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）。

企业名称 ：布林凯斯生物技术有限公司
地址 ：中国·武汉经济技术开发区 华中智谷
Tel: +027-8439-6606 | E-mail: j.li@wiat.ac.cn

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。