

## 茎环法 RT-qPCR 定量检测细胞抗猪瘟病毒 siRNA 的表达

刘帅<sup>1,2</sup>, 李江南<sup>2</sup>, 袁婷<sup>1</sup>, 杨凡力<sup>1</sup>, 逢大欣<sup>1</sup>, 涂长春<sup>2</sup>

1 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062

2 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林 长春 130122

刘帅, 李江南, 袁婷, 等. 茎环法 RT-qPCR 定量检测细胞抗猪瘟病毒 siRNA 的表达. 生物工程学报, 2012, 28(1): 26-36.  
Liu S, Li JN, Yuan T, et al. Quantitative detection of anti-classical swine fever virus siRNA expression in cells by stem-loop RT-qPCR. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 26-36.

**摘要:** RNAi (RNA interference) 已成为特异抗病毒治疗研究的热点, 但 siRNA (small interfering RNA) 的定量检测仍是评价 RNAi 抗病毒效果的瓶颈。为了检测抗 CSFV 特异 siRNA 分子 (siN1 和 siN2) 在细胞中的表达水平, 设计并以交叉组合方法筛选了具有较高特异性和灵敏度的 siRNA 特异茎环引物 (SLP-N1-6 和 SLP-N2-8), 成功地建立了最优的 siN1 和 siN2 的茎环法 RT-qPCR 检测方法。该方法表现出良好的特异性和较高的灵敏度, 能检测出  $10^2$  至  $10^8$  个拷贝的 siRNA, 至少可达 7 个数量级的检测范围, 平行性好 ( $R_{sq}=0.999$ ), 扩增效率高 (Eff. =98.2%)。茎环法 RT-qPCR 能准确地定量检测抗 CSFV 的 PK-15 细胞克隆的 siN1/siN2 表达水平, 可结合常规的检测病毒水平的间接免疫荧光和 TCID<sub>50</sub> 等技术定量评价 RNAi 抗 CSFV 的有效性, 为未来抗猪瘟转基因猪的抗病毒效果评价提供了先进的检测技术。

**关键词:** 抗猪瘟病毒小干扰 RNA, 茎环引物, MGB 探针, 实时定量 PCR

## Quantitative detection of anti-classical swine fever virus siRNA expression in cells by stem-loop RT-qPCR

Shuai Liu<sup>1,2</sup>, Jiangnan Li<sup>2</sup>, Ting Yuan<sup>1</sup>, Fanli Yang<sup>1</sup>, Daxin Pang<sup>1</sup>, and Changchun Tu<sup>2</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

2 Institute of Veterinary Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China

**Received:** October 17, 2011; **Accepted:** November 23, 2011

**Supported by:** National New Breed of Transgenic Livestock Program (No. 2008ZX08006-001).

**Corresponding author:** Changchun Tu. Tel/Fax: +86-431-87960009; E-mail: changchun\_tu@hotmail.com

农业部转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2008ZX08006-001) 资助。

**Abstract:** RNA interference (RNAi) is a promising technology in development of specific antiviral therapy, but the quantitative detection of small interfering RNA (siRNA) expressed *in vivo* is the main challenge to assess its antiviral effect. In order to detect the siRNA molecules (siN1 and SiN2) particularly expressed in cells to inhibit the replication of classical swine fever virus (CSFV), serial specific stem-loop primers were designed and synthesized. Two of them (SLP-N1-6 and SLP-N2-8) were selected by screening in cross combination and successfully used in establishment of an optimal stem-loop RT-qPCR, which showed high specificity and sensitivity in detection of anti-CSFV siRNA expressed in PK-15 cells. The method was capable of detecting  $10^2$  to  $10^8$  copies of siRNA molecule with good parallel relationship ( $R_{sq}=0.999$ ) and high amplification efficiency (Eff. = 98.2%). Therefore, the established stem-loop RT-qPCR can be used as an ideal tool in quantitative assessment of the anti-CSFV effects of RNAi in combination with detection of viral antigens using indirect immunofluorescent assay and TCID<sub>50</sub>, providing a novel technique for evaluating the antiviral effects of the siRNA expressed in anti-CSFV transgenic pigs to be established in future.

**Keywords:** anti-CSFV siRNA, stem-loop primer (SLP), MGB probe, real-time PCR

RNAi 作为一种有效的抗病毒工具,已成功应用于抑制人体免疫缺损病毒 I 型 (HIV-1)<sup>[1]</sup>、SARS 冠状病毒 (SARS-CoV)<sup>[2]</sup>等多种病毒的复制增殖。猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种高度接触性传染病,给养猪业带来重大经济损失。CSFV 是有囊膜的正链 RNA 病毒,基因组 RNA 兼具复制和转录功能,且非结构蛋白基因保守性比较高<sup>[3]</sup>,提供了理想的 RNAi 靶位点。为应用 RNAi 技术构建抗猪瘟病毒转基因猪,本研究小组曾针对 CSFV 非结构蛋白基因 *N<sup>pro</sup>* 成功设计了 2 个 siRNA——siN1 和 siN2<sup>[4]</sup>,并构建了相应的 siRNA 表达载体——pLox-siN1 和 pLox-siN2<sup>[5-6]</sup>,在细胞水平通过检测病毒的复制和增殖水平,证明了 siN1 和 siN2 对 CSFV 有显著的抑制效果,但是,抗性细胞中 siRNA 的表达检测却制约了 RNAi 效果的评价。所以亟需建立一种准确而简便的 siRNA 定量检测方法,对抗猪瘟病毒转基因猪 siRNA 的表达水平及组织表达差异进行有效监测及评价。

