

系统生物学课程报告

RNA干扰

(RNA interference, RNAi)

reporter: 刘钟慧

概念回顾:

反义RNA:与靶核酸(如mRNA或有义DNA)链互补的RNA分子,可抑制靶核酸的功能。

有义链: DNA双链在转录过程中与转录形成的RNA序列相同(T对应U)的那条链,或称**编码链**或**正链**。模板链则叫做**反义链**或者**负链**。

新概念

RNAi ?

siRNA ?

miRNA ?

概述 (RNAi)

目前对**RNAi** (RNA interference)的定义有很多种。

如果将**RNAi**看作一种生物学现象定义为：
由**dsRNA**参与指导的，以外源和内源**mRNA**为降解目标的基因沉默现象。

如果将其作为一门**生物技术**，则定义为：
通过反义**RNA**与正链**RNA** 形成双链**RNA** 特异性地抑制靶基因的现象,它通过人为地引入与靶基因具有相同序列的**dsRNA**,从而诱导靶基因的**mRNA** 降解,达到阻止基因表达的目的。

发现 (RNAi)

1996年，在对矮牵牛（**petunias**）进行的研究中有一个奇怪的发现：**Rich Jorgensen**和同事将一个能产生色素的基因置于一个强启动子后，导入矮脚牵牛中，试图加深花朵的紫颜色，结果没看到期待中的深紫色花朵，多数花成了花斑的甚至白的。**Jorgensen**将这种现象命名为协同抑制“**cosuppression**”，因为导入的基因和其相似的内源基因同时都被抑制。



野生型



试验

发现 (RNAi)

RNAi是在线虫中发现的

首次发现dsRNA能够导致基因沉默的线索来源于线虫（*Caenorhabditis elegans*）的研究。

1995年，康乃尔大学的研究人员Guo和Kemphues尝试用反义RNA去阻断*par-1*基因的表达以探讨该基因的功能，结果反义链RNA的确能够阻断*par-1*基因的表达，但是奇怪的是，注入正义链RNA作为对照，也同样阻断了基因的表达。

1998年，华盛顿卡耐基研究院的Andrew Fire和马萨诸塞大学癌症中心的Craig Mello首次将dsRNA——正义链和反义链的混合物注入线虫，结果表现出比单独注射正义链或者反义链都要强得多的基因Silencing。实际上每个细胞只要很少几个分子的dsRNA已经足够完全阻断同源基因的表达。（why）

后来的实验表明，在线虫消化道中注入双链RNA不但可以阻断整个线虫的同源基因表达，还会导致其第一代子代的同源基因沉默。他们将这种现象称为RNA干扰（RNA interference，简称RNAi）。

