换培养基，再培养 24—48 小时检测 mRNA 含量等等。

创新的方法是**反向转染**。这种方法称为 **reverse transfection** 或者 **neofection**，和传统转染方法相比区别在于，传统方法需要提前一天接种铺板，培养 24 小时后等细胞到一定汇合度再加转染复合物转染；而反向转染则是不用预先接种细胞，先加入转染试剂和 siRNA 混合物在培养板上共同温育，然后再加入细胞铺板，培养。这个方法的好处不单是可以节约一整天的时间，而且转染效率高。原因可能是由于细胞尚未贴壁时接触转染试剂 siRNA 复合物的表面积更大，使得转染效率更高。大量的细胞株实验表明，其他条件相同的情况下，反向转染得到的 RNA 干扰效果比传统转染方法更好，连一些难以转染的细胞株如 HepG2 细胞也能得到非常好的 RNAi 结果。在反向转染实验中，细胞的密度不再困扰实验人员，有



实验表明,收获细胞时细胞密度对 RNAi 结果没有明显的影响,而胰酶处理收获细胞后,让悬浮的细胞和转染复合物混合后再铺板培养,既比传统方法节约了一天培养时间,也不用考虑细胞密度这个问题。

反向转染的概念适合高通量转染的需求,使得转染不再停留在手工操作上。在实际的高通量操作,为方便操作,流程也可改为先加稀释的 siRNA,再加稀释的转染试剂,温育一定时间后加细胞。

Qiagen 还提出了“Fast Forward”快速正向转染的方法,即在传统方法接种铺板后,无需等待一天,立即配置转染复合物,然后加入转染复合物温育。不过生物通小编个人觉得这 2 种方法差别无非是先加细胞还是先加转染复合物的问题,并且,先加转染试剂再加细胞,还可以减少温度反复变化对细胞生长的影响,我个人觉得更优一些。

5.2. 应该选哪种 siRNA 转染试剂?

我们都想找一个好用的转染试剂,什么才算是好的转染试剂?应该如何选择呢?为什么别人说好用,我用效果却不怎么好呢?这也是生物通编者在上次生物通技术专题之转染篇发表之后常常遇到读者提出的问题。应该说每种转染试剂都有自己所长,对不同的细胞都会有不同的转染效果。并且,对 RNAi 实验来说,光有好的转染试剂还不够,还需要优化转染条件以达到 siRNA 基因沉默的最佳效果,适当的转染试剂和优化转染条件都是很重要的。生物通在这里先总结一下影响转染效果的关键因素。从这些关键因素及其背后的原理中,我们既会对如何评估一个转染试剂大概有个谱,也会了解优化转染条件应该从何着手。自己试过才是王道。

- 细胞们的健康状况——健康的细胞们更容易“接受”外来新鲜“事物”,太过拥挤或者稀疏的培养环境会改变细胞表达模式,影响实验结果。原则上,细胞铺板密度维持在 20%—80%之间,千万别等它们长满培养皿才去传代,以减少不稳定因素影响,减少实验之间的差异。细胞在培养过程中会不断发生变化,为最大程度保证实验的可重复性和一致性,传代 10 次以上的细胞应予以丢弃。每次接种传代或者转染细胞的流程和时间间隔都应该严格按照固定的流程,这样有助于提高实验的可重复性。

- 转染试剂的量——这个是优化转染条件的主要步骤。用量越少对细胞的毒性越小,但也要足以保证转染效率。在选择转染试剂时可以比较推荐用量,作为参考依据。不过每种转染试剂对应不同的细胞株的适应浓度也会有差异,所以在实验起始,可以以终浓度 10nM siRNA 为准,参考产品手册上的建议用量,选择上下 3 个不同用量做预实验,以检测基因沉默效果和细胞毒效应——如果细胞毒效应和基因沉默效应都很明显,可以减少用量,最终确立标准用量。不要以为这浪费,可以节约后继实验很多时间和精力。

- siRNA 的质和量——siRNA 必须彻底脱保护修饰,去除盐,蛋白等杂质,特别是去掉超过 30bp 的长双链 RNA,以免影响结果。最佳沉默效果的 siRNA 终浓度应该是多少?通常 1nM-30nM 足以作为初始摸索范围,太多 siRNA,例如有文献表明超过 100nM 可能会导致抗病毒响应。最适 siRNA 浓度与 siRNAs 的设计有关,也受目标基因及细胞株的影响,好的设计应该是很低的量就能达到最佳沉默效果,以减少脱靶的其他副反应。因此,应该选择有效沉默基因表达中的最低用量作



为固定条件，也建议多尝试几个 siRNAs 以找出用量最小，效果最好的一个。

- 细胞和转染 siRNA 共同孵育的时间——允许越长时间，往往毒性越小，是评估转染试剂毒性的参考。请及时更换培养基以免降低细胞活力。

- 操作简便程度——越简单越好。比如反向转染可以节约一天的时间，同时减少不确定因素如细胞密度等对转染结果的影响。又比如有的转染试剂在有血清的条件下不稳定，因而要求转染前先更换无血清或低血清培养基，由于培养条件的频繁变换对细胞表达模式可能产生影响，对于后继的 mRNA 分析可能产生影响，可能影响实验结果。

- 操作细节问题：如稀释转染试剂或者 siRNA 时，应该先加无血清培养基或者稀释液，再加转染试剂或者 siRNA，**避免转染试剂直接接触指管管壁**。有的脂质体接触普通塑料表面会发生非预期的变化。注意加试剂时避免剧烈温度变化。注意在指定时间混合转染试剂和 siRNA，和混合时的操作——Qiagen 的 HiPerFect 要求振荡混合，Roche 的试剂要求避免振荡，要特别留意说明书。另外转染试剂的保存条件也是值得关注的，有的需要 -20° C 保存，有的 4 度保存，有的可以室温保存，妥善保存转染试剂才能令实验前后保持一致性和可重复性。

高效的 siRNA 转染是研究基因沉默是否成功的前提：高效特异的 siRNA 也可能因转染效率低而被闷杀出局。可 RNAi 火啦，现在几乎各品牌都有自己的 siRNA 专用转染试剂，该怎么选择呢？对于刚入门的新手，选择的对策第一通常是检索已经发表的文章中同类细胞所使用的转染试剂。毕竟借鉴别人的成功经验可以减少走的弯路。如果碰巧有多篇文

章，而且不同文章居然采用的不同的转染试剂，那更好，可以挑结果最漂亮的，基因沉默效率最高的来借鉴。但是，无论别人如何成功，如果实验室条件允许，我们还是建议在实验初期选择 2—3 种转染试剂来摸索条件，以确定适合自己的最佳选择。毕竟转染效率高低还受到其他因素的影响，而且后继实验是需要观察细胞基因表达模式，选择最适合的转染方法是整个实验中非常重要的一步。

如果找不到相关的文献——可以先找找生物通小编在这里介绍的几种转染试剂的说明书和网上资料看看，许多厂家会把自家转染试剂成功转染的细胞株列种类出来，往往还有转染效果的评估。看看其中有没有你的细胞株，有就可以在其中选一个。如果还是没有？——你是第一个做这种细胞基因沉默的吗？佩服！那最好从下面的描述中选择买几种小包装，先来摸索一下条件（文章发了引用率会高呢）。

虽然说一旦实验室已经建立好针对某个细胞株的 siRNA 转染方法，通常就固定下来维持不便。不过随着 RNAi 研究不断深入，厂家自己也会更新和改进原有的产品。所以，如果你对手头已经做过的 siRNA 转染试剂效果不满意，别放弃尝试寻找更好的、新的转染试剂，但是一定记得从头摸索条件，做好正负对照，防止前后实验“没有可比性”。

转染试剂的选择核心都是一样：转染效率要高，同时细胞毒性要小，用量越少越好，除了 siRNA，其他影响因素越少越好，能更真实反应 siRNA 作用。从前面提及的转染关键要素中，哪些参数可以体现这些要求就不言而喻了。由于每种转染试剂对不同的细胞株都会有不同的染效率——选择 2—3 种转染试剂来摸索条件是有必要的。自己试过才是王道。生物通在此小结市面上好用的 siRNA 专用转染



试剂，仅供参考。

生物通 eBioTips21: 在选择转染试剂时，产品介绍往往有 siRNA 抑制效果图，别光看那个曲线下降得漂亮，一定要先看看细胞活力曲线----如果转染试剂用量加大的同时细胞都快死得差不多了，那个目标基因抑制效果再好也不能说明什么。在摸索转染条件时也要特别注意平行比较未转染的阴性对照细胞，荧光定量 RT-PCR 检测结果更应该用 18s 的量做均衡处理才能算数。不管怎么说，如果转染试剂导致细胞活力显著受到影响，基因的表达模式必然受影响，那就不宜采用。

Ambion siPort NeoFX 转染试剂最大的特点快速，节省，方便。因为可以做“反向转染”，1 小时即可完成转染----

1.培养基分别稀释转染试剂(24 孔培养板只要 1ul/孔) 和 siRNA，

2.混合静置 10 分钟以生成转染复合物，分装到每个培养皿中，

3.将胰酶处理收获的细胞铺板到转染试剂上，静置培养即可

----这样可以看到比传统方法节省了一天预培养细胞的时间，早一天得到实验结果，此之谓“快”。由于转染复合物在有血清的条件下依然能保持稳定，转染后都不需要更换培养基，操作非常方便，适合大规模转染。按照常规方法转染也一样可以。价格人民币

