

人类胆碱激酶(ChoK)表达沉默研究： 使用Transcriptor First Strand Synthesis Kit和 LightCycler系统

介绍

RNA干扰已经成为研究目的基因表达沉默的一种强有力工具。目的细胞siRNA的直接转染是一种比较快速的能够产生短暂基因沉默和追踪转染后几天产生的表型变异的方法。

我们应用RNA干扰来knockdown人类胆碱激酶(ChoK)的表达水平。这种酶已经作为用于抗肿瘤药物治疗的靶位。通过RNA干扰使ChoK基因沉默从而建立一个模型来研究体内酶活力下降的后续事件。

材料和方法

细胞培养和转染

细胞选用人类乳腺癌细胞系MDA-MB-231。培养基为RPMI1640, 含10% (v/v) 小牛血清, 2mM谷氨酰胺。在转染前一天, 细胞按 1×10^4 /孔的密度铺24孔板。针对ChoK mRNA设计的两个不同siRNA (siRNA序列1:AAGCCGAGAGAAUUCUGAAA; siRNA序列2:TACUCCAU-CUCCAGUUGUAUU Dharmacon) 和一个针对果蝇荧光素酶靶位的质控siRNA (序列GL3; QIAGEN) (luciferase siRNA), 以Opti-MEM培养基稀释后转染细胞, 终浓度为100nM。转染在含有10% (v/v) 小牛血清的培养基中进行, 所有实验均设复孔。

RNA分离和cDNA合成

转染后72小时, 使用带有DNase消化的High Pure RNA Isolation kit提取总RNA。相同量的总RNA通过带有oligo(dT)₁₈引物的Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。

RT-PCR定量分析

在cDNA合成后由LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes试剂盒进行实时PCR进行样品分析。在扩增和检测ChoK cDNA过程中, 使用了系列特异性的引物和相应的杂交探针 (正义引物: 5'-AGAGGCGGCCTTAGCAACA-3', 反义引物: 5'-GCACTTCCGAGGCTCATCA-3'; 杂交探针为: 5'-CATGCTGTTCCAGTGCTCCC TACC-fluorescein-3'和5'-LC Red705-GACACCAC AGCCACCCTTGGT-3')。为了同时定量检测看家基因ALAS(5-aminolerulinate synthase), 在反应混合物中使用了LightCycler-h-ALAS housekeeping Gene Set。不同荧光通道之间的交叉使用颜色补偿文件进行校正。PCR扩增采用了以下的条件: 95°C 预变性10min, 95°C 10s, 58°C 10s, 72°C 5s, 共40个循环(变温速度为每秒20°C)。使用LightCycler相对定量软件以看家基因ALAS的表达水平校准ChoK cDNA的表达水平。

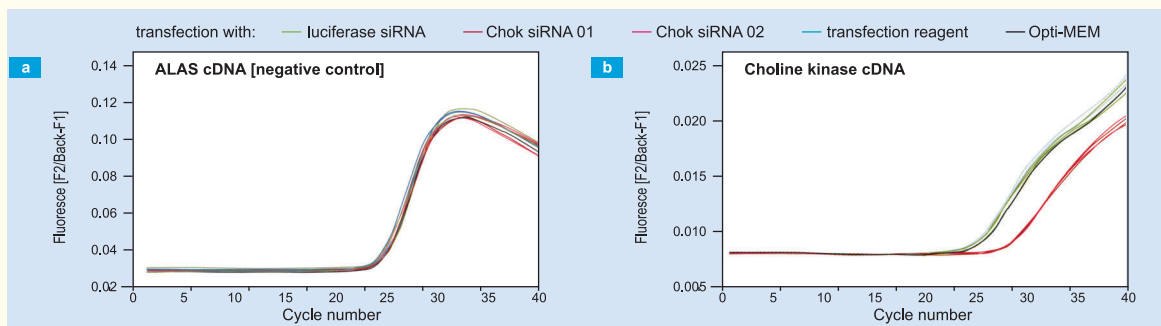


图1: 样本经Chok siRNA(包括Chok siRNA 01和Chok siRNA 02)转染、对照luciferase siRNA转染、模拟转染(仅以转染试剂处理)或不转染(仅加Opti-MEM)分别处理后, ALAS cDNA和Chok cDNA在LightCycler系统上的扩增情况。使用ALAS特异引物及LC Red640标记的杂交探针, ChoK特异引物及LC Red705标记的杂交探针。每个转染均设两个复孔。

结果及应用

我们对人乳腺癌细胞MDA-MB-231转染了两个不同的针对ChoK mRNA中间序列的siRNA。实验同时使用了对所有已知人类基因无同源性的果蝇荧光素酶的siRNA作为阴性对照。

提取完的样品和阴性质控的mRNA相对于看家基因ALAS的表达水平采用两步PCR的方法进行定量检测：样品采用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行反转录，然后使用LightCycler荧光定量PCR系统采用杂交探针模式进行分析。

看家基因ALAS的检测使用LightCycler h-ALAS housekeeping Gene Set，其中杂交探针用LC Red640染料进行标记，而ChoK cDNA的检测探针使用LC Red705染料进行标记。不同染料的发射光可以利用LightCycler荧光定量PCR系统的不同荧光检测通道进行检测（双光检测）。因而ChoK cDNA和看家基因ALAS可以同时在一个毛细管的反应体系内进行扩增和检测。这一方法能够消除加样误差，从而使相对定量更加精确。在一个毛细管反应体系内同时进行靶序列和看家基因的两重PCR，得到的结果与两者分别在一个毛细管中扩增和检测的结果差异不显著（数据未提供）。

所有样本的ALAS表达水平非常接近，因而也验证其在我们的转染实验中作为对照看家基因的有效性（图1a）。

与对照相比（luciferase siRNA的均值，模拟处理及不处理），针对ChoK的两种siRNAs使得Chok mRNA减少13%，而单独luciferase siRNA或转染试剂对ChoK mRNA的表达没有任何影响（图1b和2）。

所有实验结果表明MDA-MB-231细胞的转染非常有效，针对Chok的两种siRNA都是有效和特异的。

结论

在RNA干扰实验中，在蛋白质水平和表型变异分析之前，对目的基因在mRNA水平的定量沉默检测是非常必要的。这是直接检测siRNA作用的唯一方法，以确保观察到的下游的变化并不是双链RNA或者转染试剂的非特异作用。此外，对于判别siRNA序列对基因沉默的有效性，优化反应条件例如细胞密度、转染试剂选择和siRNA的浓度、目的基因mRNA的相对定量是非常有用的。

使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit和LightCycler荧光PCR系统，我们建立了一个有效快速的方法来研究针对目的基因的siRNA的沉默效率。我们能够检测到相对于对照样品，MDA-MB-231细胞转染两种特异的siRNA后Chok mRNA下降接近87%。同时最为对照的luciferase siRNA或转染试剂都无法影响ChoK mRNA的表达水平。

Reference 参考文献

1. Dykxhoorn DM et al.(2003),Nature Reviews 4: 457-467
2. Lacal JC (2001) ,IDrugs 4 (4) : 419-426
3. Elbashir SM et al.(2001),Nature 411:494-498

品名	包装	目录号
High Pure RNA Isolation Kit	50个纯化	1 1828665 001
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	50个反应	0 4379012 001 New!
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	5 × 16个反应	0 3310159 001
LightCycler h-ALAS Housekeeping GeneSet	96个反应	0 3302504 001

更多LightCycler信息，请登录www.roche-applied-science.com/LightCycler-online