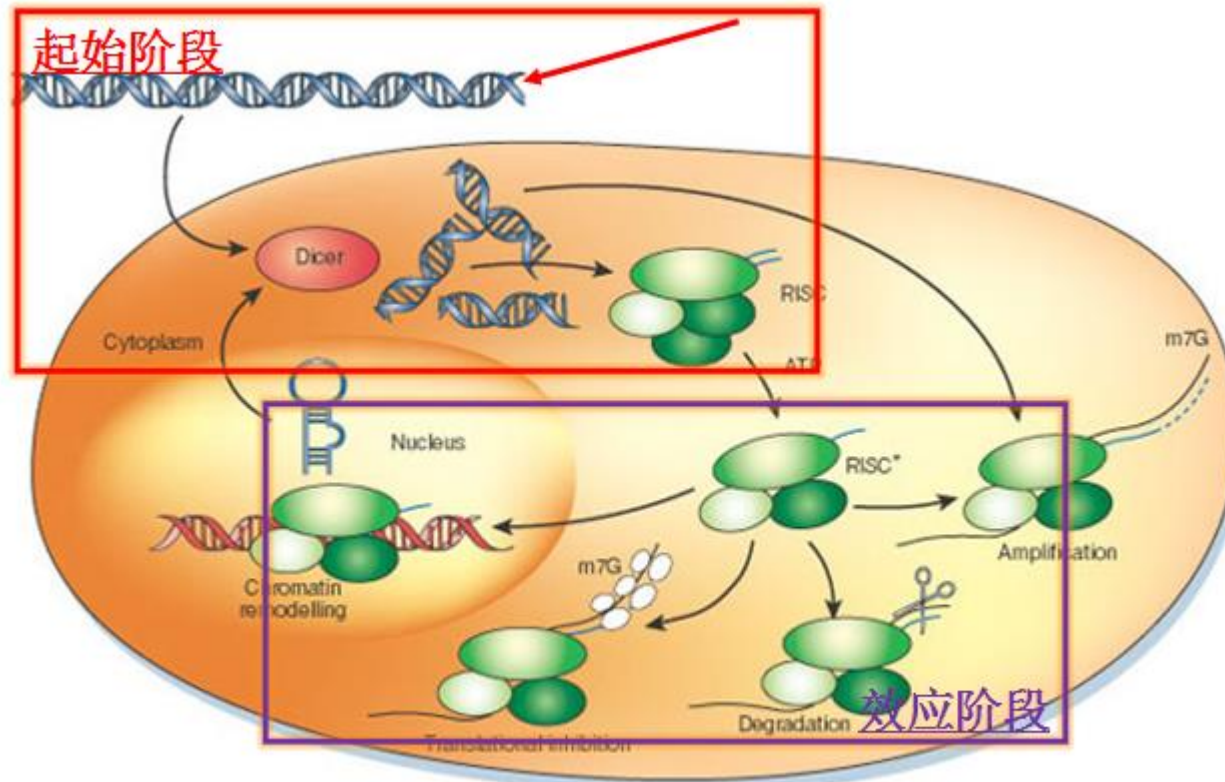
基本原理 (RNAi)

目前对RNAi的作用机理尚不清楚，主要在果蝇，线虫和斑马鱼中被阐明。

RNAi是由dsRNA诱导的多步骤、多因素参与的过程，属于基因转录后调控，其中需要ATP的参与。

通常认为dsRNA由核酸内切酶(RNAse III，在果蝇RNAse III被称为dicer)切割成21~23bp的siRNA，siRNA再与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、螺旋酶)结合形成RNA诱导的沉默复合物RISC，然后RISC再特异性地与、mRNA的同源区结合，通过酶的作用使mRNA降解，而产生基因沉默。