1600/0.4ml, 3134/1ml。由于用量相当节省----400ul 足够做 96 孔培养皿规格的 800 次转染（每次成本 1.5-2 元），24 孔板 400 次转染（每孔成本才 3-4 元），性价比不错。此外这个试剂在很宽的温度范围内都非常稳定----从-20 度到室温 22 度之间可长期稳定保存，不单有助于实验之间保持稳定，连运输保存都非常方便。厂家提供的信息表明成功转染的细胞株种类已有 80 多种，包括 HeLa, A549,

HEP-G2, MCF-7, SKNAS, SKOV3, UMR106, BJ, HT-29 等细胞株，特别是一些难转染的细胞株也可以用反向转染得到好的结果。值得一试。

Ambion siPort Amine 转染试剂是多胺类聚阳离子转染试剂，用量和用法和 NeoFX 都差不多，同时兼容反向转染或者传统转染方法。传统转染方法预接种铺板，等第二天等细胞密度在 30%-80%间即可加入转染复合物。多胺类转染试剂特别适合 293, CHO, COS, NIH/3T3 类细胞株，同样也适合 BJ, HT-29 类细胞。多胺类转染试剂可以被生物降解，降低脂质体毒性问题，携带/吸附正电有助于穿透细胞膜和保护 siRNA。多胺类转染试剂比较贵，0.4ml 人民币 3218，以 96 孔板计，可以做 800-1300 次转染。

Qiagen 的 HiPerFect 转染试剂也是专门为 siRNA 转染而设计的，可以进行反向转染或者“Fast Forward”快速正向转染方法，使得转染在一天之内可以完成。这个转染试剂的特点是毒性很低，不单可以在有血清和抗生素的条件下转染，还可以连续重复转染----就是等第一次转染的细胞汇片后再进行第二次转染（快速正向转染）。等第二次转染细胞汇片后再进行第三次正向快速转染，这样可以用 siRNA 实验类似长效基因沉默的效果。HiPerFect 不单可以转染很多种贴壁细胞，还可以用于转染 Jurkat, K593 等悬浮细胞株，还有巨噬细胞系 macrophage 的 J774.A1 and RAW 264.7 细胞株和成熟的巨噬细胞 Differentiated Macrophage THP-1。以 24 孔培养皿为标准，0.5ml 可以做 166 次转染，每次建议 3ul，报价 2425，7 折后价格还行吧。毕竟是一个非常好用的转染试剂。Qiagen 原来的 TransMessenger 本来也是



用于转染 siRNA、RNA，或者质粒，还可以转染非分裂静止期细胞。不过价格高用量大，不如前者划算。

Sigma 公司的 N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System 是以多肽为基础的，专门用于转染 siRNA 到真核细胞的新产品。N-TER™ 与 siRNA 非共价结合，形成纳米微粒。此纳米微粒与细胞膜上的脂类相互作用，直接透过细胞膜扩散到胞质中。与脂类转染试剂不同，这一新型的转染试剂规避了内吞体通路，因而大大降低了 siRNA 在转染过程中被降解的可能性。N-TER™ 已被成功的应用于多种细胞株，其中包括原代细胞（如 astrocytes, BSMC, HUVEC, NHEK），**神经细胞**（如 astrocytes, LA-N-2, U-87 MG），分化细胞（NIH/3T3-L1 adipocytes, C2C12 myocytes）和**非分裂静止期细胞**。

Dharmacon 公司的转染试剂比较特别——既然每种类型的细胞都有自己的个性，为什么非要求同存异，牺牲不同类型细胞的最佳转染效果，以求一种“通用、万能”的转染试剂？其实我们都明白单一的转染试剂不可能满足上百种细胞系对 siRNA 的转染要求，因此，Dharmacon 开发的 DharmaFECT 1, 2, 3, 和 4 系列 4 种 Lipid 转染试剂，可适用于数百种细胞系 siRNA 转染，实验人员可根据实验需要可以选择最适合自己的细胞系的转染试剂。DharmaFECT Duo 则特别为 siRNA 和质粒共转染而设计，既能保证 siRNA 高效抑制，也能兼顾质粒报告基因的高效表达。Dharmacon 公司根据中国国内市场的需求，特别推出 0.2mL 的小包装系列，据说还常备现货解决到货速度问题，为初步进行 siRNA 转染实验的研究者提供较为经济的选择。

Bio-Rad siLentFect Lipid Reagent for RNAi，一种高效低毒的阳离子脂质体，专门用于向哺乳动物培养细胞中转染导入 siRNA。只需在很少体积的脂质体和低 siRNA 浓度的条件下就能高效的使目的基因沉默，节约使用成本。无论是贴壁生长细胞还是悬浮细胞，均可实现高效转染，还可以共转染 siRNA 和双链 DNA 载体，应用于 RNAi 实验的优化。已知可用于细胞株包括 HeLa, HUVEC, Jurkat, NIH 3T3, CHO, COS, 3T3, HEK, A549, MCF 等细胞株和原代成纤维细胞等 16 种细胞，这个可以在 Bio-Rad 得到资料。siLentFect 真的很省，24 孔板推荐用量 0.75ul（0.25-2ul 之间）/孔，96 孔板用量在 0.05-0.4ul/孔。操作稍微复杂一点，需要先接种铺板细胞，待第二天长至 50%-70%汇片，更换新鲜的培养基，另外用无血清培养基稀释转染试剂和 siRNA，二者需要在无血清条件下温育形成转染复合物，然后直接加入培养细胞中，即可。宣传资料上也提到可用于逆向转染实验，但没有找到详细操作资料。

Roche 的 FuGene 6 转染试剂名满天下，罗氏也推出一个 siRNA Transfection Reagent，可用于 siRNA 转染或者和 DNA 的共转染，常规方法转染。1ml 转染试剂足够 400 次以上的 24 孔培养孔转染，价格 2002。

Promega 公司的 CodeBreaker 转染试剂也是专门为 siRNA 转染而设，适用于 HeLa, HEK293, 293T, 3T3, CHO 等细胞，常规转染方法，无血清培养基稀释，但不需要更换培养基。24 孔板每孔用量 2—4ul。

Invitrogen 推出了 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂，比原来的 Lipofectamin 细胞毒性要小，转染效果更好。



市面上还有好多牌子的 siRNA 转染试剂，比如 SantaCruz 价格便宜但是操作比较复杂，不能在含有抗生素和血清的培养基中转染，还有 Novagen 和 Stratagene 的 siRNA 转染试剂虽然好用但价格偏高，我们就不一一介绍了。Silencer Cell Ready Transfection Optimization Kit 是为 Ambion 公司的 CellReady96 孔板系列准备的，用于大规模转染前摸索条件。就是将正对照 siRNA 预铺 96 孔培养皿，做时只要加入各种条件的稀释转染试剂，配上各种密度的细胞就可以检测各种条件下的转染效率。

5.4 特别难转染的贴壁细胞，悬浮细胞，原代细胞等的转染。

转染试剂并非万能，对于特别难转染的贴壁细胞，悬浮细胞，原代细胞等的转染，可以考虑电转或者用病毒载体。电转，也就是电穿孔技术，是通过一个高强度的电场作用，瞬时提高细胞膜的通透性，使周围介质中的外源分子可以穿越细胞膜进入细胞。我们前面说过 RNAi 实验并不需要特殊的仪器，不过这里你会发现，有电转移仪或者叫做电穿孔仪的实验室会很有优势，不单可以对付各种难搞的细胞，对常用细胞，你甚至可以省掉转染试剂的费用。从理论上说，电转可用于各种细胞，甚至体内 RNAi 局部器官。但是电击对细胞的杀伤力和潜在的影响一直也是争议的中心。因此电转的仪器和 Buffer 对于 RNAi 实验的成功来说非常重要。需要摸索的条件通常包括电击电压（100V-500V），电击时间（100-800usec），电击次数（1-3 次），Buffer。

Bio-Rad 公司的 Gene PulserXcell™ 电穿孔仪系统已经被研究者广泛的应用于

siRNA 和 DNA 质粒的细胞转导。无论是原代培养细胞、悬浮细胞还是难于转染的细胞类型，均能够实现高效导入。Bio-Rad 专利的 PulseTrac™ 电路设计，确保结果的重复性和对样品的保护技术。参数可调，界面友好，使用方便，方波输出可以为敏感细胞提供温和的转导条件。另外，Bio-Rad 公司超酷的 Helios® 手提式基因枪和 PDS-1000/He™ 台式基因枪也可用于 RNAi 实验。其原理是利用物理方法——氦气脉冲加速直接包被有核酸的金属微粒，将核酸接打入细胞内。在 RNA 干扰实验中，基因枪技术特别适于用来介导特殊类型细胞的转导，例如植物细胞——因为其含有细胞壁而不适于脂质体法转染或者电穿孔法导入。基因枪可以实现对细胞的体外或原位转导。适用于目的基因的瞬时和稳定表达。

