

RNA 干扰实验

一、磷酸钙转染法

【实验原理】

磷酸钙沉淀法是基于磷酸钙-DNA 复合物的一种将 DNA 导入真核细胞的转染方法。磷酸钙有利于促进外源 DNA 与靶细胞表面的结合。磷酸钙-DNA 复合物粘附到细胞膜并通过胞饮作用进入靶细胞，被转染的 DNA 可以在细胞内进行瞬时表达，也可整合到靶细胞的染色体上从而产生不同基因型和表型的稳定克隆。该方法可广泛用于转染许多不同类型的细胞。

【仪器、材料和试剂】

(一) 仪器、用具

CO₂ 培养箱、10cm 细胞培养平板、巴斯德吸管、微量移液器、15ml 锥形管、烧杯、量筒等。

(二) 材料

呈指数生长的真核细胞 BALB/c 3T3

CsCl 纯化的表达质粒 DNA

(三) 试剂

1. 完全培养液

DMEM 90ml

FCS 10ml

2. 2M CaCl₂, 过滤除菌, -20℃保存备用

3. 2×HEBS (g/500ml)

NaCl 8.0

KCl 0.38

Na₂HPO₄·7H₂O 0.19

HEPES 5.0

葡萄糖 1.0

用 NaOH 调 pH 至 6.95, 过滤除菌后, -20℃保存备用。

【方法与步骤】

1. 在 10cm 的培养板上接种 1×10^6 个 BALB/c 3T3 细胞

第二天进行转染

2. 准备 CaPO₄ 沉淀

2.1 准备两组试管

在 A 管中加入: 15μg 质粒 DNA

69μl 2M CaCl₂

460μl 重蒸水

在 B 管中加入: 550μl 2×HEBS

2.2 用巴斯德吸管将 A 管中的溶液缓慢地逐滴加入在 B 管中, 同时用另一吸管吹打 B 管溶液, 整个过程需缓慢进行, 至少需持续 1~2min。

2.3 室温静置 30min, 出现细小颗粒沉淀。

3. 小心地将沉淀逐滴均匀地加入培养细胞的 10cm 平板中, 轻轻晃动 (此过程需尽快完成)。

4. 在 5%CO₂ 的加湿培养箱中培养细胞 2-6 hr。

5. 除去培养液, 加入 10ml 完全培养液培养细胞 1-6 天 (依具体情况而定)。

6. 收集细胞进行基因活性的检测, 或分散接种到其他培养皿中进行选择培养。

【注意事项】

1. 在整个转染过程中要保持无菌操作。

2. 在实验中使用的各种试剂都必须小心校准，保证质量。
3. 质粒 DNA 需 CsCl 纯化，乙醇沉淀后的 DNA 应保持无菌，在无菌水或 Tris- EDTA 中溶解。
4. 沉淀物的大小和质量对于磷酸钙转染的成功至关重要。在磷酸盐溶液中加入 DNA-CaCl₂ 溶液时需用空气吹打，以确保形成尽可能细小的沉淀物，因为成团的 DNA 不能有效地黏附和进入细胞。

二、电穿孔和电融合技术

[实验原理]

当细胞置于非常高的电场中，细胞膜就变得具有通透性，能让外界分子扩散进细胞内，这一现象称为电穿孔。运用这一技术，许多物质，包括 DNA、RNA、蛋白质、药物、抗体和荧光探针都能载入细胞。作为一种基因转导方法，电穿孔已被广泛用于各种细胞类型，包括细菌、酵母、植物和动物细胞；而且，它还能作为注射方法（称为电注射），把各种外源物质引入活细胞。与其他常用的导入外源物质的方法相比，电穿孔具有很多优点。首先，不必像显微镜那样使用玻璃针，不需要技术培训和昂贵的设备，可以一次对成百万的细胞进行注射。第二，与用化学物质相比，电穿孔几乎没有生物或化学副作用。第三，因为电穿孔是一种物理方法，较少依赖细胞类型，因而应用广泛。实际上，对大多数细胞类型，用电穿孔法基因的转移效率比化学方法高得多。

除了能使细胞膜具有通透性，让外界分子扩散入胞液中以外，高强度的电场脉冲也能引起细胞融合，这一现象叫做电融合。然而，在用电脉冲融合前必须使细胞相互紧密接触，这一电融合方法在原生质融合制取杂交植物，胚胎细胞相互融合制备动物克隆方面非常有用，尤其在制取杂交瘤细胞制备单克隆抗体方面用处很大。几个实验室已证明使用电场电融合效率

比常规的化学融合方法高 10 到 100 倍，最近，贴壁细胞的电融合还被用来研究细胞融合时细胞的骨架成分和细胞器的动力学重排。

[仪器、材料和试剂]

(一) 仪器：

脉冲发生器，样品池：一个盛细胞的容器和两个平行的金属电极，CO₂ 培养箱，离心机，显微镜，微量移液器，镊子，剪刀，三角瓶，吸管，毛细管，离心管等。

(二) 材料：

(三) 试剂：

穿孔介质 (PM)：15mmol/L 磷酸钾 1mmol/L MgCl₂ 250mmol/L 蔗糖 (或甘露醇)
10mmol/L HEPES 调节 pH 至 7.3

融合介质 (FM)：1mmol/L MgCl₂ 280mmol/L 甘露醇 2mmol/L HEPES 调节 pH 至 7.3

[方法与步骤]

一. 悬浮细胞的电穿孔法：

1 电穿孔进行基因转移

电穿孔可用于将多种不同类型的分子载入活细胞中，操作步骤非常相似。以下我们用基因转移作为例子。载入其他的分子可按以下相同步骤进行，只需把外源 DNA 换页所需分子即可。