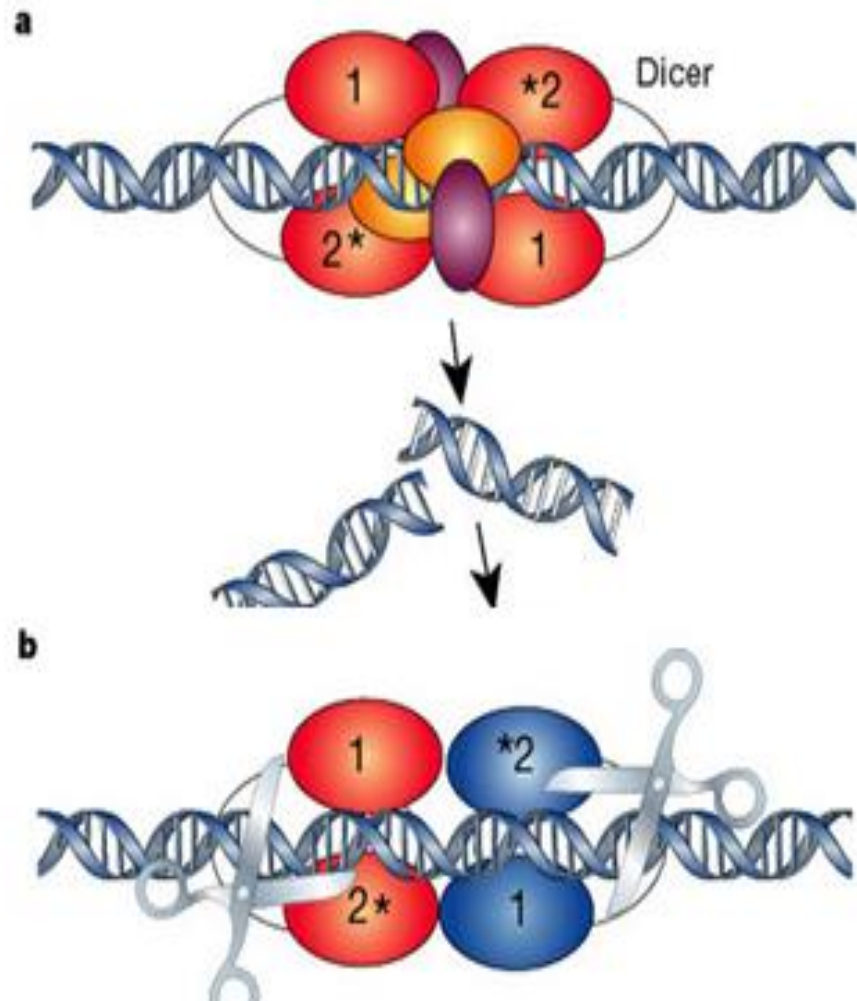
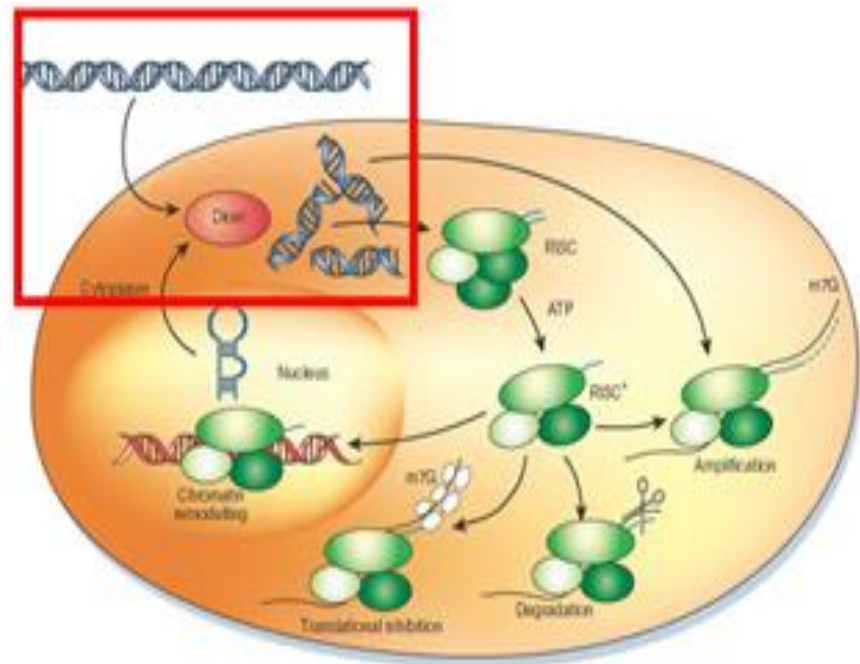
基本原理 (RNAi)



