如何检测 RNA 干扰效率

一般应该从 mRNA 水平、蛋白质水平、细胞表型水平三个层次来检测干扰效率。mRNA 水平可使用 RT-PCR 或 Real-time PCR 法检测，蛋白质水平可使用 Western-blot、ELISA 或免疫组化法完成检测，细胞表型水平可应用 MTT、克隆形成实验、流式细胞检测、细胞小室实验等方法检测。

RNA 干扰效率在动物模型上的进一步验证（体内），动物模型实验可以采取“体内法”和“体外法”。体内法，即先做裸鼠成瘤模型，再将质粒或病毒导入裸鼠，检测 RNA 干扰效果。此法操作复杂，对质粒和病毒产品的质和量要求都较高，但是比较贴近实际，说服力较显著。体外法，即先将质粒或病毒导入肿瘤细胞，再将肿瘤细胞导入动物体内，然后检测 RNA 干扰效果。此法操作较简单，对质粒和病毒产品的质量要求较低，所以为大多数文献所采用。建议采用此方法来进行动物模型水平的实验。

下面以 qPCR 法为例，简述 RNA 干扰效率检测步骤。

靶细胞病毒感染

1） 胰酶消化处理对数生长期的靶细胞，制成细胞悬液；
2） 将细胞悬液接种于培养基中，37 ℃和 5 % CO_2 下培养，至细胞汇合度达到 10-20 %；
3） 根据预实验的 MOI 值，加入病毒；
4） 12 hrs 后观察细胞状态；如有明显细胞毒性作用，立即进行换液操作；如无明显细胞毒性作用，继续培养 24 hrs 后进行换液；
5） 感染后 3 天，观察荧光；若感染效率低于 50 %，则重新进行感染实验；若感染效率大于 50 %，则继续培养，5 天后收集细胞提取 RNA 用于 RT-PCR 检测。

RT-PCR

抽提总 RNA

根据总 RNA 抽提试剂盒操作说明完成。

1） 10000 rpm 离心 5 min，弃上清；向沉淀中加入 1 mL 的 Trizol，迅速吹打后室温静置 5 min，转移至新的 eppendorf 管中；
2） 每管加入 200 L 氯仿，用手上下颠倒 eppendorf 管 15 s，室温静置 10min；
3） 4 ℃下 12000 rpm 离心 15 min；吸取上清移至新的 1.5 mL 的 eppendorf 管，加入等体积预冷的异丙醇，混匀后 4 ℃沉淀 10 min；
4） 4 ℃下 12000 rpm 离心 5 min，弃大部分上清；再次离心，吸去上清，室温干燥；
5） 待 RNA 基本透明，加入 20 μL 的 RNase-free 水，至完全溶解，测定 RNA 浓度。

RNA 逆转录获取 cDNA

根据通用反转录试剂盒（M-MLV）操作说明书完成。

1） 将 1 μL 的 Oligo dT（0.5 μg/μL）和 2.0 μg 的 Total RNA 加入 PCR 管中，补充 DEPC-H_2O 至 9 μL；混匀后离心，70 ℃水浴 10 min；立即转至 0 ℃冰水混合物中冰浴；

2） 按照设置好的体系配制反应体系（可参见下表 1），混匀后离心 10 sec；

表 1 cDNA 反应体系

试剂	加入量
5×RT buffer	4 μL
10 mM dNTPs	2 μL
RNase	0.5 μL
M-MLV-RTase	1 μL
DEPC H_2O	3.5 μL
Total	**11 μL**

3） 将上述反应体系置于 42 ℃下反应 1 hrs，其后再 70 ℃下水浴 10 min；

4） 得到的 RT 产物（cDNA）置于-80 ℃保存待用。

RT-PCR

按照设置好的体系配制反应体系（可参见下表 2），混匀后离心 10 sec；

表 2 RT-PCR 反应体系

试剂	加入量
SYBR premix ex taq	10.0 μL
Forward Primer	0.5 μL
Reverse Primer	0.5 μL
cDNA	1.0 μL
ddH_2O	8.0 μL
Total	**20 μL**

根据 PCR 反应体系配制反应液，设定程序为两步法 Real-Time 定量。PCR 结束后制作溶解曲线，其后读取吸光值。具体反应时间和步骤可参见下表 3。

表 3 PCR 反应体系

Segment 1	（1x）	
Step 1	95 ℃	15 s
Segment 2	（45x）	
Step 1	95 ℃	5 s
Step 2	60 ℃	30 s
Data collection and real-time analysis enabled		
Segment 3	（1x）	
Step 1	95 ℃	60 s

Step 2	55 ℃	5 s
Step 3	55-95 ℃（+0.5 ℃/step）	4 s

结果计算

Real-Time PCR 数值分析采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 分析法。