

教学研究

基于绿色荧光蛋白的 RNAi 技术在细胞生物学实验课程中的应用实例

宋宏涛* 向本琼 张 伟

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘要 RNAi 和 GFP 报告基因的转染技术是细胞生物学领域常用的研究手段, 我们以 GFP 作为靶基因, 设计了适合在本科生课程中开设的 RNA 干扰技术实验项目, 本教改研究将 GFP 荧光观察、基因转染技术及 RNA 干扰技术融合在一个实验中, 并且对该实验项目的实例应用做了细致的设计和具体实践, 结果表明 RNAi 技术对细胞中 GFP 报告基因表达的抑制效果明显。此外本文还阐述了该实验项目在本科生的细胞生物学实验课程中开展的可行性和必要性。这种将传统技术与新技术交叉组合型实验项目的开展对于学生综合科研能力的培养具有良好的效果, 也为细胞生物学实验课程的改革提供了新思路。

关键词 RNAi; GFP; 细胞生物学实验

1 引言

细胞生物学是生命科学领域的重要基础学科, 主要研究细胞结构及细胞活动的基本规律。同时, 细胞生物学还是一门实验性很强的学科。21 世纪伴随着细胞生物学科的飞速发展, 实验课的内容和教学方法也必须赋予新的内容, 包括新的技术和研究方法^[1]。RNAi 技术可以特异性抑制或关闭特定基因的表达, 可用于基因的功能及表达调控机制的研究等领域, 并为基因治疗提供了新途径^[2]。RNAi 技术已成为细胞生物学研究领域常用的技术手段之一, 因而在细胞生物学实验教学中开设 RNA 干扰相关实验项目有助于提高本科生的科研能力。GFP (green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白) 最初在水母中被发现^[3]。因其具有独特的荧光性质, 被广泛用于蛋白质的定位、蛋白质间的相互作用、基因表达调控、细胞的筛选等研究领域。许多高等院校先后在细胞生物学实验课程中开设 GFP 报告基因的转染技术的相关实验, 并取得了较好的实验效果。本文在已有 GFP 报告基因的转染技术实验基础上, 将 RNA 干扰技术融合于 GFP 报告基因的转染技术实验项目中, 不但向学生介绍了 RNA 干扰技术的基本操作方法, 而且直观地给学生们展示了 RNA 干扰的实验效果, 同时丰富了原有的基因转染技术的实验内容。本文对该实验项目

的实例应用做了细致的论述, 并对实验安排及学生在实验中可能遇到的问题进行了分析讨论。本课程设计不仅有助于培养学生的综合科研能力, 同时也为细胞生物学实验课程的改革提供了新思路。

2 实验原理

实验课上教师讲解实验原理和实验设计理论, 并要求学生课前预习实验内容时完成如下的实验原理表格(表 1)。

3 教学设计与安排

3.1 教学目的

- 掌握 RNA 干扰技术的原理及基本操作
- 掌握基因转染技术的原理及基本操作
- 学习 siRNA 片段的设计原理及脂质体转染技术的应用范围
- 了解荧光显微镜的使用方法
- 了解 GFP 及 RNA 干扰技术在科研中的应用

收稿日期: 2010-08-05 接受日期: 2010-09-29

北京师范大学教改项目“细胞生物学实验示范课程的建设”及“细胞生物学实验网络课程体系建设”, 北京师范大学教学建设与改革项目“生物学实践类课程研究性教学模式的探索与实践”(No.08-12)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-58802159, E-mail: songhongtao@bnu.edu.cn

