

热点话题

大规模RNA干扰筛选技术（large-scale RNA interference (RNAi) screens）终于给科学家带来了回报：为探索多种生物学问题，研究人员通过在哺乳动物细胞内进行大规模的RNAi筛选获得了一些线索。下文将对这项领先技术进行介绍。

最近，在高等哺乳动物细胞内展开的大规模RNAi筛选（large-scale RNA interference (RNAi) screens）工作在学术界引起了广泛的关注。

美国布罗德研究所（Broad Institute）RNAi协会主任David Root指出，研究人员直到近期才首次开展了几次大规模筛选工作。尽管大家可能对大规模RNAi筛选技术还存在争议，但无法否认的事实是，这项技术的确非常有用。

大规模 RNAi 筛选 技术 的时代已经来临

你只需在PubMed上进行一个快速搜索便可以发现，在过去短短的1年内，大规模RNAi筛选技术已经得到了广泛应用。例如，将其应用于研究体外培养人体细胞的分裂过程^[1]、应用于鉴定HIV病毒感染需要哪些宿主因子^[2]、应用于寻找哪些基因对于人类细胞是必需的^[3,4]以及应用于找出与5q综合症5（5q-syndrome）致病相关的基因^[5]等方面。

现在可供研究人员使用的shRNA（见文后小

词典1）与siRNA的数据资料越来越多，系统的、混合的筛选方法也在不断涌现，所以有越来越多的研究哺乳动物细胞的科学家开始转向选择使用大规模的RNAi筛选技术。但很快，研究人员发现，进行如此复杂的整体分析，如何进行优化以及试验数据验证从而得出一个有意义的结果，仍然是一个严峻的问题。Root说道：“通常来说，你越是想从这种细胞水平的筛选中获得重要结果，你就越难得到你想要的结果。”

德国德累斯顿Max Planck分子细胞生物研究院的研究人员Frank Buchholz说道：“起初，在我们还没有获得想要的结果的时候，出现了各种各样的对大规模RNAi筛选技术质疑的声音。”当发现人工合成的siRNA就足以诱发哺乳动物细胞的基因沉默，而不须像以前要使用dsRNA进行干扰来沉默基因时，人们的兴趣被点燃了。

但当研究人员兴致盎然地开始分析“脱靶”（偏离最初预想的）的实验结果时，他们发现，所谓的RNAi可以快速诱导基因表达沉默的神话破灭了。

随着对“脱靶”情况分析的逐步深入，人们发展出了一些新的解决办法。最近，在siRNA序列设计方面的进展就是为了着重避免脱靶这种会影响到筛选结果的情况的出现，例如尽量避免交叉反应。

美国Ambion公司最近就发布了新的siRNA合成服务——“沉默子选择（Silencer Select）”。该技术结合了化学修饰与更好的序列选择策略，能够在siRNA浓度很低的情况下发挥基因沉默的作用，同时也能达到增加沉默特异性的目的。也有其他的研究人员使用“多多益善”的策略来提高试验的特异性。他们将多种siRNA分子混合在一起，通过这种方法，即使每一种siRNA分子的浓度下降了，但仍然能够达到基因沉默的目的。（见背景知识框1）。

德国Cenix BioSciences公司首席执行官和首席科学家Christophe Echeverri说道：“我认为如果试验设计比较完善，则完全可以避免在使用siRNA时出现非特异性结果。”他认为，虽然目前还没有很理想的办法来避免非特异结果的出现，但被大多数研究人员和科研机构采用的“混合siRNA”方式（即采用多种不同序列的siRNA分子，但它们都针对同一个目标基因）还是能够达到降低非特异率这个研究目的^[6]。同时他还指出，现在已经有多家公司可以提供很好的大规模的全基因组siRNA文库（见文后小词典2）。

Ambion公司和美国Applied Biosystems公司已经开发出19个针对人类和小鼠基因组的siRNA文库，另外还包括几个针对药物基因组、激酶、磷酸酶和G蛋白偶联受体的亚文库。