1.1 使细胞在适宜的培养基中生长，用胰酶处理，收获对数生长中期的细胞，并用腺酶处理。

1.2 在穿孔介质 (PM) 中至少洗一次。洗细胞时，在台式离心机上 1000rpm 离心 3 分钟，使得悬浮细胞沉降。然后，去掉上清液，在新的介质中重新悬浮细胞。

1.3 计数细胞，在 PM 中，浓缩细胞为大约 1 千万细胞/ml。

1.4 将 DNA 加到细胞悬液中，充分混合，使 DNA 均匀分散，用吸管吸一定体积的细胞-DNA 混合液到装有电极的灭菌小样品池中。

1.5 在电穿孔装置上设置输出电压和脉冲宽度（脉冲宽度是指数衰减函数的时间常数，即 $\tau=RC$ ，C 是电容，R 是样品的电阻）。假如设备是 CD 脉冲型发生器，设定电容和并联电阻，以达到合适的 τ 值。

1.6 将小池放进盛样品的池中，启动电穿孔装置，供给所需的电脉冲。

1.7 电处理后，向小池加 1ml 普通培养基，将细胞混合液从小池转移到组织培养容器（培养皿或培养孔）中，再加入一些培养基使最终的培养基体积适量。然后，将样品细胞放回孵育箱中使之在正常条件下生长。

1.8 在测定转移基因的表达量前电穿孔细胞各自培养的时间不同。

2 检测电穿孔效率和细胞存活率

2.1 除用罗丹明偶联葡聚糖（1mg/ml）（分子探针）代替 DNA 外，将罗丹明偶联葡聚糖引入目标细胞的方法如前所述。

2.2 电穿孔后，用培养基洗涤细胞两次，去掉胞外的荧光葡聚糖。

2.3 电穿孔后 30min，向细胞悬液中加 30 μ l 台盼蓝，孵育 2min，然后用培养基洗涤。

2.4 在 1000rpm 下离心 3min，收集细胞，将细胞重悬于 PM 中，终体积 100 μ l。

2.5 将一滴细胞液（30 μ l）置于干净载玻片上，用盖玻片盖好，在显微镜下检测细胞，测定摄取荧光标记葡聚糖的百分数。

2.6 在亮视野镜片下，死细胞可因染成蓝色检测出（摄取了台盼蓝），测定细胞存活的百分数。

2.7 在各种电场设定值下重复实验，画出摄取葡聚糖率和细胞存活率对电穿孔参数的曲线。

这一曲线就将显示对特定细胞类型电穿孔的最优条件。

二. 悬浮生长细胞的电融合

融合悬浮细胞的步骤与电穿孔的很类似，只是在进行高强度的电场脉冲前后，必须用低幅、高频电场使细胞排成一条链。

- 1 用融合介质 (FM) 洗悬浮细胞两次，然后悬于 FM 中。洗涤细胞时，在台式离心机上 1000rpm 下离心 3 分钟，得到细胞沉淀，弃去上清液将细胞悬于新鲜 FM 介质中。
- 2 将悬浮细胞转移到相应的融合室内。假如要使两种不同的细胞彼此融合，转移前要充分混合。
- 3 启动介电电泳场，其振幅通常小于 200V/cm，频率在 2MHz 以内，用显微镜检测细胞是否排成一条链，调节振幅和频率以达到最佳效果。
- 4 让介电电泳场开约 1 分钟后关掉，立即应用融合脉冲，其振幅数量级为 1kV/cm。脉冲宽度小于 1ms。在进行融合脉冲后立即再次启动介电电泳场，常规让其开启约 2 分钟。
- 5 关掉介电电泳场，让细胞在样品池中静置 10 分钟。
- 6 去掉 FM，用普通培养基再次洗涤细胞。
- 7 将细胞转移到培养皿，加入普通培养基，在培养箱一般条件下培养。

[注意事项]

- 1 最优组分依使用的特定细胞种类而有明显的变化。如果努力优化电压和脉冲宽度电穿孔结果仍不令人满意，就应尝试改变穿孔介质。
- 2 影响电穿孔/电融合的另一重要因素与细胞状态有关，为达到最高效率，必须收集对数生长中期的细胞。

1. 纯化 siRNA

在转染前要确认 siRNA 的大小和纯度。为得到高纯度的 siRNA，推荐用玻璃纤维结合，洗

脱或通过 15-20%丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸，小的寡核苷酸，蛋白和盐离子。注意：化学合成的 RNA 通常需要跑胶电泳纯化（即 PAGE 胶纯化）。

2.避免 RNA 酶污染

微量的 RNA 酶将导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNA 酶普遍存在，如皮肤，头发，所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等，此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。

3.健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

通常，健康的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验，推荐用 50 代以下的转染细胞，否则细胞转染效率会随时间明显下降。

4.避免使用抗生素

抗生素会在穿透的细胞中积累毒素。有些细胞和转染试剂在 siRNA 转染时需要无血清的条件。这种情况下，可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验，以得到最佳转染效果。

5.选择合适的转染试剂

针对 siRNA 制备方法以及靶细胞类型的不同，选择好的转染试剂和优化的操作对 siRNA 实验的成功至关重要。

6.通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对大多数细胞，看家基因是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的 siRNA 转入靶细胞（同样适合实验靶 siRNA），转染 48 小时后统计对照蛋白或 mRNA 相对于未转染细胞的降低水平。过多的 siRNA 将导致细胞毒性以至死亡。

7.通过标记 siRNA 来优化实验

荧光标记的 siRNA 能用来分析 siRNA 稳定性和转染效率。标记的 siRNA 还可用作 siRNA

胞内定位及双标记实验（配合标记抗体）来追踪转染过程中导入了 siRNA 的细胞，将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。

RNAi 研究的一般技术路线是：

