

将定量实验方法引入遗传学实验教学

盛冠, 李鹏程, 郭滨^(✉), 王博文, 乔守怡

复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

摘要: RNA 干扰技术是遗传学研究中常用的技术之一, 同时定量实验已成为现代遗传学研究中重要的分析手段。在本科生遗传学实验教学中引入定量实验, 不仅可以激发学生科研兴趣, 更可以培养学生严谨的科学素养, 为以后学生参与科学研究打好良好的基础。前期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。故我们拟在原先的实验基础上, 将实时定量 PCR 实验引入, 丰富遗传学教学实验的内容。

关键词: 遗传学实验, 定量实验, RNA 干扰, 实时定量 PCR

Introduce A Method of Quantitative Experiment in Genetic Experiments

SHENG Guan, LI Peng-cheng, GUO Bin^(✉), WANG Bo-wen, QIAO Shou-yi

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 20433, China

“以实验为中心安排教学”是近年来美国高校正在开展的一项极有影响力的实验教学改革计划(enhanced biology education programe, 简称 EBE 计划), 其教学重点不在知识的掌握而在能力的培养。遗传学实验作为生命科学本科基础实验教学的重要组成部分, 对培养学生的开拓创新精神和实践能力起着十分重要的作用。因此, 如何在复旦大学开拓探索出一种新的教学方案, 以实验教学为平台, 培养和造就国际生命科学前沿领域有竞争力的一流的高素质人才, 是高等生命科学教育面临的一个重要问题。随着生命科学的迅猛发展, 有必要及时对遗传学实验等生命科学基础课程进行新的建设规划, 随时调整教学理念, 更新教学内容, 补充新鲜的“血液”, 进一步与国际化接轨。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指一种由双链 RNA 诱发的基因沉默现象^[1]。RNA 干扰是存在于真核细胞内的一种自我保护现象, 既能对抗外源基因

的侵害, 又能降解自身异常基因产生的 mRNA。RNA 干扰主要发生在基因转录后, 即 mRNA 的修饰或翻译水平上, 具有特异、高效和持久的特点, 适用于后基因组时代未知功能基因的分析, 也为临床上特异性的基因干预治疗开辟了一条通路^[2]。在秀丽隐杆线虫上实验时还可使子一代产生基因突变, 甚至于可用喂食细菌给线虫的方式让线虫得以产生 RNA 干扰现象。RNA 干扰现象在生物中普遍存在。

RNA 干扰作用是通过一类较稳定的中间介质实现的。对植物的研究证明, 双链 RNA 复合体先降解成为 35 nt 左右的小 RNA 分子, 然后他们通过序列互补与 mRNA 结合, 从而导致 mRNA 降解。对果蝇的研究证明, 长度为 21~23 nt 的小 RNA 分子是引起 RNA 干扰现象的直接原因^[3-6]。这种小 RNA 分子被称之为小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。

传统的 RNAi 实验主要是通过对哺乳动物细胞进行 GFP 荧光质粒转染, 通过荧光显微镜观察绿色荧光的强弱来判断 RNAi 的效果。为了能够定量地说明 siRNA 对 GFP 沉默的效果, 特将科研中经常使用的荧光定量

收稿日期: 2015-05-10; 修回日期: 2015-08-20

基金项目: 复旦大学学生科技创新基金项目

通讯作者: 郭滨, E-mail: binguo@fudan.edu.cn

PCR 引入到教学实验中，以增强学生对于科学研究的严谨性、客观性有更多的认识，并帮助他们建立科学研究的定量思维模式。

1 细胞水平的 RNA 干扰

1.1 实验前准备

设计并合成双链小干扰 RNA。

实验所用质粒为带有绿色荧光蛋白的质粒：pEGFP - C1。

绿色荧光蛋白 pEGFP - C1 阳性 siRNA。其序列为：

sense: 5'—GCAAGCUGACCCUGAAGUUCTT—3' (额外加上两个 T)；

antisense: 5'—GAACUUCAGGGUCAGCUUGCTT—3'

