

一种新的用于诱导DNA和siRNA共转染的通用脂质体转染试剂——X-tremeGENE siRNA 转染试剂

Robert Slany

Department of Genetics, Friedrich–Alexander University, Erlangen, Germany



Robert Slany

背景介绍

siRNAs (small inhibitory RNAs) 已经成为许多实验室研究的重点。这些小分子物质提供了一种抑制哺乳动物细胞特定基因表达的简单方法，且不需要采用经典的基因剔除 (gene knockout) 技术。

siRNA介导的基因沉默在进化上是高度保守的。可能所有的高等真核生物都含有一种酶系 (Dicer RNase)，这种酶能将双链RNAs (double-strand RNAs, dsRNAs) 加工成小的“引导”分子。这些加工后的21-24bp的双链RNA短片段被称作siRNA，它们可以进一步激活细胞的RNase 酶体系（称为RISC complex）。RISC复合物特异降解与siRNA互补的mRNA序列。RNAi应用于哺乳动物细胞的一个重大发现是，将21-bp的双链RNA短片段导入哺乳动物细胞会有效的引发基因沉默，但并未引发所谓的干扰素反应。这种机制在哺乳动物细胞中作为一种抗病毒的方式，并且与任何长片段dsRNA结合阻断蛋白质的合成[1]。

因此，在实验室进行RNAi的实际应用，需要一种能有效的将短片段的dsRNA导入哺乳动物细胞的方法。另外需要克服的困难是要优化siRNA的序列。每一个21-bp dsRNA引起相应mRNA沉默的效率是不同的。尽管可以利用先进的siRNA设计工具，但仍然需要进行大量的实验室检测。大多情况下，要求检测方法尽量简单并且能快速检测RNAi对于靶蛋白的抑制效率。共转染siRNA和携带靶基因的表达质粒

提供了解决这个问题的方法。这个体系的另一个优点是即使没有靶蛋白的抗体，也可以在蛋白水平检测基因沉默。大量的抗原标识物可以用来和靶基因的cDNA融合。而且这样也可以评估siRNA的特异性，这也是对于每个RNAi实验都必须检测的。并且非靶序列引起的基因抑制可以通过加入在siRNA识别序列含有突变的表达载体来进行甄别。

经典的磷酸钙转染法转染小片段dsRNA的效率非常低。因此，一系列新研发的脂质体转染试剂被用来检测共转染DNA和siRNA的效率。

材料和方法

转染前一天，将人胚胎肾脏细胞株293T转移至6孔板培养，每孔4 ml DMEM培养基(4.5g/l葡萄糖，10% FCS和青霉素/链霉素)，细胞密度 1×10^7 细胞/孔。过夜培养后，细胞转移至2 ml无抗生素的DMEM/FCS培养基培养。

所有的siRNA均由Dharmacon Inc公司(Lafayette, CO, USA)化学合成。在125 μ l无血清DMEM培养基中加入0.6 μ g表达载体(含有CMV启动子)和6.25 μ l 20 μ M的特异siRNA或对照siRNA溶液(专一靶定核蛋白Lamin C)，最终总核酸含量为2.5 μ g。同时，将25 μ l X-tremeGENE siRNA转染试剂加入100 μ l无血清DMEM培养基，然后将混合物迅速混入稀释好的核酸溶液。两种溶液混合，室温放置20分钟后，将混合液逐滴加入细胞中。转染24小时后，通过显微镜观察细胞活性，并提取蛋白进行免疫杂交分析。对照反应采用其他公司的脂质体试剂，所有操作按照各自的使用说明。

结果和讨论

加入脂质体试剂24小时后,没有任何一个试剂引起明显的转染细胞死亡。但是,通过特定蛋白表达抑制的分析可以发现,只有A公司产品和罗氏公司的X-tremeGENE siRNA转染试剂能将DNA和siRNA同时导入细胞[图1]。

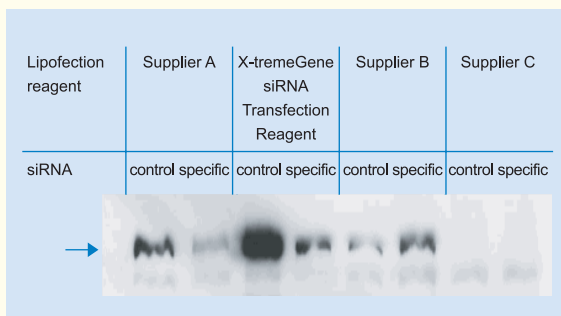


图1: immunoblot的经典实验。细胞共转染0.6 μl 构建有带FLAG标签的蛋白基因的表达载体和6.25 μl 含20 μM siRNA 或对照lamC siRNA的溶液。箭头所指位置为预计带FLAG标签蛋白的位置。蛋白上样量相等(20 μg/lane)。试剂按说明使用。

利用B公司试剂转染,可以检测到蛋白的表达,但是完全没有发现RNAi的干扰作用,说明该试剂对于RNA转染没有效果。C公司的脂质体转染试剂对于DNA/RNA混合物的转染没有效果。比较可以看出,利用A公司的试剂和罗氏公司提供的X-tremeGENE siRNA转染试剂转染可以见到明显的靶基因表达抑制。两者脂质体

组分比较显示, X-tremeGENE siRNA转染试剂的效果更好。采用X-tremeGENE siRNA转染试剂,表达的蛋白浓度更高,显示该试剂的转染效率较高。高的转染效率使得较少的细胞就可进行蛋白检测,采用X-tremeGENE siRNA转染试剂只需较小的细胞量,因此利用该试剂可进行高通量的检测。

通过比较特定siRNA和对照siRNA的抑制效率可以发现,无论转染DNA或RNA, X-tremeGENE siRNA转染试剂都表现高的转染效率。这一点非常重要,因为对于任何一种核酸序列的转染偏好可能极大影响RNAi的效率,进而导致对潜在的抑制效率误判断。总之,对于任何形式与siRNA的共转染,X-tremeGENE siRNA转染试剂提供了一种新的更好的方法。

Reference 参考文献

1. elbashir SM et al.(2002) Nature 411:494-498

品名	包装	目录号
X-tremeGene siRNA Transfection Reagent	1ml (24孔板可完成400次转染)	0 4476093 001 NEW!

更多siRNA转染信息,请登录www.roche-applied-science.com/sis/fugene

产品信息

Complete™片

方便及可靠的蛋白酶抑制剂

有了comPlete™蛋白酶抑制剂混合片,您便不用再花时间去寻找合适的抑制,只要将一片comPlete™加进缓冲液,您便可抑制多种不同的蛋白酶,有效地保护您的蛋白。

方便:

- 用一片complete™便能抑制很多种不同的蛋白酶(毒1),包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶及金属蛋白酶等。
- complete™片可应用于差不多所有的组织或细胞抽提物,包括来自动物、植物、酵母、细菌和真菌的样品。
- 有两种大小的片剂供您选择,以便配合您的缓冲液容量。
- 您不用作多次的小量称量。

可靠:

- 提供一致的蛋白酶抑制。
- 所有成份稳定和无毒,能提供安全和可靠的保护,如采用不含EDTA的complete™,更不会影响到依赖金属的蛋白的活性,并可让您有效进行一些纯化工作(如应用Poly-His标记的蛋白)。



图1: complete™蛋白酶抑制剂混合片,令您不用再花时间去寻找合适的蛋白酶抑制剂。这些溶解迅速的片剂方便和可靠,免除了称量个别抑制剂的麻烦。