就算是不需要转染试剂的电转，厂家们也能推出试剂盒，比如 Ambion 的 siPort siRNA Electroporation Buffer 和试剂盒，据说这 Buffer 特别温和，还有能帮助细胞在电击后修复穿孔的细胞天然成分，有助于提高电击后细胞的活力。检测方法可以用 Cy3 标记的对照 siRNA 来检测转染效果。不过价格真不便宜。Ambion 还有个 96 孔电转 Chamber，是专门配 Bio-Rad® Gene Pulser Xcell™ Pulse Generator 的，一次可以转 96 个样品，不需要其他耗材，算比较方便吧。比较厚道的是 Ambion 公司在网上提供了不少难转染的细胞或者原代细胞的电转条件，对于电转初始者摸索条件来说很有帮助。我推荐的是这个。

5.5 如何评估 siRNA 转染效率？

荧光标记的对照 siRNA 转染目标细胞，可以借助荧光显微镜或者流式细胞仪来检测



siRNA 是否已经进入细胞中,以及观察 siRNA 在细胞中的定位, siRNA 的稳定性,甚至帮助识别已经转染的细胞。不过,由于 siRNA 进入细胞并不等于成功诱发了 RNA 干扰,吸附在细胞膜表面的荧光染料也可能会干扰结果,所以,这种快速而廉价的方法只适合作为评估转染是否成功的方法,也有人用来作为评估转染效率的工具。但是要特别留意,对于某些脂质体转染试剂和细胞,荧光强度变化和对照 mRNA 的下降并不一定相关,作为评估 RNAi 效率不一定适合。

当然,带有荧光标记的正对照还是很快很直观。荧光标记的 siRNA 转染浓度可能要高于未经修饰的 siRNA,通常需要到 100nMol。各家公司有提供带有荧光标记的正对照或者负对照 siRNAs,也可以在化学合成 siRNA 时要求厂家添加标记,标记的合成 siRNA 至少需要 HPLC 纯化级别。

Ambion 还有个荧光标记试剂盒 Silencer Cy3 and FAM siRNA Dye-labeling Kits,可标记化学合成或者酶法合成的 siRNA。比较简单,2 种荧光素标记可供选择,标记反应会标记在 2 条链上,不影响效果。

除了荧光标记 siRNA,通常建议选择 2-3 种转染试剂,分别尝试不同浓度和不同的细胞密度,优化转染条件可用正对照在 96 孔培养板上进行,并检测正对照结果。Ambion 的 KDaAlert. GAPDH Assay Kit 可直接用转染后的细胞裂解后加入检测试剂可直接检测发光信号,从而比较不同转染条件的差别,也可以用于检测未处理细胞和负对照之间的区别,得到转染试剂毒性的数据。

6 siRNA 实验设置和参照系

前面提到的 RNAi 实验 4 大要素,第三点就是参照。由于 RNA 干扰实验本身就是对比研究干扰前后基因表达模式的相对差别,所以参照是必不可少的。没有完整的参照系,实验结果就没有分析的意义。由于不断有文章指出 siRNA 因为浓度、或者 siRNA 本身的长度、或者 siRNA 作用机制等因素而导致的非预期脱靶反应,设计全面的参照体系对于正确评估 siRNA 干扰结果非常重要。

空白对照: 未转染细胞的空白对照可作为细胞正常的表达模式和细胞活力基础参照;

转染试剂对照: 仅加入转染试剂的空白对照则可用于评估转染试剂对细胞毒性和细胞基因表达模式的非特异影响;这一步也可放到摸索转染条件时做。

负对照: 转染非靶向的 siRNA 负对照,可用以排除转染 siRNA 本身对基因表达可能造成的任何非特异影响,严谨的实验更是要求 2 个以上不同的负对照;非靶向 siRNA 负对照通常是选择和人类、小鼠、大鼠等基因不同源的序列,用于排除转染 siRNA 对细胞表达模式的非特异影响。基本上每个厂家都有卖,也是必须的。进口品牌比较贵,国内厂家合成的便宜些。比如 Ambion 提供 3 种负对照,5nmol 价格 2000 人民币,40nmol 6600;韩国 Bioneer 的 siRNA 负对照有荧光标记和未标记两种,OPC 纯化方式 5nmol 负对照人民币价格约为 800。采用荧光标记的负对照还可以用于直观地观察转染效率。

正对照: 选择靶向一个在多种细胞内持续、恒定、高表达,且容易检测的内源基因作为正对照,用以验证转染条件和本次操作反应条件的可行性。正对照和选择的细胞来源和基因有关。比较常见的是用管家基因或者持续稳定高表达的基因作为正对照,比如 GAPDH,还有 KIF11, beta-actin, Cyclophilin, Lamin



A/C, GFP, Firefly Luciferase 等等。且最好容易检测。我们前面介绍的部分试剂盒里有附送，可以留意一下。常用同一个正对照，也有助于平衡每次实验结果之间的偏差。

每次实验都要同时做正负对照，不单可以用于纠正排查实验操作的可行性，同时也可以

用于平衡每次实验间的一致性。

要正确评估 RNAi 实验结果，除了正负对照，至少选择 2-5 个针对同一个基因的 siRNAs，每个 siRNA 分别做 2-3 组，同时平行实验，以相互验证基因沉默特异性，避免脱靶反应，减少假阳性或者是假阴性结果影响最后的结果分析。



siRNA的设计是决定RNAi实验成败关键性的第一步。Sigma采用著名的Rosetta siRNA Design Algorithm, 最大程度的避免脱靶效应和非特异性, 提高成功率。并且所有客户都可以享受‘**度身定制**’的服务。不必再为免费软件下拉式菜单中有限的选项烦恼，我们有专职的siRNA设计专家，可以针对您的要求与设想，提供**更专业的设计、更人性化的服务**。

高品质siRNA:定制siRNA—**极低价体验，3120RMB/3对**

需要您提供的信息包括：

- ✓ Gene accession number 或者 Gene ID
- ✓ 基因名或基因的简介
- ✓ 其它特殊要求(可选)：具体位置的偏好？种属的特异性？... ..



特点：

- 即用型双链siRNA
- 毫克至数克的规格
- 多种纯化方式可选
- 多种修饰可选，Fluorescein/Biotin/ Phosphate等
- 随产品提供完整的质控和数据资料
- **100%满意度保障**

针对一个靶基因，常规设计并合成最少3条siRNA，我们确保其中至少2条siRNA达到75%以上的抑制率（mRNA水平）

预制siRNA文库

依托准确的Rosetta siRNA Design Algorithm和sigma强大的生产技术平台，最新推出针对人与大鼠药靶基因组、小鼠激酶基因的siRNA文库。

特点：

- 高效沉默所有基因，而不仅仅是高表达的基因
- 高特异性，Rosetta Algorithm应用海量的数据库与专利技术最大程度的避免脱靶效应
- 可选择整个文库，或特定基因家族的系列，或单个基因的系列
- 针对每个基因设计并合成了3对siRNA
- siRNA文库为96孔板的包装，每个板上有80对1nmol的siRNA(包括对照siRNA),适合高通量研究

Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司

热线电话：800-819-3336

sigma-aldrich.com





线路三：shRNA 表达载体和病毒载体

1. shRNA 表达质粒载体

siRNA 直接转染可以方便地实现瞬时基因沉默，通常持续时间在 3 天-7 天左右，因目标基因差别而异。对于一些半衰期很长的蛋白，要想观察蛋白表达下降对细胞表型的长期影响就需要长期研究目标基因沉默的效果，shRNA 表达载体是更适合的选择。

什么是 shRNA(short hairpin RNA)? 就是目标 siRNA 与其反向互补序列之间由特定的连接序列间隔，得到的 RNA 两端反向互补退火，与连接序列形成茎环结构，类似发夹。携带目标基因 shRNA 的表达载体转染或者转导到目标细胞中，载体表达 shRNA 并被 Dicer 酶切割为 siRNA，就可以引发目标基因的沉默（参考前面的图中线路 3）。shRNA 表达载体可分为质粒载体和病毒载体。

shRNA 载体最大的优势是利用载体上的抗生素标记可以建立相对稳定的长期基因沉默细胞株，或者通过病毒插入基因组中从而得到稳定的基因沉默表达株。此外，载体上的抗生素筛选还可以排除未转染的细胞，以避免混杂的未转染细胞中的目标基因 mRNA 干扰后继的定量检测结果。此外，除了可以做长期基因沉默，有的质粒载体设计是可重复使用的。这个 shRNA 方法虽然目标是 RNA，但在检测以前整个过程却不涉及 RNA 操作，挺有趣的。

不过，构建 shRNA 表达载体是相当麻烦费时的，包含了 shRNA 设计，DNA Oligo 合成，克隆 shRNA 片段到适当的载体，筛选正确的重组子，测序验证，最后才是 shRNA 载体转染细胞，检测结果。幸好，和预制 siRNA 一样，市面上也有已经构建好的 shRNA 表达