(额外加上两个 T) 其他可互补配对。

non-silencing 序列：阴性 siRNA。其序列为：

sense: 5'—UUCUCCGAACGUGUCACGUTT—3'；

antisense: 5'—ACGUGACACGUUCGGAGAATT—3'。

实验所用细胞为 293 细胞，来自于人肾上皮细胞系，比较容易转染，是一个很常用的表达研究外源基因的细胞株。

1.2 实验与观察

参照 [7] 的方法复苏冻存的 293 细胞及用 LipofectAMINE 2000 转染 siRNA，其中转染分 pEGFP - C1 对照组、GFP22 阳性实验组和阴性小 RNA 对照组。

pEGFP - C1 对照组：只转染质粒 pEGFP - C1，检测正常转染情况下该质粒的表达情况；

GFP22 阳性实验组：转染 pEGFP - C1 以及对应的阳性 siRNA，检测 siRNA 对蛋白质表达的抑制作用；

阴性小 RNA 对照组：转染 pEGFP - C1 以及对应的阴性 siRNA。

次日，观察实验结果并拍照。

2 定量 PCR 实验

2.1 定量 PCR 实验准备

使用 TIANGEN 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取上述 3 组 293 细胞总 RNA，并反转录成 cDNA 保存。

设计 EGFP 引物如下：

EGFP - RT - A: 5' - GTGACCACCCTGACCTAC - 3'；

EGFP - RT - B: 5' - TAGTTGCCGTCGTCCTTG - 3'。

2.2 定量 PCR 实验操作

将上述实验制备的 cDNA 原液进行 10 倍稀释后备用 (1 μ L cDNA 原液 + 9 μ L milliQ H₂O)，配制反应体系，冰上操作。

PCR 反应	10 μ L	$\times 12$
H ₂ O	2 μ L	24 μ L
2 \times SYBR green	5 μ L	60 μ L
Primer EGFP - RT - F (10 μ mol \cdot L ⁻¹)	0.5 μ L	6 μ L
Primer EGFP - RT - R (10 μ mol \cdot L ⁻¹)	0.5 μ L	6 μ L
模板 (cDNA/H ₂ O)	2 μ L	总体系内先不加

充分吹打总体系，离心甩下挂壁液体，分装到定量 PCR 专用的八连管中，8 μ L/孔，共 10 管。向反应管中依次加入 2 μ L 模板：阳性 siRNA 实验组、阴性 siRNA 对照组、未加 siRNA 对照组均做 3 个复孔，另加阴性对照一孔 (以等体积去离子水做模板)，共计 10 孔。盖好管盖。

在记录本上记录好 PCR 管的样品顺序。PCR 管壁及管盖上不得做任何标记。

离心后统一上机。PCR 程序：

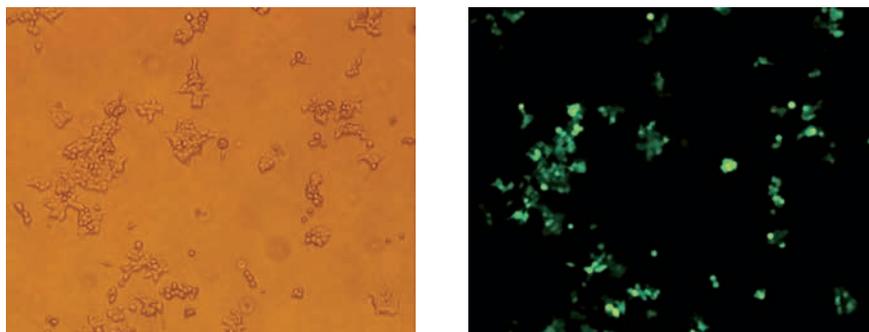
PCR 程序温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	10 s	
95 $^{\circ}$ C	5 s	
60 $^{\circ}$ C	20 s	
72 $^{\circ}$ C	10 s	45 个循环
95 $^{\circ}$ C	60 s	
65 $^{\circ}$ C	60 s	
65 $^{\circ}$ C + 0.5 $^{\circ}$ C/循环	62 个循环	

PCR 结束后，记录和分析实验数据。

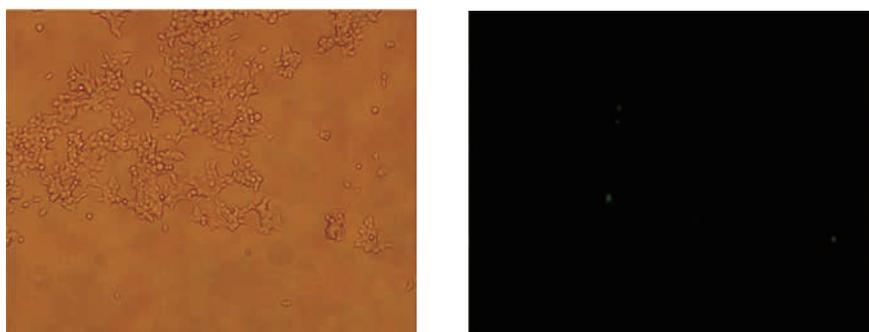
转染 24 h 后，使用荧光倒置显微镜观察绿色荧光蛋白的表达变化情况，学生实验结果如图 1。