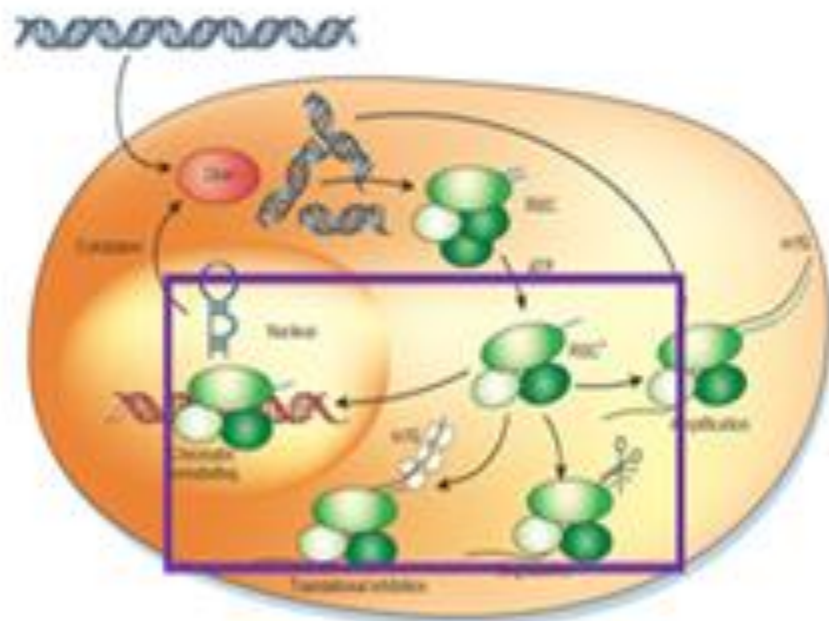
Hannon, Nature 418:244, 2002

RNA 病毒入侵、基因组中反向重复序列转录等原因,引入dsRNA, 诱发细胞内的RNAi机制

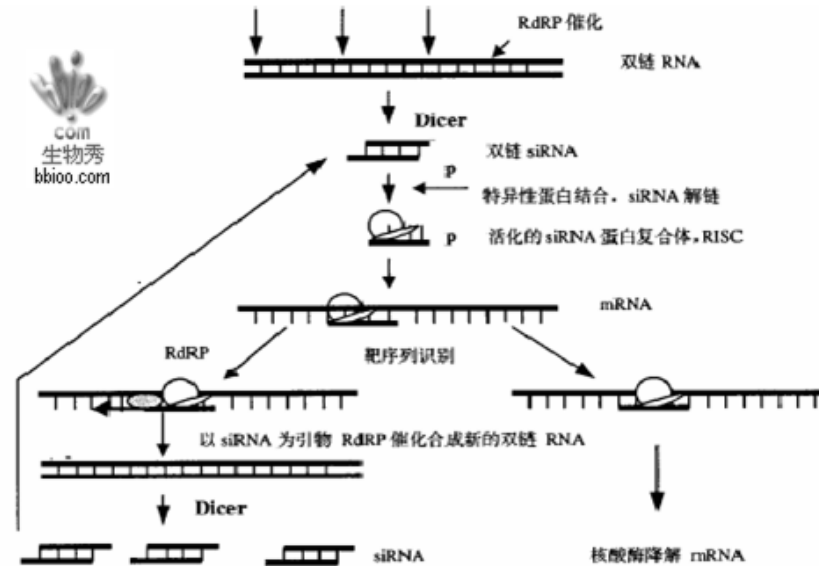
□ 在起始阶段，加入的 dsRNA 被切割为 21-23bp 长的小分子干扰 RNA 片段（small interfering RNAs, siRNAs，又被称为引导 RNAs: “guide RNAs”）。证据表明：一个称为 Dicer 的酶，是 RNaseIII 家族中特异识别双链 RNA 的一员，能以一种 ATP 依赖的方式逐步（processive）切割由外源导入或者由转基因、病毒感染等各种方式引入的双链 RNA，切割将 RNA 降解为 19—21bp 的双链 RNAs（siRNAs），每个片断的 3' 端都有 2 个碱基突出。



- 在RNAi效应阶段，siRNA双链结合一个核酶复合物从而形成所谓**RNA诱导沉默复合物**（RNA-induced silencing complex, **RISC**）。激活RISC需要一个ATP依赖的将siRNA解双链的过程。激活的RISC中的siRNA变性，双链解开，卸下正义链，反义链仍结合在复合物上，并引导RISC与同源的靶mRNA结合，**通过碱基配对定位到同源mRNA转录本上**，并在距离siRNA 3'端12个碱基的位置**切割mRNA**，从而阻断其翻译成蛋白质的活性。研究表明**每个RISC都包含一个siRNA和一个不同于Dicer的RNA酶**。



- 扩增阶段:



- 以siRNA中的一条链为引物，以靶mRNA为模板，在RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)作用下，扩增靶mRNA，产生新的siRNA，而这些siRNA又能继续反作用于靶mRNA。
- RdRP不仅能增加siRNA的拷贝数，而且能将异常的单链RNA转变dsRNA。
- RdRP还是一个重要的“sensor”，它能识别正常和异常的RNA。转基因RNA和病毒RNA都是在RdRP的识别下启动RNAi的反应过程。