载体。

最方便的莫过于 Sigma 公司的 MISSION™ shRNA Libraries。这个由麻省理工和哈佛等 11 个著名研究所及制药公司组成的 RNAi 协会（The RNAi Consortium, TRC）所研发，共包括靶向人类 15000 个基因和小鼠的 15,000 个基因，针对每个基因有 3-5 个不同位点的 shRNA 克隆，共计 15 万个预制的 shRNA 克隆，每个克隆都经过测序验证，即买即用，不需要自己费时间设计 shRNA，合成 Oligo、克隆构建载体、筛选测序什么的，方便之极。如果你的目标是尽快得到研究结果，而不是在实验过程中学习如何成为 shRNA 设计克隆专家，那么就全力以赴实验目标，尽快发表结果吧，这些事情交给 TRC 和 Sigma 去做好了，时间就是金钱。pLKO.1-puro 质粒由 U6 启动子引导 shRNA 的合成，由于载体上还携带了由 hPKG 启动子引导的 puromycin 抗性筛选标记，这个启动子比 U6 弱，可以借助筛选压力促进 shRNA 的表达，可直接用于转染细胞进行 RNAi 实验。妙的是这个载体本身也是慢病毒就是 Transfer 载体，如果发现你的细胞用常规的方法都转染不了，也可以借助 Sigma 特定的包装试剂盒制备慢病毒颗粒----慢病毒几乎可以对付绝大多数顽固的细胞株，包括静止期细胞，而且转染效率达到 100%。由于质粒可以复制扩增，如果需要重复大量使用时还可见其经济实惠。除了已经纯化的质粒，你还可以选择购买甘油菌种自行扩增，反正这一步也跑不掉的。MISSION™ shRNA Libraries 提供空白质粒对照，非靶向 shRNA 的负对照质粒，GFP 系列的阳性对照载体，----由于 GFP 的



shRNA 不干扰小鼠或者人类基因，这个 GFP 也可以做非靶向的负对照。某些系列还包括针对基因 3' -UTR 的 shRNA 克隆，可用于 phenomic rescue 实验，使实验更严谨。

不过，如果你的研究目标不是人类基因，也不是小鼠，那么你只好自己一步一步构建 shRNA 表达载体了。生物通总结以下构成 shRNA 表达载体有哪些关键要素：

- ✓ shRNA 序列设计
- ✓ 启动子的选择
- ✓ 载体类型的选择
- ✓ 抗生素筛选标记
- ✓ 构建、克隆和测序验证

shRNA 由 siRNA 和环状连接序列组成。因此 shRNA 设计原则可参考前面的 siRNA 设计方法，我们在这里不再罗嗦。理论上说，多出来的环状序列对 shRNA 被 Dicer 酶酶切效率也会有影响。通常商品化 shRNA 载体的使用说明书上都有提供建议，可供借鉴，常用的有 TCAAGAG, TTCAAGAGA, GAAGCTTG 等等。如果载体选择是 Pol III 类启动子如 U6 或者 H1 则需要在 3' 端加上 5 个连续的 T 作为转录终止信号。最后自己还要根据选择线性化载体两末端的酶切粘端，设计并合成对应的正向和互补的 DNA Oligo，退火得到一条两端与线性化载体粘端匹配、中间带有 siRNA 序列+环状序列+siRNA 反向互补序列+转录终止信号（5 个 T）的双链 DNA 片段，即可连接到目标载体上。生物通同样在此列出以下 shRNA 的免费设计工具，仅供参考。

Genelink 公司

<http://www.genelink.com/sirna/shRNAi.asp>

shRNA Designer

<http://shRNAdesigner.med.unc.edu>

siSearch

http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.7.html

启动子的选择：常用的启动子包括 RNA 聚合酶 III 类启动子（如人源或者小鼠 U6 启动子和人源的 H1 RNA 启动子(H1 RNA 是 RNase P 的一个组分)）。之所以被选为 shRNA 表达用的启动子，主要是由于这类启动子相对简单，完全位于转录序列上游，因而转录产物不含来自启动子的序列；转录产量相对较高；另外遇到 3-6 个连续的 T 就会终止转录，不需要转录终止信号，很适合制备短的 RNAs。

shRNA 的表达产量取决于启动子的强弱。因此，选择哪个启动子就要看你的期望是什么。从生物通收集的多位研究人员总结的经验来看，U6 启动子比 H1 强，而且表达持续时间较长，是多数人的首选。除此之外，RNA 聚合酶 II 类的启动子如 CMV 启动子和 U1 启动子也比较常见，由于 CMV RNA 聚合酶 II 启动子能耐受 4 个 U 甚至更长的一串 U，采用这类启动子的表达载体需要在下游添加转录终止信号如 SV40 转录终止信号，因此在设计 shRNA 时就不需要考虑 5 个连续 T 作为转录终止信号了。当你的 shRNA 序列有连续的 U 时应该优先考虑这个启动子载体。此外 CMV 启动子不是人类或者鼠类细胞内源的启动子，因而不会干扰细胞本身的转录事件，更适合做长期 shRNA 的表达。代表产品有 Ambion 公司的 pSilencer 4.1-CMV 载体，2007 年标准报价 4470。使用这个载体，Ambion 录得长达 8 个月的长效基因沉默。

不过有研究人员认为，虽然 CMV 启动子表达水平略高，但 shRNA 表达水平未必是越高越好，道理同 siRNA。过表达也有潜在可能导致细胞毒性或者脱靶。



生物通 ebiotips22: 当你的 shRNA 序列有连续的 U / T 时应该优先考虑 CMV 启动子载体。

上述的启动子都是组成型表达的启动子，在人源，小鼠或者大鼠细胞中都能通用。在某些情况下，你可能需要诱导型表达的 shRNA 载体----Invitrogen 就有 Tet 诱导的 shRNA 表达载体----在启动子上游的转录抑制产物会在加入 Tet 诱导下解除抑制，开放 shRNA 表达，这样就可以在你指定的时候调控开始 RNAi 实验。

抗生素筛选本来不是必须的，有人甚至觉得会干扰细胞原有的表达模式。不过有抗生素筛选能得到稳定表达 shRNA 的细胞株，便于长时间研究 RNAi；而且可以有效避免未转染细胞影响后继的 mRNA 检测。抗生素选择的另外一个作用是促进 shRNA 表达，防止 shRNA 表达减弱而影响基因表达沉默的效果。所以，如果有，还是选一个抗性标记比较好。筛选标记无非都是哺乳动物细胞常用的抗生素 G418，潮霉素或者嘌呤霉素之类，看自己实验室惯用的抗生素来选择即可。

生物通 eBioTips23: 选用 U6 启动子载体时，设计 shRNA 要避免连续 3 个以上的 U 或者 A，以防提前转录终止而得不到预期的 shRNA。切记。

U6 或者 H1 启动子克隆载体代表产品有 Ambion 的 pScilencer 2.1-U6 系列，pScilencer 3.1-H1 系列。启动子后的克隆位点前面 BamHI，后面 HindIII。07 年价格 4280，20 次，包括线性化载体，已经克隆 GFP 的正对照载体，已经克隆非靶向序列的负对照载体，退火 Buffer，无需另外克隆筛选正对照和负对照质粒，算比较方便。

Promega siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems 和 siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning Systems，siLentGene 中的线性化质粒提供平端切口，不带启动子，用于克隆带有启动子和 shRNA 的表达 cassette。siSTRIKE 粘端切口，一端带有 U6 启动子，方便 shRNA 对应的 Oligo 退火产物的连接，但这个载体用完需要重新购买，不像 siLentGene 载体可以再生重复使用。价格 2340，比 Ambion 便宜将近 2000 元，试剂盒包含线性化载体，连接酶，不过没有正负对照质粒，需要自己设计和构建。

Invitrogen 的 shRNA 表达系统最具特色的是一个可诱导表达 shRNA 的系统----BLOCK-iT™ Inducible H1 系统，启动子添加了四环素操纵子，可在四环素诱导下表达 shRNA，也就是在你想要的时候才诱导沉默目标基因的表达，有助于研究那些细胞生存的关键基因沉默。也有组成型表达的常规的 U6 启动子载体。Invitrogen 对独家的 Gateway 技术感觉非常良好，几乎各种载体都要整合 Gateway 技术，这里也不例外----只要把合成的 shRNA 对应的 DNA 序列克隆到一个对应的 Entry 载体中----如果要做瞬时基因沉默，就到此为止，直接用这个载体转染细胞即可，如果要做长效基因沉默，或者质粒转染不成功要转用病毒载体，可以用 Entry 载体和其他的 DEST 载体通过 Gateway 技术重组，将 shRNA 表达框整合到同系列的慢病毒或者腺病毒病毒载体上。

