

利用LightCycler进行siRNA沉默效率的定量分析

介绍

自从RNA干扰作为一个对外源基因入侵的保护性机理的首次报道发表以来，RNA干扰已经成为分析哺乳动物细胞基因功能的强有力工具。RNAi 以与被抑制的基因同源的短双链RNA作为干扰的媒介。这些siRNAs 均为21-mer 的双链RNA，其中有19个碱基互补，3'端各有2个寡核苷酸突出。siRNA可介导哺乳动物细胞内序列特异性的mRNA降解[1]。

对于如何获得siRNA用于转染细胞，方法多样，可使用化学合成或者体外转录的方法，也有使用载体在细胞内生成siRNA。siRNA不同生成方法的选择以及siRNA 的序列对最终成功的基因敲除实验是至关重要的。并非所有的siRNA序列抑制基因表达的效率是相同的。最有效的siRNA可降低mRNA>90%的表达量，而其他的可能抑制效果不明显甚至没有效果。因而，针对一个目的基因需要验证3到4个siRNAs以找到最适合的siRNA，或者通过DICER酶消化体外转录的RNA生成siRNA混合物。为了确保观察到的蛋白质水平的沉默效应

是由于使用 siRNA而特异性产生的，因此目的基因mRNA水平的检测也需同步进行。另外，在没有特异的基因产物的抗体的情况下，也需检测基因的mRNA水平。对于那些半衰期长的蛋白而言，能更方便地在mRNA水平评估siRNA的效率，因为其knockdown效率更高。

我们采用LightCycler系统来定量检测稳定转染GFP基因的细胞经GFP基因knockdown处理后GFP mRNA相对于看家基因mRNA的表达水平。我们成功地检测了GFP特异的siRNA的特异性和沉默效应。

材料和方法

细胞培养

稳定转染GFP基因的人粘附细胞系PC3，以含10% (v/v) 小牛血清、2mM谷氨酰胺及750 μg/ml 新霉素的 RPMI1640 培养。siRNA 转染前2天，按 5×10^4 细胞/孔铺24孔板。siRNA(Dharmacon)与稀释的转染试剂混合后加至以无血清培养基(Opti-MEM)培养的细胞中，终浓度为100nM。转染后4小时，加入终浓度为10% (v/v) 的胎牛血清。

GFP蛋白检测

取100 μl裂解液以RF-5301分光光度仪检测GFP蛋白浓度（波长：激发光：395nm；检测光：508nm）。

mRNA分离纯化

分离mRNA使用MagNA Pure LC仪器，试剂为MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I，操作按照试剂盒说明书中培养细胞来源mRNA的提取步骤及MagNA Pure的“mRNA I cell”操作程序进行。洗脱液体积为50 μl。

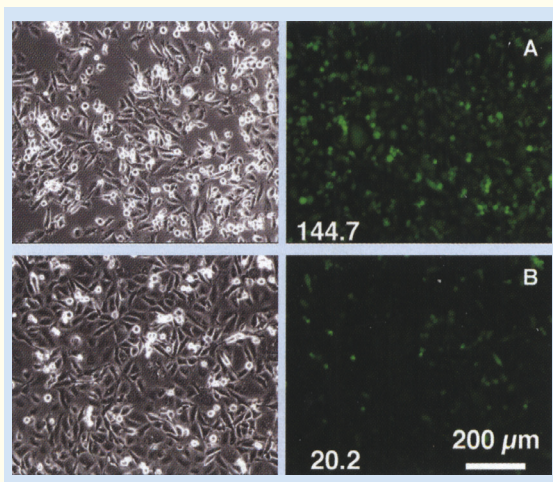


图1 A,B: GFP siRNA抑制GFP表达。图示为人PC3-GFP细胞在不转染 (A) 及转染 (B) GFP特异siRNA后72小时稳定表达GFP的免疫荧光图 (Zeiss, Axiophot)。白色部分为每个视野的总荧光数。

cDNA合成

采用1st Strand cDNA Synthesis Kit, 根据试剂盒说明使用随机引物法合成。每个样品5 μ l mRNA转录成cDNA。cDNA用PCR级的水按十倍比稀释后用LightCycler进行定量检测。