Table 1 Principle of RNA inference and GFP transfection

	RNA 干扰技术	GFP 报告基因的转染技术
发展历史	1998 年, Fire 等 ^[2] 将 dsRNA 注入线虫(<i>Caenorhabditis elegans</i>) 体内后发现该片段可抑制序列同源基因的表达, 抑制效应主要发生于转录之后, 并将此现象称为 RNA 干扰。	绿色荧光蛋白(GFP)是 1962 年由 Shimomura 等 ^[3] 首先从水母类(<i>Aequorea victoria</i>)海洋无脊椎动物中分离纯化出来的一种能发射强烈荧光的特殊蛋白质。
技术原理	RNAi 是指双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子引起的序列特异性靶基因 mRNA 降解, 从而导致内源或外源靶基因沉默的机制。RNAi 的三种基因沉默机制, 转录后基因沉默(PTGS) ^[4,5] 、转录水平的基因沉默(TGS) ^[6,7] 和翻译水平的基因沉默 ^[7,8] 。RNA 干扰技术的核心分子是 dsRNA, dsRNA 在体内被 Dicer 酶切割成 21~23 个核苷酸(nt)片段即小干扰 RNA(siRNA)。siRNA 的引导链与解旋酶、ATP 及多个蛋白结合形成诱导沉默复合体(RISC), 随后与 RISC 结合的 siRNA 的引导链通过碱基配对识别靶 mRNA 并在特定的位置上切割 mRNA, 从而沉默该基因的表达 ^[4,9] 。	GFP 可以在体外 395 nm 和 470 nm 的光激发后发出绿色荧光, 研究者利用普通荧光显微镜或荧光激活细胞分选器(FACS)均可检测这种明显的荧光 ^[11] 。
优点	特异性干扰目标蛋白的表达、周期短(转染后 48h 可进行观察)、效果明显(针对本实验项目中的 GFP 基因 ^[10])。	分子量(27 kDa)小、对体细胞基本无毒性、稳定, 发出绿色荧光不需要任何反应底物和辅助因子, 可在多种生物细胞中表达发出稳定荧光(只需要在紫外光或蓝光激发下即可发出绿色荧光)、可以直接在活细胞中观察。
不足	无法直观地观察干扰效果; 该技术在细胞生物学实验课程中很少体现。	单独作为实验课程项目内容简单, 技术背景单一, 缺乏新意。
应用范围	RNA 干扰技术已经迅速而广泛地应用到基因功能、基因表达调控机制研究等热门领域, 并为基因治疗开辟了新的途径 ^[11] 。	GFP 用途广泛, 在生物学领域中发挥着重要作用 ^[12] 。GFP 作为报告基因检测转基因效率; 作为融合标签检测蛋白质分子的定位、迁移、构象变化以及分子间的相互作用, 或靶向标记细胞器; GFP 定位到特定细胞器和膜系统进行实时观测和定量分析; 作为生物传感器检测活细胞的 pH 值、离子浓度和离子传递; 用于细胞筛选和药物筛选 ^[13] 。
将 RNA 干扰技术与 GFP 报告基因的转染整合在一个实验项目中		
实验原理	应用了化学合成的能够特异性干扰 GFP 蛋白表达的 siRNA 片段(缩略为 GFP-siRNA), 通过将 GFP-siRNA 与 GFP 表达载体进行体外的脂质体共转染, 然后利用荧光显微镜直观地观察绿色荧光蛋白的强度, 从而监测 siRNA 对 GFP 报告基因表达的抑制效果。siRNA 设计好坏直接关系 RNA 干扰实验的成败, siRNA 设计通常要遵循如下标准: 序列中 GC 所占的比例和序列参数(如在序列的某个特定位置包含或不包含某个核苷酸); siRNA 双螺旋与靶的热力学参数; 靶序列的结构和同源性 ^[14] 。Reynolds 总结了设计 siRNA 的 8 个标准 ^[15] 。	
优点	采用了公司商品化生产合成的能够特异性抑制 GFP 报告基因的 siRNA 片段, 实验条件成熟, 实验结果明显; RNA 干扰实验结果可以直观地通过荧光显微镜下呈现绿色荧光的细胞数目多少和荧光强弱来分析, 直观形象、且实验周期较短, 满足了开设实验课程的基本要求。	

3.2 教学重点与难点

重点: RNA 干扰的基本操作方法

难点: 细胞培养、脂质体的转染技术

3.3 实验材料与设备

材料: GFP 表达质粒(pEGFP-C₁ 空载体)、GFP-siRNA、negative-siRNA(siRNA 购买于广州锐博生物科技有限公司)、HeLa 细胞、Lipofectamine2000 (Invitrogen)、0.25% 的胰酶 (Amresco)、DMEM 培养基 (Gibco)、胎牛血清 (Hyclone)。