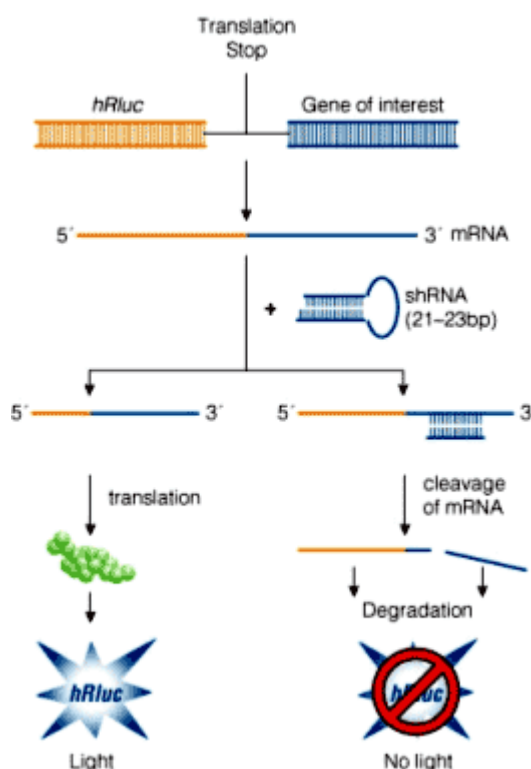
特别的 siRNA 筛选质粒

正统的检测 siRNA 是否有效的方法是转染后通过荧光定量 rRT-PCR 检测目标基因的 mRNA 水平下降程度，但是目前出现了一些相对更快速的检测 siRNA 是否有效的方法。

比如 Promega 的 psiCHECK 系列。这个快速检测的原理是将目标基因克隆到 psiCHECK 检测质粒的荧光素酶报告基因下游,中间以终止密码间隔(避免转录终止信号出现),两基因共用同一个启动子的结果是转录时会转录在同一条 mRNA 上。将目标基因 shRNA 对应序列克隆到另一个 shRNA 表达载体 siLentGene 上,两个质粒共转染目标细胞株,psiCHECK 质粒上同一启动子下转录得到的 mRNA 包含 2 个基因,报告基因在上游,目标基因在下游,中间以终止密码间隔。mRNA 翻译产物为 2 个独立的蛋白,一个是荧光素酶,另一个是目标基因产物。如果另一载体表达的目标基因对应 shRNA 有效,则会诱发混合基因的 mRNA 降解,最终导致产物之一的荧光素酶降低。分别以非靶向 shRNA 载体和荧光素酶 shRNA 载体作为对照,借助 Promega 最拿手的荧光素酶定量检测试剂就可以定量检测荧光素酶表达下降的程度,间接反应 siRNA 沉默基因表达的效率。这个方法设计相当巧妙,优势是细胞培养结果可以直接裂解细胞后检测,避开相对麻烦的 RNA 纯化和荧光定量 PCR 检测,更适合高通量大规模筛选;二是可以在检测 siRNA 阶段避开一些难转染的细胞,将反应暂时转移到其他容易操作的细胞中,或者用来对付有细胞毒性的基因。

这个设计可以用于一些特殊的用途,比如生物通前面提到的,如何设计能识别目标 mRNA 仅有单个碱基区别的 siRNA?要进行这个研究,就要研究 siRNA 每个位置的碱基结

构和识别模板特异性之间的关系时----那就需要针对 siRNA 的每个位点设计完全匹配和不完全匹配的目标 mRNA,从而研究 siRNA 是



否能作用----哪来这么巧可以找到这么多的天然目标基因呀?通过 psiCHECK 就可以搞定----摆脱了天然基因和细胞系的限制,你可以随心所欲的设计你的实验。再者,仅有单碱基差异的 2 个基因在 mRNA 定量检测中难以区分,而荧光素酶报告系统正好可以解决这个问题。

在 psiCHECK 设计上之所以用终止密码间隔报告基因和目标基因,一来可以避免产生融合蛋白影响报告基因的检测,二来可以减少目标基因插入时的表达框架的顾虑。另外还可以用来检测一些有毒的基因片断。采用荧光素酶的优势是可以定量检测,不过检测试剂花费不小。同样是荧光检测,为什么不用活细胞即可检测,速度更快,无需反应底物,检测更加便宜的绿色荧光蛋白 GFP 呢?按照厂家的说法,是由于活细胞荧光检测存在一定的困难,难以定量,需要用流式细胞仪检测。不过我猜可能有专利权的因素,而且 Promega 最拿手的就是荧光素酶检测呀,能用上的哪能不用。不带抗生素筛选标记,双质粒转染效率对结果会有影响,不过由于这个目的只是检测 siRNA 是否作用即可,因而可以忽略。



2. 体内 shRNA 表达及对付难以转染的细胞株、原代细胞，完全分化静止细胞之策略二

除了质粒载体，shRNA 还可以用病毒载体表达。由于病毒感染细胞的效率远远高于任何转染试剂，对付那些难转染的细胞系，原代细胞，彻底分化的静止细胞等，病毒载体是除电转之外的另一个选择，病毒载体也是动物活体内表达 shRNA 的手段之一。目前最常用的哺乳动物细胞病毒载体包括：逆转录病毒 (Retrovirus)，腺病毒 (Adenovirus)，腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV)，和慢病毒 (Lentivirus)。其中逆转录病毒和慢病毒等载体还可以用于构建整合到染色体上的稳定的长期基因沉默细胞株。为安全起见，通常病毒基因组中的重要元件都被拆分到 2-3 个载体中，一个用于构建外源基因插入的重组载体，一个包括其他病毒蛋白或者包装元件，在实验中共同转染到包装细胞中，最后包装成为具有感染力同时携带重组基因信息的重组病毒；最后用重组病毒感染目标细胞株。在几个病毒体系中，以慢病毒和腺病毒载体最有代表性。慢病毒是逆转录病毒的一种，具有逆转录病毒的几乎全部优点，可以整合到染色体稳定表达，也可以感染包括静止期细胞在内的各种细胞，更优于传统的逆转录病毒。而腺病毒则以游离染色体外做瞬时表达而见长。

腺病毒 shRNA 载体：腺病毒可以非常高效感染多种哺乳动物细胞株和组织，由于其感染不受细胞周期限制，可以感染分裂期或者非分裂期细胞，因而特别适合连逆转录病毒也难以对付的完全分化的静止期细胞。由于不能整合到染色体上，因而不能作为长期稳定表达 shRNA 之用，不过也因此减少了插入突变的风险，有短期治疗的前景。腺病毒容易引起哺

乳动物的免疫应答。腺病毒 shRNA 载体操作需要将目标 shRNA 克隆到线性病毒载体中，和辅助质粒共转染 HEK293 包装细胞，得到包含 shRNA 表达框的病毒颗粒，然后感染目标细胞。Ambion 公司的 pSilencer™ adeno 1.0-CMV System 是选择 CMV 启动子，5 次转导价格 8800 多，包含构建载体转染包装细胞用的转染试剂等在内的全套系统腺病毒载体构建相关试剂，但是不含包装细胞。

生物通 eBioTips24: HEK293 包装细胞的活力对病毒的产生和产量影响很大，传代数越小越好，40 代以上的不要用。10 代以内为好。

逆转录病毒 shRNA 载体：想要建立长期稳定的 shRNA 表达细胞株，研究长期基因沉默，逆转录病毒是更适合的选择。由于可以随机插入基因组中，得到稳定的 shRNA 表达细胞株，因而可以长效干扰目标基因表达。不过由于随机插入，也有插入突变的风险。逆转录病毒可以感染广泛的哺乳动物细胞株和组织，可以用于体内或者体外 RNAi 实验。由于逆转录病毒的感染以来细胞分裂周期，所以不能用于彻底分化的非分裂期细胞。实验步骤包括将目标基因 shRNA 对应的回文结构 DNA 序列插入线性载体中，转染包装细胞，得到的病毒颗粒就可以用于感染目标细胞株。Ambion 的逆转录病毒载体有 U6 和 H1 这 2 种启动子可供选择，pSilencer. 5.1 Retro (20 次反应) 价格 4249，只包括线性化病毒载体和正对照载体颗粒，负对照空白载体，DNA 退火 Buffer，不含包装细胞。

慢病毒 shRNA 载体：慢病毒 Lentivirus 是逆转录病毒的一种，可整合到染色体上，也很少引发干扰素响应，经过改造后，可以感染几乎任何一种细胞，包括静止期的细胞如神经



细胞,因而兼具前面几种病毒载体的优势,优于传统的逆转录病毒。如果你的实验不必担心整合到染色体上的问题,又需要长期基因沉默效果,目标细胞又很难转染,那慢病毒可以说是非常理想的选择。不过也要留意染色体上随机插入整合可能导致沉默效果的差异,也可能导致非预期的结果,特别后面一个问题也限制了其在治疗的应用。慢病毒转导效率一般90%以上,可以高达100%。如果实在不确定你的细胞是否可以用慢病毒转导,可以

PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>)查。

慢病毒 shRNA 载体 Sigma、Dharmacon 和 Invitrogen 公司都有,各有特色。Sigma 公司的 Mission TRC shRNA 慢病毒提供的是已经设计好、克隆、测序验证过、包装好的病毒颗粒,质控滴度达到 1×10^6 TU/ml,实际平均滴度更高,买来即可马上用于转导难对付的目标细胞,由于省掉了设计、Oligo 合成、克隆筛选和测序,还有讨厌的病毒包装步骤,可谓超级方便。Mission TRC shRNA 慢病毒库是基于麻省理工(MIT)和哈佛等 11 个著名研究所及制药公司组成的 RNAi 协会(The RNAi Consortium, TRC)研发的强大技术平台,其中包含靶向人类 15000 个基因对应的 75000 个 shRNA (每个基因平均对应 5 个 shRNA) 克隆,和小鼠 15000 个基因对应的 75000 个 shRNA 克隆。