荧光实时PCR定量检测

采用LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I和LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes试剂盒扩增GFP基因和看家基因。实验条件如下: 引物各0.5 μ M, 杂交探针0.2 μ M, MgCl₂ 4mM。GFP特异性引物和杂交探针使用LightCycler探针设计软件(LPDS1.0)设计。PCR采用以下扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性10min; 95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 10s、72 $^{\circ}$ C 15s, 共45个循环(变温速度为每秒20 $^{\circ}$ C)。

人细胞系PC3-GFP稳定表达GFP并显示出非常强的荧光信号(图1A),转染化学合成的GFP特异性siRNA(GFP siRNA) 72小时后, 荧光信号显著减弱(图1B)。

结果

在蛋白质水平对GFP蛋白的knockdown效应进行检测。结果显示转染GFP-siRNA的PC3-GFP细胞的GFP蛋白表达水平下降了53%(ng GFP/ μ g总蛋白)(图2), 而采用荧光素酶siRNA转染的PC3-GFP细胞, GFP蛋白质的表达水平没有变化, 即没有knockdown效应。

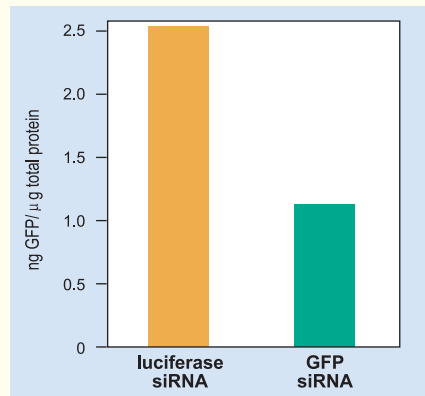


图2: 在蛋白水平对GFP的检测。PC3-GFP细胞转染luciferase siRNA及GFP siRNA 72小时后胞内GFP蛋白与总蛋白的比例。

LightCycler系统非常适合用于目的基因mRNA相对于看家基因mRNA表达水平的相对定量研究, 为了判别使用的GFP siRNA对mRNA的特异性, 使用LightCycler进行实时荧光定量检测。

第一个实验研究了PC3-GFP细胞中不同看家基因的表达水平, 并选择最适合的看家基因作为参考基因。GFP基因的扩增和检测用LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, 与此同时, 看家基因的检测和扩增使用LightCycler h-Housekeeping Gene Selection Set和LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes kit。以看家基因的数据来校准GFP的结果。在比较的五个看家基因(β 2M, G6PDH, ALAS, HPRT和PBGD)中, β 2M(β 2球蛋白)与GFP的表达水平最接近, 因而被选为实验第二阶段的参考基因进行相对定量(图3a)。不管以何种看家基因作为相对定量参照物, GFP mRNA的下调范围都是一致的。与没有表达下调效应的荧光素酶siRNA比较, GFP siRNA的负调控达到了81%-89%(图3a, b)。

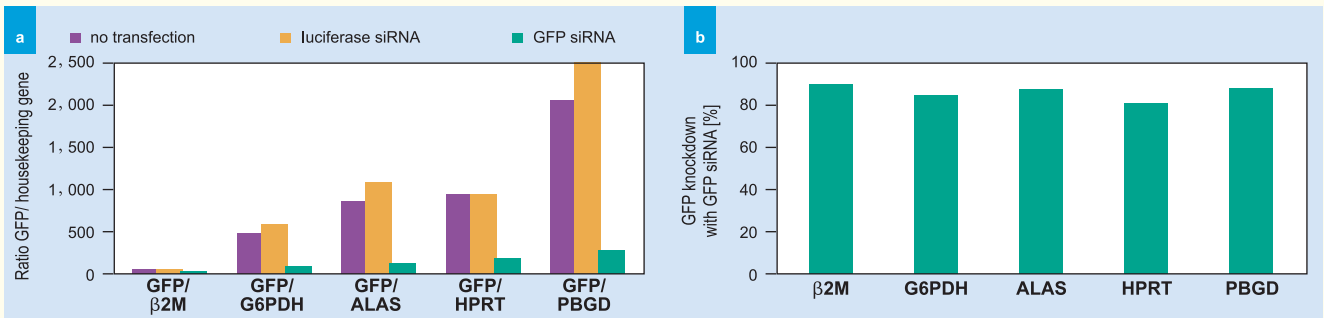


图3: (a) 在mRNA水平对GFP的检测。采用luciferase siRNA及GFP siRNA转染PC3-GFP细胞72小时后胞内GFP与看家基因的比例。