仪器: 超净工作台、CO₂ 培养箱(Thermo)、倒置荧光显微镜(Olympus LX51)、无菌离心管、无菌吸头、35mm 培养皿。

3.3 教学安排

学时安排:

课上 3 学时, 课前准备 2 学时由助教完成, 课后实验结果观察 2 学时, 学生自行安排时间。

课前准备:

1) GFP 质粒的提取与纯化
助教准备 pEGFP-C₁ 载体质粒, 并严格检测其纯度和浓度。

(OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.7~1.9)

2) 细胞培养

实验教师提前两天准备 HeLa 细胞, 供学生接种传代。

3) 脂质体及 RNA 溶液的准备

助教提前对脂质体转染试剂按小组分装, 同时稀释 siRNA 至适当浓度(20 μmol/L)并分装备用。

分组实验:

根据无菌室的具体条件分组,建议每2~4人为一小组。小组任务与要求:协调好分工通力合作,包括细胞培养前期准备、转染步骤、实验结果观察、实验数据分析和实验报告撰写。

3.4 实验步骤

1) 将HeLa细胞(约 4×10^5)接种于35mm培养皿(或六孔培养板)中,采用不包含抗生素的培养基,37°C、5%CO₂条件下培养至50%~70%融合度。

2) 按照如下条件准备A液和B液:

A液:用250 μl无血清培养基DMEM稀释提前配制的20 μmol/L GFP-siRNA或negative-siRNA母液10 μl(细胞培养液中siRNA终浓度为100nmol/L);

实验组A₁:250 μl无血清DMEM+10 μl GFP-siRNA+1 μg GFP质粒;

阴性对照组A₂:250 μl无血清DMEM+10 μl negative-siRNA+1 μg GFP质粒;

空白对照组A₃:250 μl无血清DMEM+10 μl灭菌的ddH₂O+1 μg GFP质粒;

上述加完之后轻轻并室温孵育5min。

B溶液:用250 μl不含血清DMEM培养基稀释10 μl Lipo2000,轻轻混匀并室温孵育5min(按照上述分组准备相同的3份B液,标记为B₁、B₂、B₃)。

3) 将上述A₁+B₁; A₂+B₂; A₃+B₃两两混合,室温静置20min。

4) 将混合的A+B混合液500 μl加入1步骤准备好的细胞培养孔内,无抗生素无血清的DMEM补足终体积2ml。轻轻混匀,在37°C、5%CO₂培养条件下培养48h(选择步骤:4~6h后更换含20%血清的DMEM)。

5) 利用倒置荧光显微镜对细胞中绿色荧光蛋白的表达进行观察,表达GFP的细胞在蓝光激发下可呈现绿色荧光。

6) 在荧光显微镜下随机挑选6个视野,对每一个视野中的总细胞数目M及呈绿色荧光的细胞数目N进行统计,并计算平均的转染效率(即呈现绿色荧光的细胞的百分率W%)。

$$W\% = \frac{(N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6)}{(M_1 + M_2 + M_3 + M_4 + M_5 + M_6)} \times 100\%$$