美国Dharmacon-Thermo Fisher公司现在可以提供超过51种不同的siRNA文库，这些文库主要针对人类基因组内的各种基因与信号通路，包括膜转运、胰岛素信号、细胞周期调控以及离子通道等。

美国Qiagen公司也提供人类、小鼠和大鼠的全基因组siRNA文库，该文库是以96孔板的形式提供的。Echeverri强调，尽管每家公司设计siRNA的方法不同，但数据显示，他们的siRNA的基因沉默效果非常好，并且不同公司的文库之间沉默效果都是一样的。

研究人员和生物技术公司花费了多年来研究siRNA脱靶的问题，最终他们对RNAi机制有了更深入、更清楚的了解，也研究出了更好的siRNA试验方法。同时，Buchholz认为通过回到绘图板前，研究人员意识到使用基因筛选技术的确能给他们带来非常有价值的结果。



图片说明：David Root 和他领导的RNAi协会正致力于开发新的全基因组shRNA筛选工具。

背景知识框1 让生命研究更容易

Frank Buchholz说道：“esiRNA技术是随着RNAi技术在哺乳动物细胞中的应用而发展起来的。”（更多有关esiRNA的资料请参考文后小词典3。）但是，与人工合成的siRNA的普及相比，esiRNA技术的普及的确花费了更长的时间。

当科学家第一次在秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）和黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）体内观察到RNAi现象时，他们认为是长链的dsRNA分子导致了基因沉默。不过，随后科研人员发现，这些长链的RNA分子实际上只有在被名为Dicer的核酸内切酶III酶切成小的siRNA分子后才能发挥沉默作用。“发现了这一点之后，我们不禁想到，为什么不能自己制造长链RNA分子，然后酶切这些RNA分子呢？就像在秀丽隐杆线虫细胞内发生的机理那样。”Buchholz说道。实际上，长链dsRNA分子经Dicer酶切后的确可以在哺乳动物细胞内诱导基因沉默，而且效果很好。更幸运的是，Buchholz等人发现，用大肠杆菌的核酸内切酶III也能达到同样的效果，而且获得这种酶比获得Dicer酶容易得多。

“现在，我们就可以在哺乳动物细胞内随心所欲地进行RNAi试验了。”Buchholz说道。现正，他的研究小组已经为人类基因组和小鼠基因组中的每一个基因都准备好了esiRNA；有了这些esiRNA，

我们就可以进行大规模的RNAi筛选试验了。

esiRNA技术的进展也推动了人们对siRNA技术的应用。“看着esiRNA不断取得进展非常有意思，我们从中得到的主要东西就是了解到混合筛选的价值，”Christophe Echeverri说道。最近几年，关于用siRNA混合沉默目的基因一直有争论。所以，Buchholz等人决定比较一下人工合成的siRNA分子混合沉默、人工合成的esiRNA分子混合沉默以及单一siRNA沉默之间的区别。“我们用上述分子转染了细胞，结果发现，混合的分子种类越多，出现脱靶结果的可能性就越低。”他说道。

Buchholz认为，产生这种情况的原因是在混合siRNA的情况下，每一种siRNA分子的浓度都很低，所以就减少了非特异性。尽管每一种siRNA分子都有其脱靶效应，但混合使用使得它们每一个的浓度都降低了，也就是说，这种脱靶效应被稀释了。

Buchholz和其他科学家都希望esiRNA技术能尽快在对混合siRNA筛选感兴趣的科研人员中普遍应用。“现在有很多人向我们索取esiRNA，但我们很难满足大家所有的需求。最终还是需要通过商业化的手段向大家提供产品。我想这一天应该很快就到来了。”Buchholz说道。

短发夹RNA 2.0 (Short hairpin 2.0)

除了siRNA之外，还有一种叫做shRNA的分子，它是在细胞内被剪切成siRNA以诱导基因沉默的长链RNA分子。shRNA分子通常经由病毒介导的方式进入各种细胞，从而引起细胞广泛的、长期的基因沉默效应。