(b) GFP siRNA或luciferase siRNA转染PC3-GFP细胞72小时后, 以不同看家基因校准的两者对GFP沉默效率的比例。

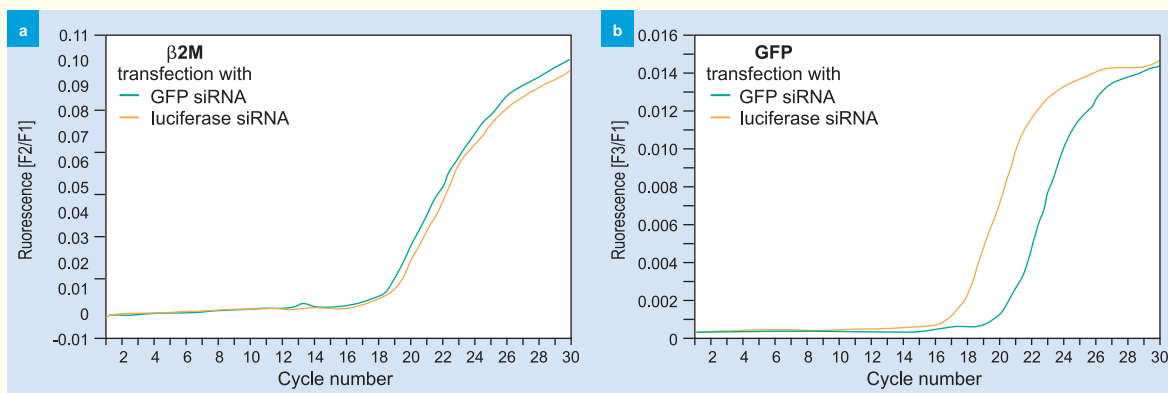


图4: (a)GFP siRNA或luciferase siRNA 转染PC3-GFP细胞72小时后看家基因 β 2M 的cDNA扩增情况。使用 β 2M特异的引物和杂交探针 (LightCycler Red640)。(b) GFP siRNA或luciferase siRNA转染PC3-GFP细胞72小时后GFP cDNA扩增情况, 使用GFP特异的引物和杂交探针 (LightCycler Red705)。

在第二个实验中, 我们用杂交探针来检测GFP knockdown效应。用看家基因 β 2M的数据来校准最终定量的结果。与转染荧光素酶siRNA的PC3-GFP细胞相比, 转染GFP-siRNA的PC3-GFP细胞的GFP-cDNA检测结果表明GFP-mRNA明显下降。相反, 作为对照的看家基因 β 2M的表达水平在两组细胞中几乎一致(图4a)。

结论

为了证实siRNA引起的knockdown效应的特异性, 在蛋白质水平检测这种负调控作用的同时, 也需要在mRNA水平进行检测, 特别对于那些像

GFP那样稳定表达的蛋白, 在蛋白水平观察是否存在高的knockdown效应是非常困难的。通过LightCycler系统, 实验表明GFP siRNA能够有效抑制85%的GFP mRNA表达, 而蛋白质水平检测到的抑制作用仅为53%。在检测GFP mRNA时, 我们使用SYBR Green I或杂交探针, 两者得出的结果几乎一致。

LightCycler系统提供了一个快速简便的方法来验证使用的siRNA是否能够特异性地knockdown目标mRNA。

Reference 参考文献

1. Elbashir SM et al.(2001), Nature 411:494-498

产品信息

品名	包装	目录号
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	30个反应	1 1483188 001
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	96个反应 480个反应	0 3003230 001 1 2239264 001
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	96个反应 480个反应	0 3003248 001 1 2239272 001
LightCycler h-Housekeeping Gene Selection Set	96个反应	0 3310159 001
LightCycler h-Beta2M Housekeeping Gene Set	96个反应	0 3146081 001
MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit I	192个反应	0 3004015 001
相关产品		
LightCycler FastStart DNA Masterplus SYBR Green I	96个反应 480个反应	0 3515869 001 0 3515885 001
LightCycler FastStart DNA Masterplus Hybridization Probe	96个反应 480个反应	0 3515575 001 0 3515567 001
High Pure RNA Isolation Kit	50个反应	1 1828665 001

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