实时定量 PCR 实验结果如图 2。

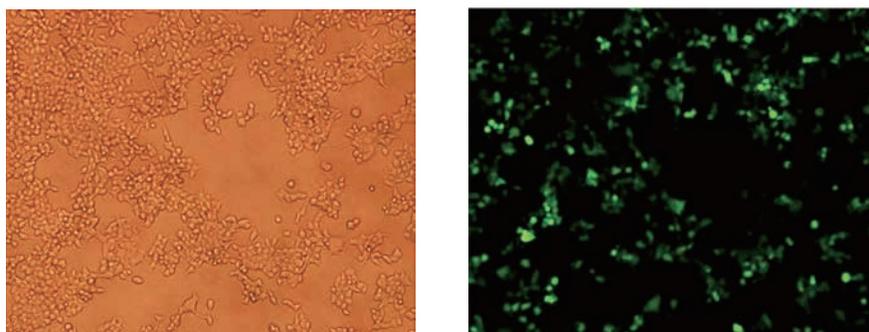
由图 2 可以看出，经过 siRNA 诱导沉默的 GFP 基因的表达量与诱导前的 GFP 基因的表达量差异十分显著，加入了 non-sequence RNA 的对照组与诱导前 GFP 基因的表达量差异不明显，这可以说明该实验中 siRNA 的沉默效果很显著，GFP 基因的表达量的下降是因为对应序列的 siRNA 诱导沉默所致。



A. pEGFP - C1 质粒对照组



B. GFP22 阳性组 (RNAi 实验组)



C. 阴性小 RNA 组

图 1 转染前后绿色荧光蛋白的表达

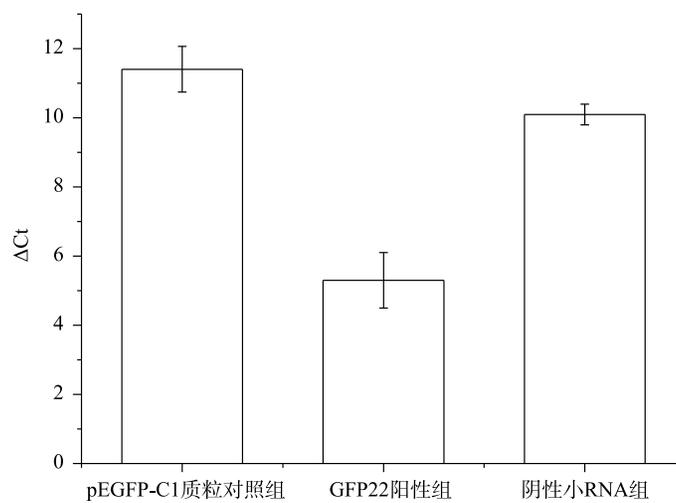


图 2 siRNA 沉默前后各组 GFP 基因表达量的差异

3 总结

通过该实验可培养学生们在实验设计时的严谨性、严密性，养成良好的科学习惯，为未来进入实验室做毕业论文设计或者是做科研都有较好的影响。另一方面，也锻炼了现阶段同学们处理科学实验数据并通过数据进而得出科学结论的能力，通过定量实验培养学生严谨的科学态度的同时，也能让学生对遗传学中RNA干扰的概念不仅有一个定性的了解，更有一个定量的认识。

参考文献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (6669): 806–811.
- [2] 王继文, 郝飞. RNA干扰技术及应用的研究进展 [J]. *国外医学: 分子生物学分册*, 2003, 25 (3): 152–156.
- [3] Baulcombe D C, Voinnet O. Systemic signalling in gene silencing [J]. *Nature*, 1997, 389 (6651): 553.
- [4] Baulcombe D C, Hamilton A J. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 1999, 286 (5441): 950–952.
- [5] Bernstein E, Hammond S M, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature*, 2000, 404 (6775): 293–296.
- [6] Tuschl T, Zamore P D, Sharp P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101 (1): 25–33.
- [7] 皮妍, 乔晓京, 林娟, 等. 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 [J]. *高校生物学教学研究 (电子版)*, 2012, 2 (2): 40–43.

(责编 高新景)