

UPL 探针进行实时 RT-PCR 的新突破：

用于 RNA 干扰技术研究信号通路

Michael Steckel, Michael Boutros

Boveri-Group 信号及功能基因组, 德国癌症研究中心, 海德堡, 德国

联系作者: m.boutros@dkfz-heidelberg.de

简介

在基因组的水平上定义某个基因的功能就需要借助一种快速有效的基因表达水平研究工具。RNA 干扰技术 (RNAi) 作为功能基因组研究中的一项重大进步, 通过介导同源小分子双链 RNA 引发体内特异性靶基因的沉默^[1]。目前 RNAi 技术已经成功的运用在无脊椎动物和哺乳动物培养细胞的基因表达沉默研究中, 使得基因功能缺失的研究成为可能。在某些与生理和疾病相关的通路基因被敲除后可能带来的表型上的变化研究中, RNAi 已经成为一种广泛使用的方法。严格的质控过程对 RNAi 实验至关重要, 因此需要满足以下几点要求:

1. 在有不同基因检测需要的情况下, 可轻松灵活实现对不同基因的检测;
2. 基因表达检测的精确性;
3. 可平行衡量检测多个基因的表达水平。

RT-PCR 已经成为在绝对或相对定量水平研究基因表达的通用技术。目前已经发展了几种用以测定扩增产物产量和确定起始模板浓度的方法。这些技术包括利用可插入 dsDNA 的 SYBR Green I 染料, 可以很好地估计出扩增子的产量, 但同时也会非特异性的结合引物二聚体和非特异性片段; 因此需要严格的引物和扩增条件的优化。第二种技术采用荧光标记的探针与目的基因中特定序列结合, 可以很好的避免扩增负产物带来的影响。水解探针两端分别标有一个荧光基团和淬灭基团, 在探针没有与特定基因序列结合的时候, 由于淬灭基团的存在检测不到荧光信号; 当探针结合到 PCR 产物上后, 在 Taq 聚合酶 5' -3' 端外切酶活性的作用下, 荧光基团被释放, 从而检测到荧光信号。

灵活的 RT-PCR 检测和实验优化过程仍然是主要的技术问题。对于大规模的 RT-PCR 检测试验, 最理想的方式是能够将 SYBR Green I 的简便与水解探针的特异性相结合。本文中我们以果蝇的信号转换系统为研究模型, 利用果蝇 Universal Library 通用探针检测目的基因

表达的 mRNA 量, 利用 UPL 通用探针库设计的检测有效的帮助我们预测通路结构的拓扑模型。

实验方法:

Universal Probe Library probes

果蝇 UPL 包括了 90 个探针, 每个探针由 8 - 9 核苷酸组成, 比通常使用的水解探针 (20 - 25nt) 要短。采用高亲合核苷酸类似物 LNA (铆钉核苷酸) 专利技术, UPL 探针具有和常用探针相似的熔点温度可应用在标准的定量 PCR 反应中。借助片段长度的优势, 每一个 UPL 探针可以检测转录元中的多个序列; 90 个探针足以覆盖所有的基因组转录元。探针的选择和对应引物的设计对保证特异性十分必要。在线的设计软件可以用来进行特异性的引物及探针的选择。

细胞培养和 RNAi 实验

果蝇 SL2 细胞培养在含有 10% 牛胎血清 (PAA) 和青氨链霉素 (Invitrogen) 的 Schneider 培养基中 (Invitrogen), 25°C 培养。免疫刺激前 24 小时, 5 百万个细胞被转接种到含有 1.5 ml 无血清培养基的 35 mm 的组织培养盘 (Greiner) 中。在 RNAi 实验中, 在培养基中加入 15 μg 的 dsRNA。1 小时温育后, 加入 2 ml 含血清培养基, 24 小时后将细胞转移到 25 cm² 的组织培养瓶。

为了引起免疫应答, 使用热失活的 *E. coli* 分别诱导 10, 20, 60, 120 和 180 分钟。

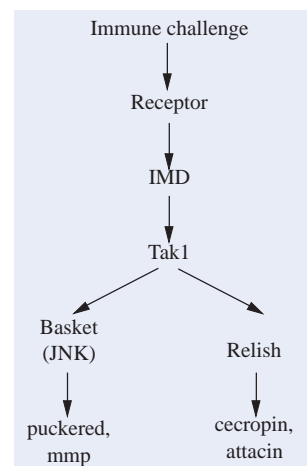


图 1: IMD 途径图。使用革兰氏阴性菌免疫刺激, 激活 IMD 通道, 下游的 Tak1 又分为 Relish 和 JNK 通路, 各自有其特异的靶基因。

转录元	正向引物	反向引物	探针号
ceca2(CG1367)	ggacaatcggaagctggtt	tgtgctgaccaacacgttc	78
puc(CG7850)	gccacatcagaacatcaagc	ccgtttccgtgcatctt	23
rp49(CG7939)	cggatcgatgtaagctgt	gcgcttgctgatccgta	10
imd(CG5576)	ccttcgagaagcagcagtt	tgctttgtgttctttgctc	2
attA(CG10146)	cacaatgtgtgggtcagg	ggcaccatgacagcatt	65
mtk(CG8175)	ccaccgagctaagatgcaa	tctccagcactgatgtgac	90

表 1:引物序列

RNA 合成

利用含有 T7 启动子序列的基因特异性引物从基因组 DNA 中扩增 dsRNA。随后，扩增产物在体外转录系统中转录产生 dsRNA，并经电泳纯化和定量。用以扩增 PCR 模板合成 dsRNA 沉默 imd 基因的引物序列如下：