RNAi有7个重要特征

1 由dsRNA介导的PTGS (post-transcriptional gene silencing) 机制

在此过程中，注射该基因的内含子或者启动子互补的dsRNA都没有干涉效应。翻译抑制剂对RNAi不产生影响。

2 高特异性

RNAi只能特异地降解与之序列相应的单个基因的mRNA，而其他mRNA的表达则不受影响。

3 高效性

无论是在体内还是体外实验中，仅需少量的dsRNA(几个数量级浓度)就能有效的抑制靶基因表达，抑制的效率在低等动物中>90%。这表明dsRNA介导的RNA干扰是一个以催化放大的方式进行的。

4 dsRNA长度限制性


引发有效iRNA的dsRNA需要一个最小的长度。dsRNA小片段如小于21~23nt(如10~15nt), 特异性将显著降低, 不能保证不与细胞内非靶向基因相互作用, 如远远大于21~23nt, 超出抑制范围。

5 ATP依赖性

在去除ATP的样品中RNA干扰现象降低或消失, 显示RNA干扰是一个ATP依赖的过程。可能是Dicer和RISC的酶切反应是必须由ATP提供能量。


6可传播性

基因表达的效应可以跨越细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给子一代。



7 RNAi有浓度、时间双重依赖性
dsRNA诱发的RNAi效应的强度随着其浓度的增高而增强。高浓度的dsRNA产生较多的siRNA。实验表明，RNAi在哺乳动物细胞中只能维持一段时间，干扰效应通常出现在注射dsRNA 6h后，可持续72h以上。

硕士论文：**RNA沉默的动力学研究** 研究单细胞水平上核心RNA沉默途径和植物中的转录后基因沉默途径的动力学行为，提出了RNA介导mRNA降解和翻译抑制的RNA核心沉默途径的简化数学模型



miRNA

MicroRNA (miRNA) 是长度为22nt左右的5'端带磷酸基团、3'端带羟基的非蛋白编码的调控小RNA家族。miRNA广泛存在于真核生物中，不编码蛋白质，它的转录产物是发夹状结构，在RNase III酶切后以双链形式存在，最后释放互补链，miRNA成熟。成熟的miRNA 5'端的磷酸基团和3'端羟基是它与相同长度的功能RNA降解片段的区分标志。

miRNA可能的形成及作用机制为：先由长的内源性转录本 (pri-miRNA) 生成70nt左右的miRNA前体 (pre-miRNA)，然后在Dicer酶的作用下使其加工成为一个不稳定的dsRNA分子，接着迅速被降解剪切为22nt左右的单链RNA，之后被PPD (PAZ & Piwi domain) 蛋白家族识别，形成miRNA核蛋白体 (miRNP)，进而形成成熟的miRNA。miRNA识别并与靶标基因3'UTR区部分配对，从而抑制靶标基因的翻译。

miRNA与siRNA的相同点:

- 1.二者的长度都约在22nt左右，都依赖Dicer酶的加工。
- 2.miRNA和siRNA合成都是由双链的RNA或RNA前体形成的。二者都是RISC组分，所以其功能界限变得不清晰。

miRNA与siRNA的不同点:

- 1.根本区别是miRNA是内源的，是生物体的固有因素；而siRNA是人工体外合成的，通过转染进入人体内，是RNA干涉的中间产物。
- 2.结构上，miRNA是单链RNA，而siRNA是双链RNA。
- 3.在作用位置上，miRNA主要作用于靶标基因3'-UTR区，而siRNA可作用于mRNA的任何部位。
- 4.在作用方式上，miRNA可抑制靶标基因的翻译，也可以导致靶标基因降解，即在转录水平后和翻译水平起作用，而siRNA只能导致靶标基因的降解，为转录水平后调控。
- 5.miRNA主要在发育过程中起作用，调节内源基因表达，而siRNA不参与生物生长，是RNAi的产物，原始作用是抑制转座子活性和病毒感染。

用途与研究方向 (RNAi)

1 研究基因功能

基因敲除技术需要较长时间去永久性的关闭某个基因的表达，而RNAi技术则可在一周内、甚至2天内可控性的关闭10个基因。RNAi技术还具有一个优势，能同时封闭多个基因或基因家族。

