

RNA 干扰技术研究策略

RNAi 技术应用的关键点

生物技术层面上 RNAi 技术必须有适当的方式将外源性的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 导入到目标生物体内, siRNA 一般为 19~21 个核苷酸大小, 在生物体内经过一系列生化路径, 引发 RNA 干扰效果。

siRNA 的来源

1) 试管内合成

以人工方式合成所需的 siRNA 片段, 再用 PCR 的方式放大产量, 最后导入目标细胞当中, 此方法取决于细胞的转染效率, 并且由于 siRNA 的数量无法稳定地持续存在, 无法实现长期的 RNA 干扰效果。

其中化学合成最适用于已经找到最有效的 siRNA 的情况下, 需要大量 siRNA 进行研究; 不适用于筛选 siRNA 等长时间的研究。

体外转录以 DNA Oligo 为模版, 通过体外转录合成 siRNAs; 最适用于筛选 siRNAs, 特别是需要制备多种 siRNAs, 化学合成的价格成为障碍时; 不适用于实验需要大量、一个特定的 siRNA 和长期研究。

用 RNase III 消化长片断双链 RNA 制备 siRNA, 选择通常是 200-1000 碱基的靶 mRNA 模版, 用体外转录的方法制备长片断双链 dsRNA, 然后用 RNase III (or Dicer) 在体外消化; 最适用于快速而经济地研究某个基因功能缺失的表型; 不适用于长时间的研究项目, 或者是需要一个特定的 siRNA 进行研究, 特别是基因治疗。

2) 生物体内合成

将所需要的 siRNA 片段用载体导入目标细胞中, 此方法避免了单纯以人工方式在试管中合成 siRNA 的局限性。

设计 siRNA 载体

通常选择用质粒作为将 siRNA 导入细胞的载体, 被导入的载体能在生物体内产生类似于 miRNA 的发夹型 siRNA (shRNA), 为了在生物体内合成 siRNA, 所设计的载体 DNA 应该包含以下几部分:

- 1) 同义链 (sense strand): 与生物体内转录出目标 mRNA 时所需的基因序列相同;
- 2) 反义链 (antisense strand): 与同义链互补配对, 转录此序列则可得到与目标 mRNA 互补的 siRNA;
- 3) 非互补的序列: 使得载体经转录后, 能形成发夹结构;
- 4) 其他基因经限制性酶切割的限制部位 (如: BamH I & Hind III)。

设计 siRNA 序列

除了选择恰当的 siRNA 载体外，设计 siRNA 序列时需要注意以下几点：

1) 设计使得末端含有 5-6 个 A (T)

siRNA 载体是由 RNA 聚合酶 III 转录而表达，RNA 聚合酶 III 可转录哺乳动物体内大部分的小片段 RNA，其特点是：当转录到 5-6 个腺嘌呤核苷酸 A 时会停止转录，故导入的 siRNA 载体经转录后，可得到末端具有 5-6 个尿嘧啶的 siRNA；

2) 选择 2-5 个目标基因的不同部分序列

生物体内的目标 mRNA，可能部分区域被调节蛋白附着，造成 RNAi 不易进行，故要选择转录出目标 mRNA 的不同基因片段，才能使得抑制基因表达的效率提升。

RNAi 目标序列的选取原则

1) 从转录本 (mRNA) 的 AUG 起始密码开始，寻找“AA”二连序列，并记下其 3'端的 19 个碱基序列，作为潜在的 siRNA 靶位点；有研究结果显示 GC 含量在 45%-55%左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效；

2) 将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人，或者小鼠，大鼠等等) 进行比较，排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列；

例如实验 BLAST 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ；

3) 选出合适的目标序列进行合成；通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA，以找到最有效的 siRNA 序列。

阴性对照

一个完整的 siRNA 实验应该有阴性对照，作为阴性对照的 siRNA 应该和选中的 siRNA 序列有相同的组成，但是和 mRNA 没有明显的同源性。通常的做法是将选中的 siRNA 序列打乱，同样要检查结果以保证它和目的靶细胞中其他基因没有同源性。