美国波士顿哈佛大学医学院（Harvard Medical School in Boston）的Stephen Elledge和美国纽约冷泉港实验室（Cold Spring Harbor Laboratory）的Greg Hannon设计出了第二代siRNA文库。

这种第二代siRNA文库可以向美国Open Biosystems公司购买获得。Hannon声称，这款产品包含覆盖整个人类基因组基因的超过一百万种的shRNA。

对于这款文库产品，Hannon和Elledge想把shRNA插入microRNA表达盒（microRNA cassette）中表达。他们把这样的表达盒称为shRNA-miRs。Elledge说道：“这样做的目的就是为了保证我们的表达载体以单拷贝的方式表达。”他还补充道，对于复合（混合）筛选来说，这种单拷贝工具非常有用。

但是Elledge相信，即使是这种第二代文库，也还是有许多可以改进的地方。他说道：“我认为，当我们了解到更多shRNA工作的机制之后，还可以进一步改进序列。”

Hannon对此表示赞同，他还指出，随着序列质量的上升和有越来越多的克隆能保证基因沉默的效力和特异性，在沉默一个基因时就可以减少所需要的shRNA的种类，他们文库里的克隆数量也会随之减少。

Root在介绍他们布罗德研究所RNAi协会创办过程时提道：“我们从无到有，很快地就建起了一个覆盖这么大范围基因的文库，并将其实际运用于高通量筛选中。”

当初创建这个包括11个不同生物医学组织的协会时，第一阶段的目标就是建立一个覆盖人类和小鼠基因组的慢病毒载体shRNA文库，并用该文库进行大规模的RNAi筛选工作。Root指出，第一阶段结束时，RNAi协会的shRNA文库共有约180万个克隆，其中人类基因组和小鼠基因组的克隆各有90万个，分别针对17万~18万个基因。

RNAi协会第二阶段的工作开始于2007年4月。第二阶段有以下几个目标：开发用于芯片筛选的新策略，并开发更具特异性的试验材料供筛选试验使用，例如开发能在同一细胞中表达的能插入不止一个shRNA的表达载体或开发携有不同分子标记、可用于进行细胞荧光分类试验的载体。但他们第二阶段的首要目标与Hannon及Elledge的目标一致，就是要完善他们的文库。Root说道：“这一阶段大部分工作就是为每一个基因设计出更多的shRNA，并评价它们的沉默效果。”

他还指出，目前所有的shRNA文库里只有极少数的克隆能够非常有效地沉默目的基因，所以对于所有开发shRNA文库的研究人员来说，改进文库质量都是一个必须首先要面对的问题。Root强调，协会的文库里40%的克隆都至少可以沉默目的基因70%的表达活性。

混合沉默



图片说明：Christophe Echeverri在Cenix BioSciences公司表示，在进行RNAi筛选之前，光优化过程就至少需要4~6个月。

尽管已经做了这么多的改进工作，还是有很多人不相信shRNA的沉默效果。“我们还是持有这种观点：可以采用siRNA沉默基因，就采用siRNA，只有完全必须采用shRNA沉默基因的情况下，才采用shRNA。”Cenix BioSciences公司的Echeverri说道。另外，还有很多人持有这样的观点：虽然shRNA文库的质量已经得到了很大的改善，但在实验室里用病毒载体做实验也并非毫无价值。“我看到了文库的质量在不断提高，但如果你真的要用文库，你还必须投入很多的精力来了解这方面的知识和仪器设备的操作。”Echeverri谈道。

不过，随着几项新技术的出现，将更有利于研究人员对文库的使用。鉴于大部分shRNA文库筛选都是用系统化的筛选仪器进行的，在这些筛选操作中，每一个病毒载体和研究细胞都分别放在孔板的一个孔中，这就非常麻烦，所以操作更简便的“混合筛选（pooled screening）”出现了。