2 基因治疗

RNAi作用的高度特异性有可能特异地抑制致病的等位基因的表达而达到治疗目的，但又不影响正常等位基因。

3 利用低等动物来研究参与RNAi过程中的主要蛋白质和酶；研究RNAi如何调控基因的表达；

4 研究转基因沉默机制

在植物的转基因试验中，经常发生基因沉默。因此，对转基因沉默机制的探索可以为在转基因研究中避免基因沉默提供对策。

RNA 干扰以其序列特异性的优势被广泛应用于阻断或抑制基因表达,这也使得它成为强大的基因功能和基因治疗的研究工具。RNA 干扰是由 dsRNA 介导的,它与靶基因有序列同源性,长双链 RNA 被导入或转染至细胞内时,会被 Dicer 酶 (RNase III endonuclease) 裂解成 siRNA (short-interfering RNA),然后被结合到诱导沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex) 上,引导 Ago2 蛋白 (slicing protein Argonaute 2) 裂解靶基因 mRNA。RNA 干扰存在的非特异性反应阻碍了 RNA 干扰的进一步临床应用,主要包括脱靶效应和免疫副反应。RNA 干扰过程中可能伴随的脱靶沉默效应 (off-target effects, OTEs), 主要是因为直接导入细胞或胞内由 dsRNA 分解的 siRNA 与胞内其它非靶正常基因存在部分序列同源性^[1,2]。在使用 RNAi 技术识别人类低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 路径上

的调控因子的大规模基因敲除试验中,基因表达受抑制效率最高的 3 个诱导因子都源于 RNAi 的脱靶抑制,其中有两个 siRNA 通过 7 nt 的序列互补 (-AG-GCA GT-) 可以直接引发诱导因子 hif-1 α mRNA 的低表达^[3]。Tschuch 等^[4]使用靶向 GFP 绿色荧光蛋白基因的 siRNA 进行脱靶研究,发现 GFP-siRNA 不仅抑制 GFP 基因表达,而且抑制很多内源性基因的表达,这种脱靶效应依赖 GFP-siRNA 的滴度,在多种细胞系均能发现脱靶抑制现象。

随着 RNAi 技术的广泛研究和推广应用, siRNA 在哺乳动物体内引起的另一种脱靶效应——免疫副作用也引起极大关注。siRNA 的脱靶免疫副作用主要是激活天然免疫系统,诱导炎症因子如 IFN- α 、TNF- α 、TNF- β 、IL-6 等的产生,引起细胞的生长抑制等毒性作用^[5-7]。siRNA 的这种脱靶效应和免疫刺激毒性极大地影响着它的体内应用,为 siRNA 走向

RNA 干扰非特异性研究进展

韩继波 陈晨 陈始明 陶泽璋

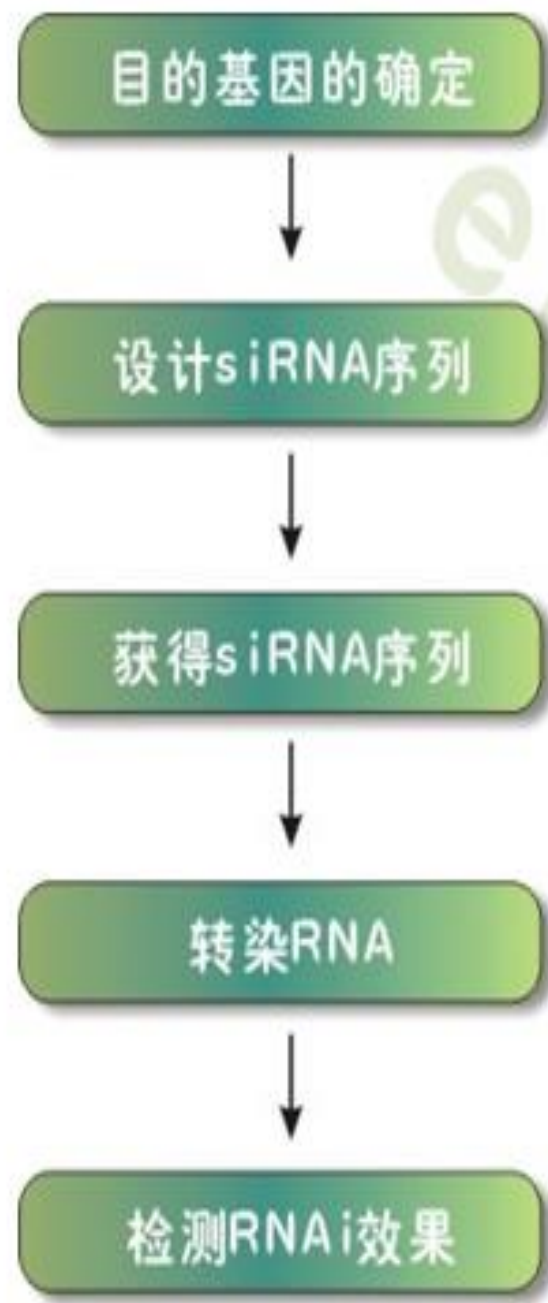
(武汉大学人民医院耳鼻喉头颈外科,武汉 430060)