3.5 实验中需要注意的问题

为保证该实验的正常进行,我们进行了多次重复实验,将本实验在具体实践中的注意事项总结如下,教师要指导学生特别注意。

1) 转染前一定要关注细胞生长状态,最适合转

染的细胞状态是处于指数生长期的细胞。

2) GFP质粒的质量对转染效率的影响非常大。采用脂质体转染是基于电荷吸引原理,如果质粒纯度不高,会直接影响转染复合物的有效形成和转染效率。

3) 接种细胞时,尽量保证每孔内接种细胞数量一致,在孔内表面平均分布。

4) 实验条件允许下应该每组设置2~3个平行对照组。

3.6 实验结果的观察

3.6.1 荧光显微镜直接观察siRNA对GFP表达的干扰效果 细胞转染完成48h后,利用倒置荧光显微镜488nm激发波长下进行观察,结果图像如图1。结果表明,尽管在白光下观察实验组(共转染GFP质粒和siRNA-GFP)、空白对照组(只转染GFP基因表达质粒)和阴性对照组(共转染GFP和阴性对照negative-siRNA)的细胞生长状态和细胞密度并无明显差异,但是在激发波长488nm的荧光照片中,实验组中呈现出绿色荧光的细胞数目远远小于空白对照组和阴性对照组。而且空白对照组中,呈现绿色荧光的细胞比例接近80%,说明了整个转染体系中GFP质粒的转染效率是正常的。空白对照组与阴性对照组相比,细胞生长状态和密度基本一致,呈现绿色荧光的细胞比例也无明显差异,说明了阴性对照的siRNA片段本身对细胞生长无影响,并对质粒的转染效率无影响。在这里对照组的设置验证了实验结果的准确性。

同时,我们也监测了转染后RNA干扰效率随时间变化的影响。结果表明随着时间的增长(分别监测12h,24h,48h,72h,96h),siRNA-GFP对GFP报告基因表达的抑制效果越来越明显,其中48h是最佳的观察时间,96h之后基本观察不到呈现绿色荧光的细胞。

3.6.2 细胞荧光表达率的数学统计分析结果 由于样本中呈现绿色荧光的细胞的百分率为两个属性的计数资料,理论上服从二项分布,因此本实验中可以将转染细胞中呈现绿色荧光的细胞的百分率数值作反正弦变换后进行方差分析,检验其组间是否存在显著性差异(表2)。结果表明,实验组中细胞呈现绿色荧光的细胞的百分率远低于空白对照组和阴性对照组,并且经过方差检验,实验组与对照组之间存在极显著差异,而空白对照组和阴性对照组之间无明显差异。该方法的应用一定程度上培养了学生对生物学数据的统计处理能力。

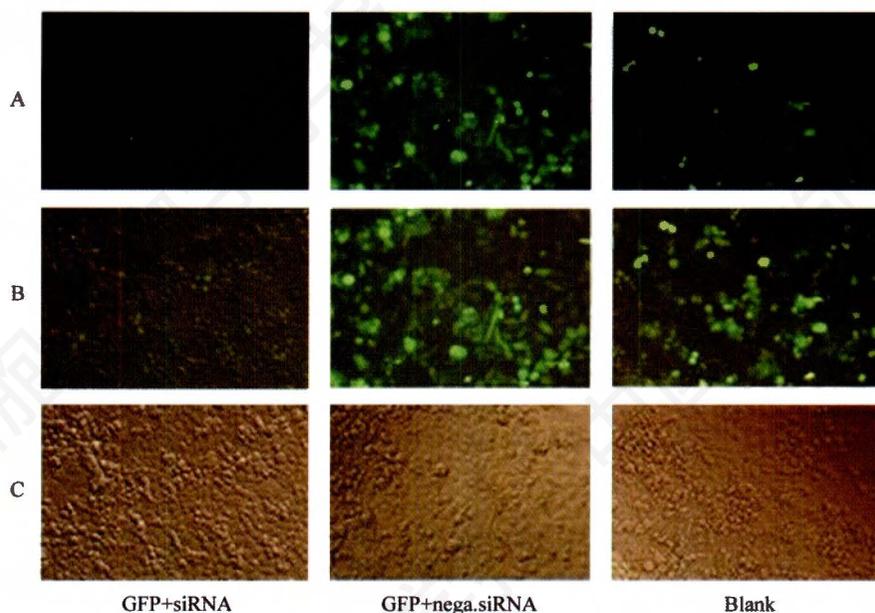


Fig. 1 The inhibition results of GFP gene in HeLa cell by siRNA (48 hours after transfection)

A: results by excitation wavelength 488 nm; B: superposed results by white field and excitation wavelength 488 nm; C: results by white field; GFP+siRNA: co-transfected with GFP vector and siRNA-GFP; Blank: transfected with GFP vector; GFP+nega.siRNA: co-transfected with GFP vector and negative siRNA.

Table 2 Statistical results of the percentage of cells showing green fluorescent in diverse groups

Groups	Percentage of cells showing green fluorescent (%)
Experiment group(GFP+siRNA-GFP)	5.62±1.12 (6) ^b
Blank control group(GFP)	80.12±0.25 (6) ^a
Negative control group (GFP+nega.siRNA)	85.26±1.26 (6) ^a

Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.01$).