“我认为使用混合筛选的方法进行全基因组筛选比以往的方法要容易得多。你不再需要为那些昂贵的仪器付出如此多的时间和金钱了。”Elledge说道。当把几种病毒载体混合在一起时，确认你的目的shRNA就是关键之处。为了达到这个目的，Elledge和Hannon在他们文库的病毒载体上放置了两种不同的“条形码”。“一种是60个碱基长的随机序列，我们在每一个载体身上都插入了这种序

列，随后，我们还使用shRNA的发夹区域作为条码，我们把这种条码称为半发夹条码（half-hairpin barcode）。” Elledge说道。

为了将几种shRNA组合在一起， Elledge和Hannon需要先将载体上的条码区和条码芯片杂交，然后再扩增。“我们以前是随机条码和半发夹条码都用，但现在我们大部分的产品都只用半发夹条码，因为不是每一个序列都有随机条码。” Elledge说道。他强调他们离随机条码芯片已经不远了，但这种芯片还需要时间进行优化，因为在100万个60个碱基长的随机序列之间难免会有交叉反应发生。2007年11月，美国Agilent Technologies公司宣布Hannon和Elledge将在公司的芯片上使用他们的条码技术。Hannon认为在芯片上使用混合技术和条码技术将加快siRNA筛选技术的普及。

Root和他领导的RNAi协会也一直在研究混合

筛选（pooled screening）技术。“混合筛选策略实际上就是为了找出经由两种不同方法处理过的混合细胞中的shRNA的丰度有何不同。” Root说道。

但他同时也强调，有一些试验方法不是那么容易进行混合筛选的。尤其是许多形态学的表型是不能通过这种方法进行分类的，因为研究人员无法清晰分辨究竟哪一些细胞转染了特异性的shRNA。

Elledge认为，如果一项试验需要采用显微镜来观察结果，那么最好选择siRNA筛选而不要使用shRNA筛选。不过同时，他也看到了像激光捕获显微切割技术（laser capture microdissection）和混合筛选技术相结合在分离目标细胞方面的潜力。采用这种方法，就可以把目标细胞分离出来进行培养或者观察转入的shRNA是否是引起表型改变的原因。

病毒载体的新用途

就在Elledge、Hannon和RNAi协会在努力研究shRNA筛选的混合技术时，还有其它一些公司在研究如何简化shRNA筛选中传统的“一孔接一孔（well-by-well）”的系统筛选方法。

美国Sigma Aldrich公司功能基因组全球市场总监Supriya Shivakumar说道：“传统的方法是，只要你以慢病毒为载体转shRNA，你都不得不重新构建病毒载体，这是一项非常困难同时还十分费时、费力、费钱的工作。” Supriya Shivakumar说道。

所以，sigma公司开发出了LentiExpress——用于shRNA筛选的板载反向转导产品。在这款产品中，每一个病毒颗粒都载有一种shRNA，而这些病毒颗粒早已被嵌入板上的每一个孔中。“研究人员从冰箱中拿出板来，在室温中放置一会儿，再加入细胞，“当细胞贴壁后，感染过程也完成了。” Edward Weinstein说道，他是Sigma Aldrich公司生物技术研究部门的经理。

其实，由美国麻省理工学院的怀德海生物医药研究所（Whitehead Institute for Biomedical Research）的David Sabatini实验室开发出来的反

向转染（reverse-transfection）技术早已被广泛应用于从事siRNA研究的实验室，但像这样以芯片形式出现且每孔中都预装了病毒颗粒的产品还是第一次出现。Sigma公司（RNAi协会的成员之一）也将会以这种芯片的形式供应布罗德研究所开发的部分shRNA文库。其中第一款产品是包含3109种shRNA克隆，针对673个激酶基因的芯片，这套芯片包括41块拥有96个孔的板。

然而，对于任何一种RNAi筛选技术的进步性来说，要想获得认同是一件非常困难并且耗时的事情。不过，Shivakumar还是认为LentiExpress产品加快了筛选的速度。“我们已经尽可能简化了操作，我们也把试剂设计成最容易使用的形式。”她说道。