正向引物

5' -taatacagctactataggatgctcaagctcaggaacct-3'；

反向引物

5' -taatacagctactataggatgctgaccgttttgcgcg-3'。

引物对应的基因序列可参照 <http://rna1.dkfz.de>。

反转录

采用标准的方法从细胞中提取总 RNA；4μg 的总 RNA 用 DNase I 处理 30 分钟后进行反转录。

定量实时 PCR

20μl 的 RT-PCR 反应体系，参照标准的操作手册，加入 2μl 1:10 稀释的 cDNA，LightCycler® FastStar DNA Master HybProbe 和 Drosophila Universal ProbeLibrary (引物信息参照表 1)，在 LightCycler® 2.0 荧光定量 PCR 仪上运行反应；利用核糖体蛋白 Rp49 做校正。

结果

目前已经在不同的物种中开展了对控制先天免疫应答信号通路的研究，以了解主导反应应答的主要机制。近来的研究表明，人类控制免疫应答的分子机制与模式动物例如果蝇中的相应部分高度保守 [3]。基因学的研究检测到了两个不同的 NFκB 依赖通道称为 Toll 和 IMD/

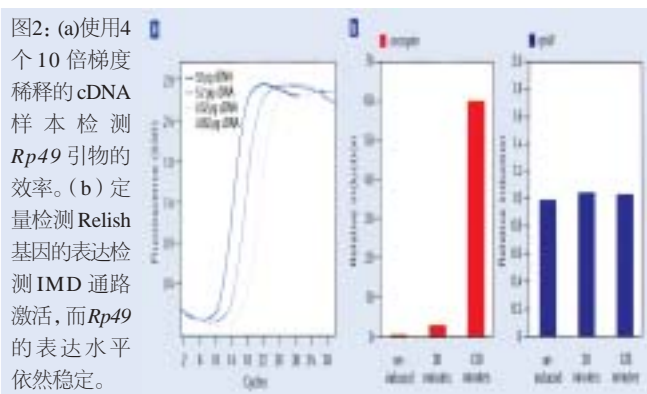


图2: (a)使用4个10倍梯度稀释的cDNA样本检测Rp49引物的效率。(b)定量检测Relish基因的表达检测IMD通路激活，而Rp49的表达水平依然稳定。

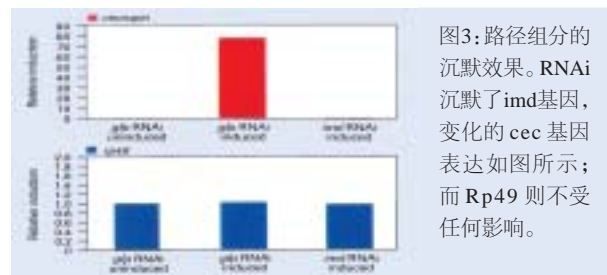


图3:路径组分的沉默效果。RNAi沉默了imd基因，变化的cec基因表达如图所示；而Rp49则不受任何影响。



图4: RNAi有效降低了imd基因的转录水平。

Rel。这两个通道控制了具有抗菌活性小分子分泌型多肽的合成 [4]。

我们在 LightCycler® 2.0 上曾经使用 SYBR Green I 通过 RT-PCR 方法检测目的基因的表达量以检测信号通路的变化。每个 NFκB 通道都可以激活特定一组基因的表达。通过对这些目的基因表达的差异可以很好的监控通道的活性。一旦识别了革兰氏阴性细菌的表面结构，IMD 通道就会被激活。通路控制抗菌多肽的表达，例如 Cecropin (Cec), Attacin (Att) 和 Metchnikowin (Mtk)。激酶 Tak1 作为 IMD 通路的组分，同时也激活 JNK 通路和后继特异性基因的表达，例如 Puckered (puc) 和 matrix metalloprotease (mmp)。

我们首先设计了可以检测一系列基因的 RT-PCR 检测方案，检测基因包括 Mtk, AttA, CecA2 和 Puc。ProbeFinder 软件可用来设计确定引物和探针序列。首先，我们通过梯度稀释的模板 cDNA 检测引物效率以测试检测方法的有效性。如图 2a，rp49 引物在模板浓度为 0.052pg 到 52pg 的范围内的引物效率都达到了 2.0。所有其他 RT-PCR 设计引物都具有类似的结果，均达到了 1.9-2.0 的期望效率。

通过革兰氏阴性细菌的不同时间的免疫刺激分析通路的介导作用。热失活的大肠杆菌悬浮液被加入到果蝇细胞 SL2 的培养液中分别反应 30, 60, 120 和 180 分钟。随后通过 RT-PCR 就可以检测目的基因的表达。免疫刺激 10 分钟后通路的介导作用就开始了，表现在 Cec 被 2 倍诱导，Puc 则达到了 10 倍。Cec 表达量上升的时候，Puc 却会保持稳定：30 分钟后 Cec 转录子增加了 3 倍，120 分钟后诱导到了 60 倍，180 分钟后就没有进一步的增长了。正如我们所预期的，rp49 作为正常功能的基因，在诱导期间在表达量的方面并没有任何变化。试验表明 Universal ProbeLibrary 在基因表达检测方面可以取得与以往使用的检测方法同样准确的结果而不需要特别的 PCR 优化。

接下来，我们确认了是否 RNAi 技术引起的基因敲除