应用举例:

1 研究基因功能

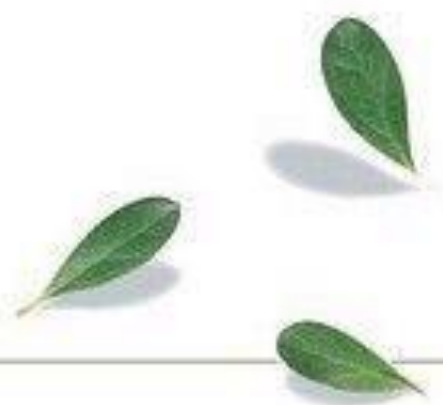
Aline等(2005)使用RNAi技术研究大豆肌糖和其功能的关系。肌糖-1-磷酸是通过肌糖-1-磷酸合成酶(GmMIPS1)催化葡萄糖-6-磷酸而来,进一步可以转化为肌醇六磷酸(InsP6)。InsP6作为磷酸盐的主要储备形式,可以为幼苗生长提供能源,调节植物生长发育。Aline等(2005)采用RNAi技术沉默GmMIPS1基因,在RNAi再生植株中没有检测到GmMIPS1的表达,同时种子发育受阻现象,另外InsP6含量下降了94.5%。以上结果表明GmMIPS1基因的表达和种子发育有密切关系,这为功能基因组学的研究提供很好的例证。

一般性步骤





目的基因的确定



设计siRNA序列

选择siRNA靶位点:

从转录本AUG起始密码子开始，搜寻下游AA序列，记录跟每个AA 3'端相邻的19个核苷酸作为候选的siRNA靶位点。

序列同源性分析:

将潜在的序列和相应的基因组数据库进行比较，排除那些和其他编码序列/EST同源的序列。

设计阴性对照:

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中的碱基序列打乱。当然，同样要保证它和其他基因没有同源性。

1. 化学合成定制
2. 体外转录法合成

特异性siRNA合成

以DNA Oligo为模版，通过体外转录合成siRNAs，这类方法主要适用于：筛选siRNAs，特别是需要制备多种siRNAs，以及化学合成的价格成为障碍时。

非特异性siRNA合成

通常选择200—1000碱基的靶mRNA模板，用体外转录的方法制备长片断双链dsRNA，然后用RNase III (或 Dicer) 在体外消化，得到siRNAs“混合鸡尾酒”。在除掉没有被消化的长链dsRNA后，这个siRNA混合物就可以直接转染细胞，转染方法和特异性siRNA一样。

3.siRNA表达框架

SECs是一种由PCR得到的siRNA表达模版，包括一个RNA pol III启动子，一段发夹结构siRNA，一个RNA pol III终止位点。它能够直接导入细胞进行表达而无需先克隆到载体中。

主要缺点是PCR产物比较难转染到细胞中。不能进行序列测定，PCR和DNA合成时可能差生的误读不能被发现，可能会因此导致结果不理想。

转染RNA

1.磷酸钙共沉淀

将氯化钙，RNA和磷酸缓冲液混合，沉淀形成包含DNA且极小的不溶的磷酸钙颗粒。磷酸钙-DNA复合物粘附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质。