尽管大规模RNAi筛选技术已经走上了正轨，研究人员也已经开始正视这项技术，但仍然还有许多从事该技术研发的人员认为还有许多需要改进的地方。

“RNAi筛选技术的确有用，我们也正在努力使它更便宜更高效。我相信随着越来越多的人参与进来，这项技术将变得更好。” Root说道。

表1 部分可以提供RNAi产品的公司名称

部分可以提供RNAi产品的公司名称	公司网址
Amaxa Biosystems	http://www.amaxa.com
Ambion	http://www.ambion.com
Applied Biosystems	http://www.appliedbiosystems.com
Agilent	http://www.agilent.com
Asuragen	http://www.asuragen.com
BD Biosciences	http://www.bdbiosciences.com
BioCat	http://www.biocat.de
BioChain	http://www.biochain.com
Cellectricon	http://www.cellectricon.com
Cenix Biosciences GmbH	http://www.cenix-biosciences.com
Clontech	http://www.clontech.com
CombiMatrix	http://www.combimatrix.com
CytRx	http://www.cytrx.com
Eurogentec	http://www.eurogentec.com
Exiqon	http://www.exiqon.com
GeneCopoeia	http://www.genecopoeia.com
Geneservice	http://www.geneservice.co.uk
GeneTools	http://www.gene-tools.com
genOway	http://www.genoway.com
Imgenex	http://www.imgenex.com
Integrated DNA Technologies	http://www.idtdna.com
Invitrogen	http://www.invitrogen.com
InvivoGen	http://www.invivogen.com
Lentigen	http://www.lentigen.com
Mirus Bio	http://www.genetransfer.com
Molecular Devices	http://www.moleculardevices.com
MWG Biotech	http://www.mwg-biotech.com
New England Biolabs	http://www.neb.com
Novagen	http://www.emdbiosciences.com
OligoEngine	http://www.oligoengine.com
Open Biosystems	http://www.openbiosystems.com
Orbigen	http://www.orbigen.com
Perkin Elmer	http://www.perkinelmer.com
Polyplus Transfection	http://www.polyplus-transfection.com
Promega	http://www.promega.com
Qiagen	http://www.qiagen.com
Regulus Therapeutics	http://www.regulusrx.com
Roche Applied Science	http://www.roche-applied-science.com
Rosetta Genomics	http://www.rosettagenomics.com
Sigma Aldrich	http://www.sigmaaldrich.com
Stratagene	http://www.stratagene.com
SuperArray Bioscience Corporation	http://www.superarray.com
Sylentis	http://www.sylentis.com
Targeting Systems	http://www.targetingsystems.com
Tebu-Bio	http://www.tebu-bio.com
Thermo Fisher/Dharmacon	http://www.dharmacon.com
Vectalys	http://www.vectalys.com


 YORK/编译


Nathan Blow/原作者

Nathan Blow于美国雪城大学（Syracuse University）取得博士学位，研究方向是脊椎动物视色素的分子进化。随后，Nathan成为美国波士顿儿童医院以及哈佛医学院博士后，从事宿植病原体交流（host-pathogen interactions）以及霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）免疫应答的研究工作。2007年4月，Nathan成为《自然》（*Nature*）杂志和《自然-方法》（*Nature Methods*）杂志的生物技术方法编辑。

参考文献

1. Kittler, R. *et al. Nat. Cell Biol.* 9, 1401–1412 (2007).
2. Brass, A.L. *et al. Science* 319, 921–926 (2008).
3. Silva, J.M. *et al. Science* 319, 617–620 (2008).
4. Schlabach, M.R. *et al. Science* 319, 620–624 (2008).
5. Ebert, B.L. *et al. Nature* 451, 335–339 (2008).
6. Echeverri, C.J. *et al. Nat. Methods* 3, 777–779 (2006).

