

## 遗传学实验中引入科研思维的探索教学

——RNA干扰实验的开展与反馈

皮妍, 乔晓京, 林娟, 黄燕, 吴燕华, 杨继, 乔守怡<sup>(✉)</sup>

复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

**摘要:** RNA干扰技术是现代遗传学常用的研究工具。在本科生遗传学实验教学中引入贴近科研发展趋势的实验, 是激发学生科研兴趣和积极性, 培养科学思维素质的有效途径之一。在不断摸索和改进的基础上, 我们尝试开展了RNA干扰教学实验, 学生的实验结果显示双链小干扰RNA对绿色荧光蛋白的干扰效果非常明显。在对学生的调查反馈显示, 有超过80%的学生对该实验的引入及设计方案表示满意, 并表示在此实验中能获得到贴近前沿的遗传学思想。这些充分说明RNA干扰实验的开展获得了很好的教学效果。

**关键词:** 遗传学实验, 科研思维, RNA干扰, 开展与反馈

## A Teaching Exploration of the Scientific Thinking Introduced in Genetic Experiments: conducting and feedback of the experiment about RNA interference

PI Yan, QIAO Xiao-jing, LIN Juan, HUANG Yan, WU Yan-hua, YANG Ji, QIAO Shou-yi<sup>(✉)</sup>

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

随着科技的飞速发展, 社会对人才素质的要求不断提高。培养学生的创新精神, 提高学生的科研能力, 是每个学科不容忽视的问题。遗传学实验教学不仅实践性很强, 而且是传授知识和训练基本技能、培养科研思维和方法的学科, 在本科生的学习中占有越来越为重要的位置<sup>[1]</sup>。在本科生的教学实验中引入科研思维, 引导他们学会科研思考, 同时在学习以往重复性试验的基础上, 加入一些贴近当前科研发展趋势的实验, 让学生广泛探索, 如此可以逐步锻炼学生的创新能力, 解决问题的能力, 以及独立开展新实验的科研能力。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是1996年康奈尔大学SuGuo博士在研究线虫细胞分裂基因时发现的一个RNA干扰特定基因的现象。RNAi现象的发现, 引起了遗传学家和分子生物学家的极大兴趣, 后来的研究发现RNA干扰现象广泛存在于从植物、真菌、线虫, 到昆虫、鼠类等几乎所有的真核生物中<sup>[2-7]</sup>。因为它在基因功能和相关方面的研究中具有许多传统方法无法比拟的特点和优势, 科学家对RNA干扰现象表现出极大关注。其基本原理是通过一段双链RNA(double strand RNA, dsRNA)导致同源mRNA降解从而使目的基因转录后沉默。其基本过程是: 双链RNA通过细胞膜进入细胞内, 在胞浆内被一种称为Dicer的属于核酸酶RNase III家族中的酶特异识别, 以一种ATP依赖的方式逐步切割成为20~25碱基对的双链小分子干扰RNA(small interference RNA, siRNAs); 然后siRNAs被组装到一种含有核糖核酸酶的蛋白复合体, 即

收稿日期: 2012-02-25; 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 国家基础科学人才培养基金: 复旦大学生物学基地(J0630643)

通讯作者: 乔守怡, E-mail: syqiao@fudan.edu.cn

RNA诱导的基因沉默复合体(RNA-induced silencing complexes, RISCs), 激活该复合物需要一个ATP依赖的将siRNA解链的过程, 正义链被降解而反义链被保留。这时候的RISC成为活化状态, 在反义链小RNA的引导下与靶mRNA结合, 并将mRNA切割降解从而抑制基因的表达<sup>[8-10]</sup>。

RNA干扰技术逐渐成为了开展遗传学研究的常用工具。因此, 在遗传学实验教学中推广RNA干扰实验, 并不断地加以改进和完善, 增强教学效果, 提高教学质量势在必行。这里主要介绍具有生长快, 易培养, 转染效率高等优点的来源于人肾上皮细胞的293细胞株为实验材料开展的RNAi实验教学过程。选用的是实验耗时较短, 容易检测的绿色荧光蛋白基因为靶基因。

## 1 在细胞水平进行RNAi的操作步骤

### 1.1 设计并合成双链小干扰RNA, 小干扰RNA退火并保存于4°C备用

带有绿色荧光蛋白的质粒为: pEGFP-C1。

阳性siRNA序列为:

sense: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCTT-3'

antisense: 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCTT-3'

阴性siRNA序列为:

sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

antisense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

在2.5 nmol的双链siRNA中加入125 μl 1×通用缓冲液, 得到浓度为20 μmol/L的siRNA母液, 工作母液于室温静置10 min后, 90°C保温2 min, 自然冷却至室温后置于4°C过夜备用。一定时间不使用的母液放于-20°C保存, 再次使用工作母液时无需重新退火。融解后分装, 避免反复冻融。