Table 3 Results form (for students)

	实验组 (GFP+siRNA-GFP)						阴性对照组 (GFP+nega.siRNA)						空白对照组 (GFP)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
视野																		
细胞总数																		
绿色荧光细胞																		
呈现绿色荧光细胞的百分率																		
平均百分率																		
显著性差异																		
典型结果照片																		

3.7 学生实验结果记录表(表3)

4 讨论

4.1 开设本实验项目的意义

本实验项目的设计是在已有 GFP 报告基因的转染技术实验基础上, 将 RNA 干扰技术融合在原有的 GFP 报告基因的转染技术实验中, 不但向学生介绍了 RNA 干扰技术基本操作方法, 而且直观地给学生展

示了 RNA 干扰的效果, 同时丰富了基因转染技术的实验内容。将广泛应用于当今科研工作中的 RNA 干扰技术运用于本科生细胞生物学实验教学中, 一方面加强了学生科研能力的培养, 同时促进了细胞生物学课程的发展。我们的实验结果表明, 利用 RNA 干扰技术对细胞中 GFP 报告基因的表达进行抑制性实验具有很强的实践可行性和必要性, 适合在高校细胞生物学实验课程中进行推广。同时作为新技术与传统

Table 4 Primary trouble shooting

实验结果中的异常现象	可能原因	解决方案
实验组、空白对照组和阴性对照组均无荧光。	1. GFP 质粒的质量存在问题(浓度过低或纯度差); 2. 转染试剂失效、与靶细胞不匹配无法成功转染; 3. 细胞状态不佳或严重污染; 4. 转染步骤操作不当。	1. 重新制备高质量的质粒; 2. 更换新的转染试剂或更换推荐的细胞系进行转染; 3. 明场下检查细胞状态, 重新接种细胞进行实验; 4. 严格按照实验步骤操作, 不可省略某些操作, 比如缩短试剂孵育时间, 随意改变试剂添加顺序等。
空白对照组和阴性对照组荧光强度正常, 实验组荧光强度未发现明显减弱。	1. GFP-siRNA 的浓度过低; 2. 未充分地将质粒、转染试剂和 siRNA 孵育, 导致干扰效果不明显; 3. siRNA 由于反复冻融、购买时间过久或保存方法不当, 干扰效果降低。	1. 提高 siRNA 溶液的浓度; 2. 严格按照实验步骤操作, 保证三种试剂混合物的孵育时间; 3. 稀释 siRNA 进行多管分装, 尽量避免反复冻融; 购买的试剂时要注意保质期, 尽量使用最新的试剂; siRNA 干粉应保存于 -20℃ 或者 -70℃ 冰箱长期存放。
实验组荧光未发现减弱, 阴性对照组荧光减弱, 空白对照组正常。	可能为 GFP-siRNA 与阴性对照 siRNA 混淆使用。	仔细检查并回顾实验步骤和试剂标签, 重新加试剂完成实验。
空白对照组正常, 阴性对照组和实验组表现较弱荧光。	1. 稀释 siRNA 的溶液存在问题, 采用了未经灭菌处理的溶液稀释 siRNA 或内部包含其他杂质, 抑制了 GFP 的表达; 2. siRNA 浓度过高; 3. 阴性对照组和实验组的接种细胞在转染之后被污染或生长状态不佳。	1. 检查稀释的 siRNA 溶液是否有问题, 采用灭菌的溶液重新稀释 siRNA 至适当浓度完成实验; 2. 采用灭菌的溶液重新稀释 siRNA 至适当浓度完成实验; 3. 显微镜明场下观察细胞的生长状态, 更换新鲜准备的细胞重新实验。注意细胞培养的无菌操作。
三个组的荧光分布很不均匀, 特别是空白对照组和阴性对照组。	细胞生长分布不均匀。	接种细胞时要轻轻混匀, 使其均匀分布在平皿底部。