原文检索：
www.nature.com

小词典

1 shRNA: 即短发夹RNA。在RNAi感染过程中,产生dsRNA的一个有效方法就是在体内表达一个短发夹RNA分子。这种shRNA包含两个短的反向重复序列(其中一个与目的基因互补),即siRNA正义链和反义链,中间由一个loop序列分隔,组成发夹结构。在体内,shRNA可以被加工成为siRNA。所以简单地说,shRNA就是设计成发卡样的siRNA。构建shRNA的表达载体可以在细胞内直接转录出shRNA并生成相应的siRNA,其干扰效果等同于siRNA,而且还可以解决siRNA干扰时间短的缺点。

RNA沉默存在两种既有联系又有区别的途径:siRNA途径以及miRNA途径。

siRNA途径由dsRNA引发。dsRNA被一种RNase III家族的內切核酸酶(RNA-induced silencing complex, Dicer)切割成21~26 nt长的siRNA,并通过siRNA指导形成RISC蛋白复合物(RNA-induced silencing complex),令其降解与siRNA序列互补的mRNA而引发RNA沉默。

而miRNA途径中miRNA是含量丰富的非编码小RNA(21~24个核苷酸),由Dicer酶切割内源性表达的短发夹结构RNA(hairpin RNA, hpRNA)形成。miRNA同样可以与蛋白因子形成RISC蛋白复合物,可以结合并切割特异的mRNA而引发RNA沉默。尽管引发沉默的来源不同,但siRNA和miRNA都参与构成结构相似的RISC,在作用方式上两者有很大的相似性。

据《自然》(*nature*)报道,大剂量使用shRNA时,会扰乱另外一个关键的RNA途径——microRNA途径,而且还会干扰miRNA的正常生理活性从而引起研究中的小鼠死亡,这可能是由shRNA与内生的miRNA之间为与Exportin-5结合所展开的竞争造成的。Exportin-5是一个参与将分子输送出细胞核的因子。而siRNA并不会如同shRNA

一样加大剂量引起毒性,因为这一过程并不会影响miRNA途径。

2 siRNA文库: 独立的siRNA可用于研究单个基因的功能,可后基因组时代的今天,研究人员已经不满足于一次“缺失”一个基因这样的研究节奏,功能基因组学更需要能站在全局高度研究多个基因之间关系的工具,siRNA文库应运而生。

如果说基因芯片可以全局高通量地研究某个基因确实将对整个基因组表达产生的影响,那么siRNA文库则便于同时研究多个基因分别缺失时细胞的变化,从而进行大规模筛选研究基因和功能的关系。RNAi芯片源自高通量的矩阵芯片概念,它与RNAi结合,使得RNAi不再局限于一次一个基因样本沉默的实验,而可以象芯片一样一次同时进行多基因高通量大规模批量筛选,从而得以站在全局的高度研究不同的基因沉默之间的相互关系。

人类基因中特定的某些组,分装在96孔板的siRNA库,形成类似“矩阵”的组合。每个基因对应3个不同的siRNA,分别在3块96孔板的同一位置上以便相互参照平衡。每板留有8个空白孔和8个对照孔,用户可以选择多至4个Ambion的对照siRNA(2x4)。空白孔留做无转染的空白对照或者不加siRNA的负对照。配合高效快速的反向转染技术——先用培养基稀释siRNA于96孔板,批量加入用培养基稀释的转染试剂于96孔板中,温育形成转染复合物,再批量加入胰酶消化收获的细胞于96孔板中铺板,直接培养24–48小时即可检测。

3 esiRNA: 全称为Endoribonuclease-prepared siRNA,即在体外利用酶合成RNA分子。该方法利用克隆的感兴趣基因作为模版。接着,这些RNA分子被随机分割成短的片段,纯化后用于RNAi实验。这种方法是由德国马克思·普朗克分子细胞生物学和遗传学研究所的Frank Buchholz研究组发明。esiRNA可用于制备大型esiRNA文库以用于大规模的基因功能研究。