### 1.2 细胞的复苏和培养

将液氮罐中的冻存细胞取出, 迅速置于37°C水浴。等待冻存的细胞全部融化后, 立即用毛细滴管将其从冷冻管吸出, 加入到含10 ml培养基的离心管中离心, 弃培养液, 加入新的培养基重悬细胞并轻轻均匀打散, 最后将细胞悬浮液转移到培养瓶中。如果第二天显微镜下观察细胞生长良好, 形态正常则说明复苏成功, 换新鲜培养液继续培养。

转染前一天将细胞接种至35 mm培养皿中, 接种密度约为 $5 \times 10^5$ 个/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>培养箱中培养。第二天待细胞生长密度达到60%~80%皿底面积时, 可以进行转染试验。

### 1.3 用LipofectAMINE 2000转染siRNA

有多种方法可以将化学合成的双链小RNA输入体外培养的细胞, 其中以脂质体和电穿孔最为常用。脂质体法的原理是在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时, 可以形成微小的(平均大小约100~400 nm)单层脂质体。这些脂质体带正电, 可以靠静电作用结合到DNA的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面, 然后被俘获的DNA被导入培养的细胞。

转染时分为阳性对照组、阴性对照组和实验组。在实验中阳性对照组为只转染质粒pEGFP-C1, 目的是检测正常转染情况下该质粒的表达情况, 以及排除转染试剂毒性效应; 实验组为转染质粒pEGFP-C1及对应的阳性siRNA, 检测siRNA对蛋白表达的抑制作用; 阴性对照组为转染pEGFP-C1及对应的阴性siRNA。这里的阴性对照就是转染一个与目的基因序列同源性极低的无关序列的siRNA进入细胞, 目的是排除序列的非特异性效应。

整体实验设计如下表:

		Opti-MEM	Lipofect-AMINE-2000	pEGFP-C1 (200ng/μl)	阳性 siRNA	阴性 siRNA
阳性对照组	溶液A	250μl		5μl		
	溶液B	250μl	5μl			
实验组	溶液A	250μl		5μl	5μl	
	溶液B	250μl	5μl			
阴性对照组	溶液A	250μl		5μl		5μl
	溶液B	250μl	5μl			

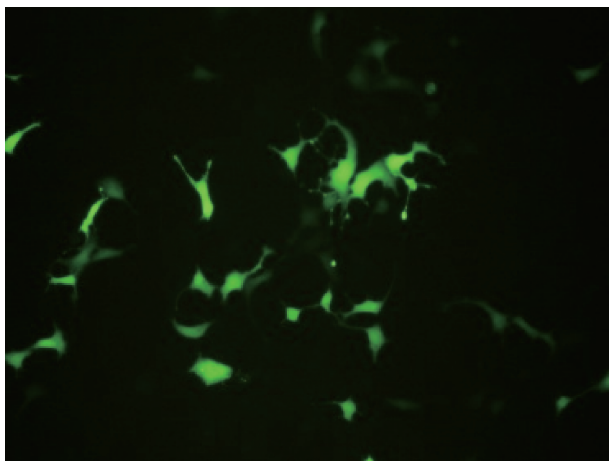
实验组溶液A: 1 μg pEGFP-C1质粒, 5 μl 20 μmol/L的双链siRNA与250 μl Opti-MEM混合。

实验组溶液B: 5 μl LipofectAMINE2000脂质体溶于250 μl Opti-MEM, 在室温下温育5 min。

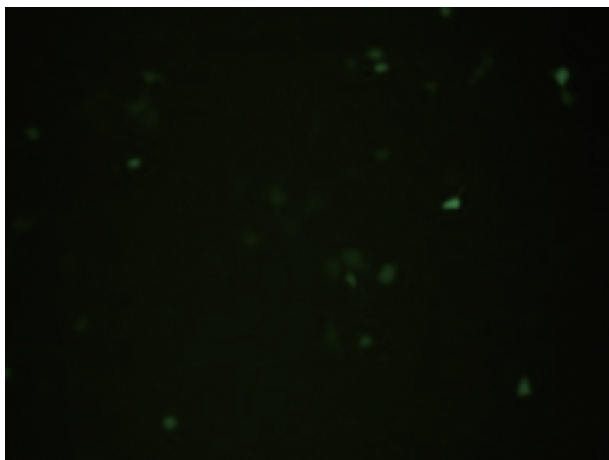
将对照组和实验组的溶液A和B混合, 轻轻地颠倒混匀, 不要振荡, 室温下放置20 min, 以便实验组溶液中形成siRNA/pEGFP-N1与LipofectAMINE2000的转染复合物。将脂质体和siRNA/pEGFP-C1的复合物轻柔地滴加于细胞上。轻柔前后推摇培养板以混匀液体, 然后将培养板送入细胞培养箱。