经典技术相结合的实验设计范例, 在课程改革和高素质人才培养方面也具有重要意义, 它为细胞生物学实验课程改革提供了新思路。

4.2 本实验项目的可行性

1) 实验方法的可行性: 本实验采用的基因转染技术条件成熟、方法简便。在原有的 GFP 报告基因转染 HeLa 细胞的实验项目基础上, 利用公司商品化合成的 siRNA 作为干扰片段对细胞中的外源 GFP 报告基因的表达进行干扰, 因而只要在细胞培养正常的情况下学生在实验中转染步骤的失误率相对较低, 保证了实验结果的成功率。预实验结果表明, 外源的 siRNA 片段能够特异性地抑制 GFP 报告基因的表达, 且抑制效果明显, 实验结果可以直观地通过细胞呈现绿色荧光的强弱来观察。

2) 实验安排的可行性: 本实验安排 3 课时, 课前的准备由助教来完成, 课后观察实验结果可由学生在课余时间自行安排。

4.3 实验项目实践过程中可能出现的问题与解决办法(表 4)

4.4 本实验的推广与应用

- 1) 实验条件: 要求具备细胞培养的基本条件。
- 2) 教师的要求: 实验教师熟练掌握细胞培养的

基本操作方法。

3) 可在已开设 GFP 报告基因转染技术的相关实验的院校推广采用。

参考文献(References)

- 1 李登文, 周 军. 细胞生物学综合性实验的设计. 实验室研究与探索 2008; 27(4): 100-3.
- 2 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391: 806-11.
- 3 Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. Curr Opin Genet Dev 2000; 10: 638-43.
- 4 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 2000; 101: 25-33.
- 5 Mette MF, Aufsatz W, Van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA. EMBO J 2000; 19: 5194-201.
- 6 Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. Mol Cell 2002; 9(6): 1327-33.
- 7 Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 2004; 432: 231-5.
- 8 Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418(6894): 244-51.

- 9 Shimonmra O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, fluorescent protein from the luminous hydromedusa Aequorea. *Cell Comp Physiol* 1962; 59: 223-9.
- 10 Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999; 17(10): 969-73.
- 11 Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 1996; 273(5280): 1392-5.
- 12 Bauer JA, Ye F, Marshall CB, Lehmann BD, Pendleton CS, Shyr Y. RNA interference (RNAi) screening approach identifies agents that enhance paclitaxel activity in breast cancer cells. *Breast Cancer* 2010; 12:R41 doi:10.1186/bcr2595.
- 13 Takuya K, Taku K, Nagomi K, Takashi A. A useful tool for isolation of protein complexes. *Biophysical Journal* 2010; 98(3): 61a.
- 14 张 镁, 刘苏虎. 小干扰 RNA 的设计及原理. *医学分子生物学杂志* 2005; 2(3): 240-2.
- 15 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorovova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotech* 2004; 22: 326-30.

RNAi Technique Based on Green Fluorescent Protein and Its Application in Course of Cell Biology Experiment

Hong-Tao Song*, Ben-Qiong Xiang, Wei Zhang

(College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract RNAi and GFP gene transfer technique are commonly used in cell biology research field. With GFP as the target gene, we developed this RNAi experiment project that is suitable for undergraduate students. In this project, we integrated GFP fluorescence observation, gene transfer and RNA interference technique into one project. Also we designed its detailed protocol and did concrete practice for this experiment project. Results showed that RNAi technique could significantly inhibit the expression of GFP gene in cell, so we drew the conclusion that this experiment project had good feasibility and necessity to be carried out in cell biology experiment course for undergraduates. This cross-cutting, integrated experiment projects should have a good effect for students' integrated research ability, and also provide a novel idea for cell biology experiment course reform.

Key words RNAi; GFP; cell biology experiment

Received: August 5, 2010 Accepted: September 29, 2010

This work was supported by Beijing Normal University Education Reform Project "Cell Biology Course-building Model" and "Cell Biology Web Course System" Funding; Beijing Normal University Teaching Building and Reform Projects "Biology Curriculum of Research and Practice Teaching Model" (No.08-12)

*Corresponding author. Tel: 86-10-58802159, E-mail: songhongtao@bnu.edu.cn