Mission 慢病毒主要元件分别位于 3 个载体上,信号和顺势作用元件位于 Transfer 载体上,shRNA 对应的 DNA 序列就克隆在这个载体上的 LTR (long terminal repeat) 之间,启动子是 U6 启动子;所有病毒结构和复制必须的元件都克隆在另外的 Packaging 载体中;envelop 载体包含各种衣壳蛋白组分,还包含了 VSV-G (glycoprotein of vesicular stomatitis

virus)蛋白,使得包装出来的重组病毒颗粒可以感染几乎任何一种细胞,包括非分裂的,彻底分化的细胞。这 3 种载体一起共转染包装细胞 HEK293,只有 Transfer 载体上的 LTRs 之间的序列被包装组合成重组病毒颗粒。利用重组病毒颗粒感染目标细胞,LTRs 间的序列会整合到染色体中,使得目标 shRNA 得到稳定持续的表达。如果你的研究目标是人或者小鼠基因,那 Mission 真是方便之选。

大名鼎鼎的Dharmacon公司也和慢病毒载体的专业公司Lentigen合作,提供用户定制的shRNA慢病毒颗粒,只要用户提供基因的ID,Dharmacon公司就可以帮你设计好shRNA,构建shRNA载体,测序、包装制备得到滴度高达 10^8 TU/ml的病毒颗粒,你可以立即用于实验。同样是嘌呤霉素筛选标记,启动子是sCMV,还有TurboGFP报告基因,可以用流式细胞仪测定转导效率。VSVg包装蛋白使得该慢病毒体系几乎可以感染绝大多数的细胞,包括非分裂的静止期细胞。慢病毒转染效率一般90%以上,可以高达100%。不过具体实验前也需要摸索条件,包括MOI, Polybrene的浓度,细胞密度等。

生物通 ebiotips25: 感染复数 Multiplicity of infection (MOI)通俗的说是指有效转导时每个细胞需要病毒的颗粒数; Polybrene 和 Hexadimethrine bromide (海美溴铵, HDB) 通属于多价阳离子聚合物,凝聚胺,可用于中和细胞膜上电荷从而提高转导效率 2-8 倍。确定好细胞密度, MOI, Polybrene 后,按比例将病毒颗粒加入培养细胞中,温育 4-19 小时就可以。

Invitrogen 公司提供的 BLOCK-iT 慢病毒 shRNA 表达载体,借助 Gateway 技术构建,将 shRNA 序列克隆到 Entry 载体、测序验证后,可以通过同源重组的方法将 shRNA 表达



框架转移到慢病毒 DEST 载体中。采用 BLOCK-iT 自行构建任何自己感兴趣的目标基因 shRNA 病毒颗粒,但从实验的角度来说,如果不是非要诱导表达,不妨优先选择 Sigma Mission TRC shRNA 现成的病毒颗粒,毕竟包装病毒还是件很费钱很费力的工作。

3. 质粒 DNA 的转染

质粒 DNA 的转染本身和 RNAi 实验并不直接关联,生物通在新技术专栏里有做过转染

专题,里面有介绍各类转染试剂的特点和价格。我们在这里不再重复。当然,时隔两年,不断有新的产品推出,生物通将于近期重新整理添加补充新品信息。至于有无必要专门用于 shRNA 质粒载体的转染试剂?答案自然是不需要的。

但是有一种情况例外,就是将 siRNA 和质粒共转染细胞,我们前面有介绍几种可用于共转染的转染试剂。



MISSION™ shRNA Libraries由麻省理工和哈佛等11个著名研究所及制药公司组成的RNAi协会 (The RNAi Consortium, TRC) 所研发,共包括靶向人和小鼠各15,000个基因的150,000个预制的shRNA克隆,可用于瞬时和/或稳定的转录沉默实验,是研究基因功能以及探索开发新药的强大技术平台。**Sigma-Aldrich于2005年3月成为RNAi协会的一员,参与这一技术平台的研发与生产,并负责推广与销售。**

产品特点:

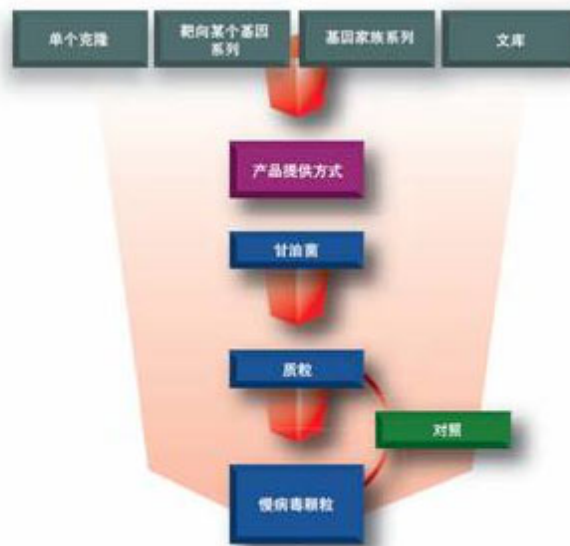
- 全面,针对每个基因有3-5个不同位点的克隆
- 经济,质粒可复制
- 灵活,可用于瞬时或稳定的RNAi试验
- 慢病毒颗粒,让转染率不再是问题
- 质量保证,每个克隆都经过测序验证

您可以输入基因的RefSeq No, Gene Symbol等信息查找该靶基因相关的系列。每个系列包括3 - 5个克隆,最大可能地覆盖了基因序列,以便于结果分析。某些系列还包括针对基因 3' -UTR的 shRNA克隆,可用于phenomic rescue 实验,使您的实验更严谨。

- 搜索单个靶基因系列
- 也支持同时搜索多个靶基因系列

Gene Family Sets 靶向某个基因家族的系列

Target Sets & Individual Clones 靶向某个基因的系列& 单个克隆



The RNAi Consortium (TRC)-- 致力于研究与推广 RNAi 技术平台的国际性组织

- Academic Institutions
 - Broad Institute, MIT/Harvard
 - Massachusetts General Hospital, Harvard
 - Dana Farber Cancer Institute, Harvard
 - Whitehead Institute, MIT
 - Washington University
 - Columbia University

- International Life Science Organizations
 - Sigma-Aldrich
 - Novartis
 - Eli Lilly
 - Bristol-Myers Squibb
 - Academia Sinica, Taiwan



Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司

热线电话: 800-819-3336

sigma-aldrich.com





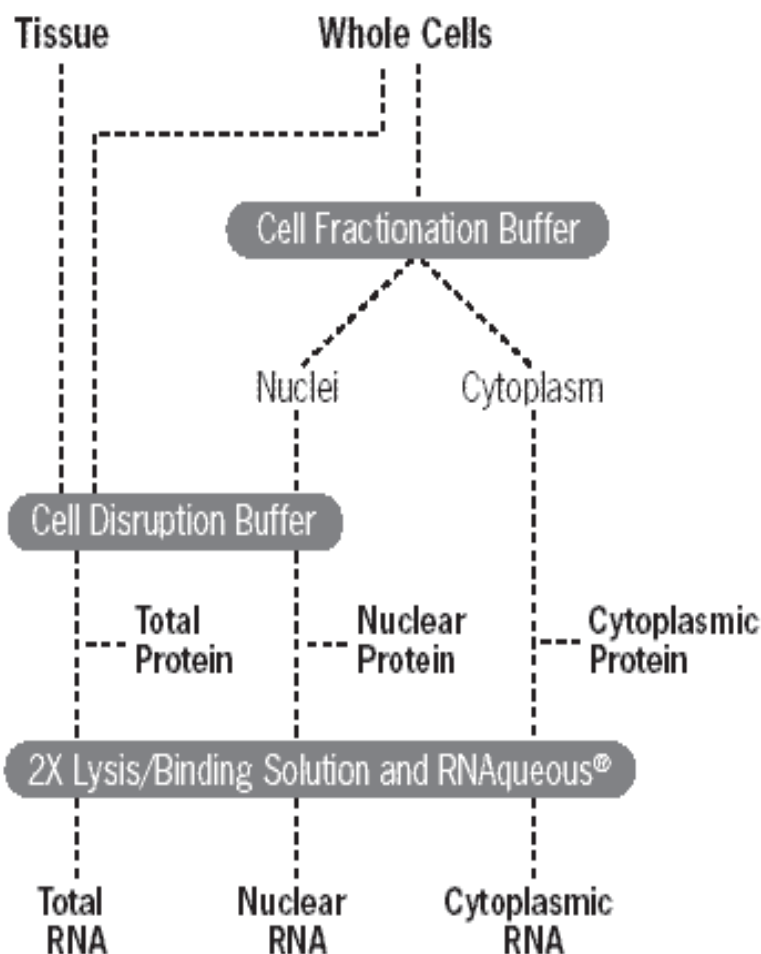
实验结果分析

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。





体内 RNAi 经验大家谈

对于那些之前只能用基因敲除小鼠来研究基因功能而备受挫折的研究人员而言，体内 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）技术的出现就好像是救兵一般，令人欣喜。基因敲除方法欠缺灵活性而受到很多限制，比如不能用于人，周期长、操作难度大、成功率低、不可逆、基因组整体敲除非局部，不能用于关键基因等等；而相反，体内 RNA 干扰使研究人员在时间和空间上灵活调控基因敲除效果成为可能。对于那些由于某些基因过表达而导致的疾病，比如老年痴呆症、一些癌症、视网膜病变、哮喘、慢性肺部阻塞、SARS、风湿性关节炎等等，RNAi 技术可以阻断过表达基因而成为潜在的治疗新方法。