## 2 实验结果

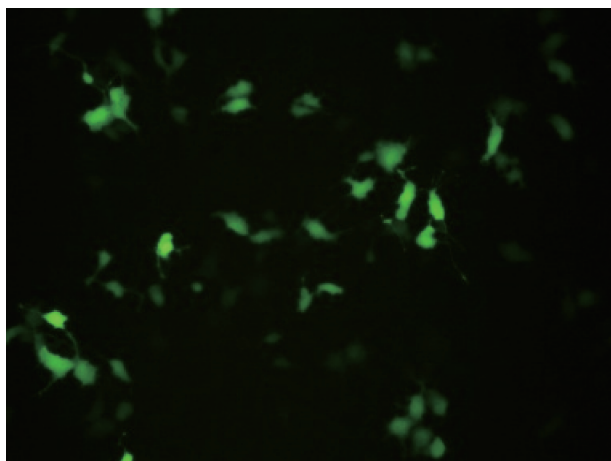
转染24 h后，使用荧光倒置显微镜观察绿荧光蛋白的表达变化情况，学生实验结果如下图：



pEGFP-C1质粒阳性对照组



RNAi实验组



阴性对照组

## 3 实验建议

在整个实验过程中，要避免RNA酶污染，微量的RNA酶都将导致实验的失败。由于实验环境中RNA酶普遍存在，如皮肤、头发等，所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等。在进行RNAi实验时为了严格注意防止RNA酶的污染，操作中要求戴上口罩、帽子和手套，并使用无RNA酶的吸头、离心管等。

健康的细胞和严格的操作确保较高的转染效率。有的293细胞贴壁性能不是很好，加转染复合物时一定要轻柔，避免造成细胞从培养板上脱离。

## 4 学生评价

RNA干扰实验开设后，为了了解其教学效果及学生对该实验的总体反应，便于及时对其中存在的问题进行完善和改进，我们课后进行了摸底调查，学生的总体反馈归纳如下表：

	非常满意	满意	一般	不满意	不知道
对实验开展的满意程度	30.8%	61.5%	3.8%	1.0%	2.9%
对实验设计方案的满意程度	20.2%	62.5%	8.6%	1.0%	7.7%
对实验中能否贴近前沿思想的满意程度	14.4%	58.6%	24.0%	2.9%	0
对实验中收获的满意程度	12.5%	57.7%	27.9%	1.9%	0

从调查反馈来看，学生们对这个实验的开展和设计满意度很高，达到了预期的教学效果。此外，在对遗传学实验课程中开设的11个实验进行整体调查结果显示，有36.5%的学生选择最喜欢RNA干扰实验，19.2%的学生认为在RNA干扰实验中收获最大。大部分学生认为在这个实验中加深了对RNA干扰原理的理解，有较大的收获。

## 5 总结

学生在理论课程中接触的经典遗传学知识比较多，进入实验室开展科研活动时接触到的则是比较前沿的遗传学信息，如果在实验教学中开展的关于现代遗传学实验内容太少，将会降低学生对教学实验的重视程度，也很难激起学生参与实验的积极性和对实验的兴趣。但是，将现代的遗传学实验技术在科研活动中应用，其可操作性比较强，而要使其成为一个稳定的教学实验不只是顺利进行实验操作那么简单，需要

经过不断的摸索和改进, 使之适应教学实验的特点才行。

RNA干扰是一项非常成熟的实验技术, 要在有限的课时内顺利开展这项实验并让学生掌握实验原理和技术, 特别需要注意: ①前期准备工作要做好。培养细胞的好坏, 将直接影响到后面的转染效率。②实验过程中合理安排。参与教学实验的学生较多, 进入细胞操作间和细胞培养室时时间可错开, 分组进行, 尽量避免由于人多造成的空气污染。③做好对照实验。对照实验的设置是为了确保整个实验的设计准确性, 这项实验分为阳性对照和阴性对照, 都非常重要。

在教学过程中, 我们都深深感受到改革对教师对学生带来的冲击。随着教学改革的深入, 我们还会继续努力, 继续完善实验教学工作。将科研与教学实验更好地结合。

## 参考文献

- [1] 李雅, 赵昕, 胡英考, 等. 遗传学实验教学改革的实践与探索 [J]. 实验技术与管理, 2006, 23(4): 99-101.
- [2] Alvarado Sánchez Alvarado, Phillip A. Newmark. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(9): 5049-5054.
- [3] Chiou-Fen Chuang, Elliot M. Meyerowitz. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(8): 4985-4990.
- [4] Jan U. Lobman, Ingrid Endl, Thomas C. G. Bosch. Silencing of developmental genes in *Hydra* [J]. Developmental Biology, 1999, 214(1): 211-214.
- [5] Huân Ngô, Christian Tachudi, Keith Gull, et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei* [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(25): 14687-14692.
- [6] Phillip A. Sharp, Phillip D. Zamore. RNA interference [J]. Science, 2000, 287: 2431-2433.
- [7] Anna Wargelius, Ståle Ellingsem, Anders Fjose. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 1999, 263: 156-161.
- [8] 吴丹, 吴白燕, 梁红业, Nanbert Zhong. RNA干扰技术在医学遗传学中的应用. 北京大学学报(医学版), 2005, 37(1): 106-111.
- [9] 于国龙, 何蕴韶. 遗传学研究的新工具: RNA干扰. 国外医学遗传学分册. 2005, 28(4): 200-203.
- [10] 黄河, 李小玲. RNA干扰研究进展. 实用预防医学. 2006, 13(1): 206-208.

(责编 高新景)