2.电穿孔法

电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子。

3.DEAE-葡聚糖和polybrene

带正电的DEAE-葡聚糖或polybrene多聚体复合物和带负电的DNA分子使得DNA可以结合在细胞表面。通过使用DMSO或甘油获得的渗透休克将DNA复合体导入。

4.机械法

比如显微注射和基因枪（biolistic particle

5.阳离子脂质体试剂

在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时，其可以形成微小的（平均大小约100-400nm）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。

为了达到高的转染效率，转染过程中需要注意：

1.纯化siRNA

在转染前要确认siRNA的大小和纯度。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

3.避免使用抗生素

从细胞种植到转染后72小时期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素。

4.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。

5.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。

检测RNAi效果

RNAi分子水平的检测主要通过mRNA和蛋白两个方面进行检测。

对于mRNA，可以采用：

RT-PCR

定量PCR（指以外参或内参为标准，通过对PCR终产物的分析或PCR过程的监测，进行PCR起始模板量的定量）

Northern杂交（在变性条件下将待检的RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳，继而进行转膜和用探针进行杂交检测）

通过信号强弱判断目的基因的沉默效果。

对蛋白水平进行检测，可通过

Western杂交（通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息）

ELISA（①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性，又保留酶的活性。在测定时，把受检标本（测定其中的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅刊物定性或定量分析。）

免疫荧光 分为荧光抗原和荧光抗体法两种

RNAi技术存在的问题

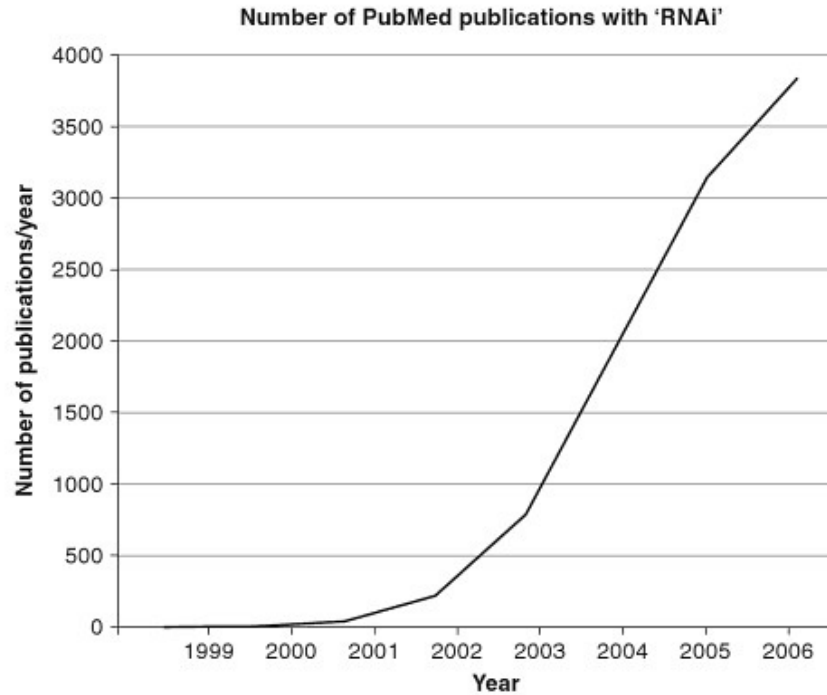
RNAi技术还有一些如寡聚核酸合成困难、易被降解、导入困难等的缺点。

低等生物对dsRNA或siRNA导入的条件要求较低，成功率较高，但对较高级的哺乳动物和人类细胞株的转染成功率却不理想。

哺乳动物的细胞对dsRNA的导入具有抗拒性，并且值得注意的是大于30bp的dsRNA导入哺乳动物细胞可诱导干扰素的合成结果是非特异性的和全面的抑制基因表达，最终导致细胞凋亡；

同时dsRNA具有浓度依赖性，dsRNA诱发的RNAi效应的强度随着其浓度的增高而增强，但是浓度过高RNAi效应也会降低等。

有关RNAi的研究 呈上升趋势





Thank you !

2010.11.12