但是这并不意味着体内 RNAi 是一件容易完成的实验，实际上体内 RNAi 最令人困扰的难题是——递送——如何有效将 siRNA 传递到目标细胞内。同样的问题也存在于培养细胞。就像来自 Integrated DNA Technologies 公司的 Mark Behlke 说的一样，“在体内，问题其实是一样的，不同的只是要更加困难十倍”。研究人员需要将 siRNA 导向指定的靶器官和靶细胞，有效的转染细胞，并且还要解决好毒性和脱靶的问题。

体内 RNAi 实验可分为主流的递送方法可分为 2 大类，病毒载体和人工合成的 siRNA，后者又可分为 2 种途径：局部给药（Local 即目标区域局部注射）和全身给药（Systemic，包括(尾)静脉注射、肌肉注射、腹腔注射等方法）。局部给药的用量低、靶向性强、siRNA 定位好、也降低了对其他器官的影响，但是在操作上难度很大。目前报道中成功的例子仅限于鼻内给药、肝脏内给药、睾丸内给药、肌肉注射、视网膜内注射、肿瘤内注射等。眼部局域注射 siRNA 恐怕是目前最成功的体内 RNAi 例子。早在 2003 年 Reich 就报道在小鼠视网膜下腔（subretinal space）注射靶向 VEGF 的无标记 siRNA 成功减少眼部血管生成。Acuity Pharmaceuticals 的 siRNA

药物更在 II 期临床大获成功，有望成为第一个 RNAi 药物。在大鼠实验中，靶向痛觉相关阳离子通道 P2X3 的修饰 siRNA 经植入泵灌注到蛛网膜下腔，成功阻断大鼠神经疼痛响应，证明局域注射 siRNA 于鼠类大脑可用于研究中枢神经系统相关的基因功能。2005 年中国学者用鼻腔给药的方法将 SARS 病毒相关的 siRNA 递送到恒河猴肺部有效降低了发烧、减低了病毒和肺泡损伤。这提示 siRNA 在对付肺部传染性疾病有一定的前景。

全身给药操作简单，但是 siRNA 靶向性差，问题不说也想得到。2003 年 Song 等人以尾静脉注射方式将靶向 Fas 的 siRNA 注入小鼠体内，发现 siRNA 汇聚于小鼠肝细胞内并录得 Fas 基因表达沉默，保护肝细胞不受 Fas 抗体和 ConA 诱导的细胞凋亡，以及爆发性肝炎。同样方法注射 Caspase 8 siRNA 保护小鼠不受由 Fas 抗体或者 Fas 受体激活而引发的肝急性损伤。Soutschek 等人 2004 年在 Nature 的文章表明低剂量常压静脉注射经过胆固醇包被的 siRNA 能定向在小鼠肝脏和肠内引发目标载脂蛋白 B 的降解

另外一个问题是 siRNA 的稳定性。有资料显示 siRNA 在 100%血清中的半衰期仅为 10 分钟不到。这个问题可以通过化学修饰



siRNA 或者靠递送试剂保护 RNA 不受到核酸酶、免疫反应、其它脱靶效应的影响，从而加以加以改善。不过，最新的研究结果表明，siRNA 代谢排出体外的速度也是需要考虑的问题——虽然化学修饰确实有助于提高 siRNA 稳定性，可是很多时候这不太需要——修饰的 siRNA 在降解发生前就已经被排出体外了，而脂质体或者纳米颗粒在改善药物代谢动力学和药物靶向性等方面比化学修饰更有前途，对于人工合成的 siRNAs，目前可行的递送试剂有 3 大类：**阳离子脂质体类**可以中和核酸负电荷使其容易通过细胞膜，在培养细胞中表现良好，但是在体内实验中表现出更高的毒性和更低的转染效率；**聚多胺类转染试剂**（dendrimer，例如 Ambion 的 siPort Amine、Qiagen 的 Effectene 和 Transmessenger、Sigma 的 Nanoparticle 等）在体内实验中表现出比脂质体的转染效率显著提高、细胞毒性更小等优势，对于体内实验来说更优于脂质体。第三类是去端肽胶原 *atelocollagen*，这种广泛应用于医学领域（作为支架）的一种低免疫原性、低毒性的蛋白质，由于可以增加细胞内吞、提高对核酸酶抗性、延长 siRNA 释放，应该会成为非常有前景的体内 RNAi 递送试剂。新一代的传送方法，比如纳米粒子，PEG 修饰脂质体（*pegylated liposomes*）初露曙光。可惜这些方法通常难以制备，除非你有在化学或者制药学方面的合作伙伴，否则“你只能从资料上查到它们，但是就是搞不到。”

由于病毒转导 shRNA 的效率非常高，可达到 100%，病毒载体传送短发夹结构编码 siRNA 是一种更为有效的敲除方法。但不适合一些实验应用的需要。

电转移也是非常有效的方法，几乎可以对付各种难缠的细胞和组织。有报道说局部电击也有助于细胞内吞 siRNA。不过对于体内实

验来说还有很多问题有待解决。

对于第一次进行体内 RNAi 实验的研究人员来说，这些都是问题，ABI 的 Steven Suchyta 说，“并没有什么捷径可以让你轻松过关，可以借鉴的只是经验”，毕竟，体内 RNAi 实验是基因功能研究的必由之路，也是 RNA 干扰应用于临床前的必经之路。到底该如何做体内 RNA 干扰，我们不妨从以下用户体验中借鉴一下。

肿瘤敲除

实验人：德国埃朗根大学（University of Erlangen）肝病学与肿瘤学教授 Matthias Ocker

项目：敲除抗细胞凋亡基因 Bcl-2，以及其它与胰腺癌，肝癌相关基因

问题：将 siRNA 传递到全身肿瘤

方法：Ocker 的实验室将培养的肿瘤细胞作为异种移植注射到小鼠中，待这些肿瘤生长之后，研究人员以低剂量（体重 100 mg/kg），低体积（每天 100ml），通过腹腔注射，将溶于生理盐水的未修饰 siRNA 注入小鼠，对靶基因进行系统敲除。

Ocker 表示，“我们也发现使用的载体对于敲除效率十分重要，生理盐水或者 PBS 都不错，但无菌水效果却不好。”

优点：全身性的 siRNA 传输对原位癌和转移癌已经扩散的癌症来说是有意义的。

缺点：没有运输载体靶向特异性的细胞类型，降低了效率。

底线：Ocker 表示，“针对癌症，你需要一种系统性的方法”，“目前存在个大问题——我们现在缺乏一种能专门帮助胰腺癌细胞特异性吸收（siRNA）的运输载体或者靶向工具”。要解决这个问题需要一段时间，来自哈佛医学院的 Judy Lieberman 最近发现融合有抗体片段的融合蛋白能识别特异性受体，从而



可以靶向乳腺癌细胞。

特异靶向

实验人：德州大学医学院麻醉学副教授

Helen Lee Hellmich

项目：研究大鼠海马区因脑外伤而表达上调的神经元一氧化氮合成酶及 其它基因的治疗前景

问题：如何在正确的时间靶向正确的器官

方法：Hellmich 等人利用芯片技术鉴别出在受伤后几天（而不是几个小时）增加表达的基因，并以此作为瞬时 RNA 干扰的靶标。

Hellmich 最早将 siRNA 克隆进了一个腺病毒载体——能持续表达 4 个星期，比起其它整合型病毒载体时间更短。为了向临床靠拢，

Hellmich 转向用阳离子脂质体包裹 siRNA，立体定位注射（stereotactic injection）到海马 CA3 区域，在几个小时到几天的时间内，siRNAs 获得了更精确的瞬时传递。由于 Hellmich 在 RNAi 方面缺少经验，因此他采用了商业产品来完成。“我从厂家购买了这个产品，祈祷获得最好的结果。”

优点：

- 比较于基因敲除小鼠，siRNA 更容易推测得到的表型

- 公司能提供一些现成的产品

缺点：

- 通过手术定向给药困难
- 对于不同的基因，过程需要重新优化

底线：鞘内注射（Intrathecal injection），这是一种靶向大脑的常见方法，但对于靶向大脑某些特定区域并不合适。Hellmich 的方法能得到体内 50%—60% 的基因沉默，她说，“这也许足够了，如果一个基因对于生存而言是必需的，那么你只要敲除那些过量表达的部分就可以了”。终极而言，这个领域需要更好的

递送系统，现有的产品“也许并不是最优的，但五年来，我得说至少是可以用的。”

