

## 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 °C 和 5 % CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L 氯仿，用手上下颠倒 eppendorf 管 15 s，室温静置 10min；
- 3) 4 °C 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 °C 沉淀 10 min；
- 4) 4 °C 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  $\mu$ L 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  $\mu\text{L}$  的 Oligo dT (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 和 2.0  $\mu\text{g}$  的 Total RNA 加入 PCR 管中，补充 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  至 9  $\mu\text{L}$ ；混匀后离心，70  $^\circ\text{C}$  水浴 10 min；立即转至 0  $^\circ\text{C}$  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 $\times$ RT buffer	4 $\mu\text{L}$
10 mM dNTPs	2 $\mu\text{L}$
RNase	0.5 $\mu\text{L}$
M-MLV-RTase	1 $\mu\text{L}$
DEPC $\text{H}_2\text{O}$	3.5 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>	<b>11 <math>\mu\text{L}</math></b>

- 3) 将上述反应体系置于 42  $^\circ\text{C}$  下反应 1 hrs，其后再 70  $^\circ\text{C}$  下水浴 10 min；
- 4) 得到的 RT 产物（cDNA）置于 -80  $^\circ\text{C}$  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 $\mu\text{L}$
Forward Primer	0.5 $\mu\text{L}$
Reverse Primer	0.5 $\mu\text{L}$
cDNA	1.0 $\mu\text{L}$
dd $\text{H}_2\text{O}$	8.0 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

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 $^\circ\text{C}$	15 s
Segment 2	(45x)	
Step 1	95 $^\circ\text{C}$	5 s
Step 2	60 $^\circ\text{C}$	30 s
Data collection and real-time analysis enabled		

---

Segment 3	(1x)	
Step 1	95 °C	60 s
Step 2	55 °C	5 s
Step 3	55-95 °C (+0.5 °C/step)	4 s

---

## 结果计算

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