病毒入侵（Viral Invaders）

实验人：南阿拉巴马州立大学微生物学和

免疫学教授 Sailen Barik

项目：敲除编码呼吸融合病毒

(Respiratory Syncytial Virus, RSV) 功能亚基的基因，阻断病毒在小鼠体内感染

问题：将脂质体方法传递与化学修饰 siRNA 和 27bp 的 siRNA 结合的情况下，操作方法通用。

方法：通过鼻内给药的方法将阳离子脂质体和 siRNAs 复合物递送到目标。Barik 说：“对于呼吸病毒来说，这是最好的途径，因为病毒基本上停留在肺中，不会扩散到其他部位。”未经修饰的 siRNA 也是有效的，但效率低。于是研究人员对其进行化学修饰，但困难是如何确定对 siRNA 修饰的位点，因为经过修饰后，原本有效的试剂有时会无效。他们还尝试了 27mer 链，Barik 说结果没有明显改善。

优势：对于肺部研究，存在一个有效的传递途径

缺点：某些参数修改意味着需要重新优化操作流程

底线：要将不同的方法整合起来应用，需要付出很多劳动。已发表的操作方法不一定有什么帮助。“我认为现在应该将不同的化学修饰与 27mer 结合起来，检测在体内的效果，”Barik 说，化学修饰通常有效，“但 你得指出在你的系统中哪个位置修饰才有用。”更何况，化学修饰过的 siRNA 在使用递送试剂时，情况完全不同。”

载体敲除（Vector Knockdown）



实验人：斯坦福大学研究生 Daniel

Paskowitz

项目：敲除成体大鼠视网膜中的基因，研究视网膜病变

问题：维持遗传表达的稳定性

途径：Paskowitz 通过注射的方式，利用腺相关病毒（adeno-associated viral，AAV）载体将 shRNA 递送到视网膜中。Paskowitz 说 DNA 能够以一种比 siRNA 更稳定的方式被递送到细胞内。尽管大多数 AAV 载体的表达需要 2—4 周，但利用一种经多个实验室改进的强启动子将表达时间缩短到几天内。

优点：shRNA 载体在“定位导向”上比 siRNA 更灵活。研究人员可以同一种已经优化的病毒载体输送方法来输送不同的 siRNA，一些病毒亚型有细胞特异性，可用于定位导向。

缺点：敲除效果好坏不一，克隆病毒载体比直接用 siRNA 需要的时间长，许多病毒载体需要较长时间开启表达。

底线：“不是所有的 shRNA 效果都一样，”Paskowitz 说，“预测哪个有效、哪个无效，仍然不可能。”不同病毒有不同的表达时长，但在视网膜中，AAV 递送的基因基本上是持续表达的。虽然 Paskowitz 实验中使用的器官（视网膜）局部递送 siRNA 并不困难，但他认为，病毒载体传递比大多数 siRNA 方法灵活。某些 AAV 特异感染感光细胞，其它的特异感染色素细胞，理论上，可以利用不同类型病毒靶向截然不同的细胞类型。

全面敲除取代（Full-on Knockout Replacement）

实验人：哈佛大学医学院非肥胖型糖尿病小鼠中心管理员 John Stockton

项目：构建可遗传的基因敲除，如与 I 型糖尿病有关的 CELA4。

问题：多个病毒整合位点导致表达水平差异。

方法：Stockton 与其同事通过显微注射，利用慢病毒载体将 shRNA 递送到小鼠胚胎，然后将这些胚胎移植到预先怀孕的雌鼠体内。雌鼠所产子代体内靶基因被部分敲除。“与普通转基因过程相似，”Stockton 说，“但这里，因为出现不同的病毒整合插入位点，表达水平更加有差异。”

优点：可遗传的、永久的基因抑制效果；比构建基因敲除小鼠快 3 倍；适用范围广，除小鼠外还可用于鸟、鱼、大鼠、家畜。

缺点：不完全敲除；表达率不稳定；慢病毒的生物安全等级为 2，操作要小心。

底线：编码 RNAi 的病毒载体能快速实现类似传统基因敲除的功能。但目前只能部份阻断靶基因的功能。不管怎么说，该技术不仅更快而且更有效。运气好的一天就可以 100% 成功，一般的成功率也接近 30%，比核内注射（pronuclear injection）的效率高，Stockton 认为，第一代小鼠体内有 10%—40% 的细胞能表达 hRNA，这种差异性在其子代就会稳定下来。



2007 赛默飞世尔 中国生物实验室安全调查



八、不能不说的 microRNA

microRNA 绝对是 RNAi 领域另外一个耀眼的明星。在自然界的 RNAi 通路中，microRNA 才是真正的主角。这种内源性的非编码区小分子 RNA 针对 3'端非编码区，有着极高的保守性，并在组织中广泛表达，可在转录后以及翻译水平上调控基因表达，可能在不影响 mRNA 的水平下调控基因表达。有人推测 siRNA 实际上不过是外源或错误的 dsRNA 闯入 RNAi 通路的结果而已。以下是 miRNA 区别此文提到的 siRNA 之处：

- ✧ 内源而非外源序列
- ✧ 针对非编码区
- ✧ 物种进化极为高度保守
- ✧ 组织中广泛表达
- ✧ miRNA 可能调控多种关键基因

- ✧ 可在转录后以及翻译水平上调控基因表达，可能在不影响 mRNA 的水平下调控基因表达

最后一点应该是 Affymetrix 公司最不愿意看到的啦——如果 miRNA 可以在不影响 mRNA 水平的情况下调控基因表达水平，那么基于 mRNA 反转录 cDNA 而进行的基因芯片筛选结果恐怕要重新评估了。鉴于 miRNA 在进化过程中如此高度保守，有人推测其功能可能参与多个关键基因的调控有关——牵一发而动全身，所以不能动嘛。miRNA 的研究重点和手段和 siRNA 有所不同，更多关注于机制的研究。miRNA 研究产品也非常丰富，由于篇幅所限，生物通将另文专门介绍 miRNA 相关产品，在这里就不再罗嗦。

生物通编者后记：RNAi 技术大热必然推动 RNAi 技术的广泛应用和快速发展。技术的快速更新和产品的更新换代对于研究人员来说绝对是好事——手中的工具越强大越先进，就有机会更快挖掘到科学的宝藏，比的就是速度（还有点运气吧），这和淘金一个道理。作为曾经在实验室艰苦条件下摸爬滚打多年的人，我始终觉得，研究人员如果能及时掌握最新研究工具，使用先进的研究工具，就能加速实验进程，从而把有限的时间和精力全部投入到思考如何更快获得更有价值的结果上。毕竟，有高质量的文章发表，才更容易获得更好的资助，才有更高的学术地位，才能更好体现研究人员价值，这比耗费大量精力和时间来节约几个 Kit 的费用，要更能形成良性循环——特别是经济效益方面。我们深知每个人的时间和精力是有限的——生物通此文旨在帮助研究人员在“一瞥”（at a glance）之间快速了解 RNAi 技术的踪影，以及市面现有哪些好用的 RNAi 工具——希望有助于各位在各自的研究课题中更好的利用 RNAi 技术来达到加速研究之目的。

TITLE *MIRNA PROFILING*

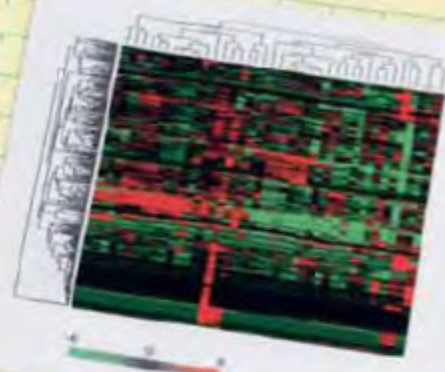
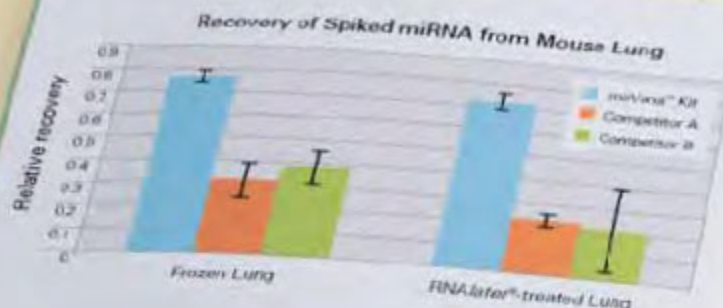
Form Page No.

Project No.

Book No.

63
2

Page



The mirVana miRNA Isolation Kit recovered the most miRNA compared to two other kits

TaqMan MicroRNA Assay based profiling elucidates miRNA expression patterns across tissues and disease states

mirVana™ microRNA Isolation.
TaqMan® Assay Quantitation.
All in Real Time.

miRNA Expression Analysis Made Simple.



Gene Company Limited
基因有限公司 A Gene Group Company

基因公司携手Ambion助您
完成RNA干扰实验

Ambion®
THE RNA COMPANY®

香港: 852-28966283
广州: 020-85524840
武汉: 027-87166462
济南: 0531-86560825
西安: 029-82501170

北京: 010-51665161
天津: 022-88293136
昆明: 0871-5199992
南京: 025-83248693
杭州: 0571-87229824

上海: 021-64951899
成都: 028-85254936
沈阳: 024-23341315
长沙: 0731-4476562
重庆: 023-68614842



生物通
www.ebiotrade.com