目前,已有多种 siRNA、miRNA (microRNA)

等小 RNA 的检测方法。Northern blotting<sup>[7]</sup>仍是小 RNA 检测的金标准,但其特异性和灵敏度不高。而基于 LNA (Locked nucleic acid) 标记探针的新型 Northern blotting<sup>[8]</sup>虽然显著改善了检测灵敏度和特异性,但仍存在操作步骤繁琐、需样品量大、可检测范围低等缺点,更难于准确定量。然而,多种实时定量 PCR 方法<sup>[9-16]</sup>被开发出来定量 miRNA 的表达水平,常用的包括 Poly (A) 加尾法<sup>[15]</sup>和茎环引物法<sup>[16]</sup>。前者可同时逆转录细胞内所有的 miRNA,成本低但灵敏度和特异性均不如后者,适合于 miRNA 的大量筛选工作。后者创新地设计了具有稳定空间结构的茎环引物,比常规线性引物有更高的特异性和灵敏度,并联合特异性 MGB 探针,使其可精确区分同家族高度同源的 miRNA,重要的是仅对成熟 miRNA 进行检测,而不受其前体 (Pre-miRNA) 干扰。但每种 miRNA 都需要设计一个对应的茎环引物和 MGB 探针,成本高且操作相对繁琐,所以适于少数靶基因的定量检测。2009 年,Cheng 等<sup>[17]</sup>将茎环法 RT-qPCR 成功地应用于人工合成 siRNA 的检测,并在分子、细胞和动物个体等水

平准确定量了未修饰的单链 siRNA, 3 末端有两个突出的双链 Silencer<sup>®</sup> siRNA 及 LNA 修饰的双链 Silencer<sup>®</sup> Select siRNA 等 3 种形式的 siRNA, 有效地解决了对 siRNA 传递效率、分布和稳定性等难于评价的问题。

在本研究中, 我们建立了检测 siN1 和 siN2 两个抗 CSFV 的特异 siRNA 表达水平的茎环法 RT-qPCR, 准确定量检测了抗 CSFV 的 PK-15 细胞克隆的 siRNA 表达水平, 特异性强, 灵敏度高, 可精确至 100 个拷贝, 检测范围宽。可用于 RNAi 抗病毒效果的定量评价, 为未来转基因动物的抗病毒效果评价提供了参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和细胞

高效且特异抑制 CSFV 复制增殖的 siRNA 表达载体 pLox-siN1 和 pLox-siN2 及表达乱序 siN1 的对照载体 pLox-siC 均为本实验室构建并保存<sup>[6]</sup>; PK-15 猪肾传代细胞系 (85 代) 由本室保存; 猪胚胎成纤维细胞 (Porcine fetal fibroblasts, PFF) 由吉林大学欧阳红生教授惠赠。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Apal* I 购自 NEB 公司; 转染试剂 FuGENE<sup>®</sup> HD 购自 Roche 公司; G418 购自 Gibco 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (MirVana miRNA Isolation Kit), 逆转录试剂盒 (TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit) 和实时定量 PCR 试剂 (TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG) 均购自 ABI 公司; 猪抗 CSFV 阳性血清 (5 号) 和阴性猪血清由本实验室制备、鉴定并保存<sup>[18]</sup>; 异硫氰酸荧光素

(FITC) 标记的兔抗猪 IgG 抗体购自 Sigma 公司; 实时定量 PCR 仪 Stratagene Mx3000P 购自 Agilent 公司; 核酸测定仪 NanoDrop 1000 购自 Thermo 公司。

### 1.2 转染及抗 CSFV 的阳性细胞克隆鉴定

用 *Apal* I 双酶切质粒 pLox-siN1、pLox-siN2 和 pLox-siC 并乙醇沉淀回收含抗性基因 *neo* 的目的片段。用含 10% 小牛血清的 MEM 营养液以每孔  $2.0 \times 10^5$  个 PK-15 细胞传代于 6 孔细胞培养板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20~24 h, 使细胞贴壁生长满度达到 85%~90%, 用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染 24 h 后 1:50 传代于 6 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后换用 500 mg/L G418 的 MEM 培养基筛选 12~14 d, 质粒 pLox-siN1、pLox-siN2 和 pLox-siC 挑取细胞克隆 (分别命名为 PK-N1、PK-N2 和 PK-siC) 各 3 个至 24 孔板中培养, 扩大培养并进行 *neo* 基因 PCR 鉴定 (引物 *neo*-FP 和 *neo*-RP 序列见表 1), 以确定基因组中整合了目的基因片段。按以前所述方法<sup>[6]</sup>包括 IFA (接毒后 72 h)、病毒基因组拷贝数 (48 h 和 72 h) 和 TCID<sub>50</sub> (48 h 和 72 h) 测定以上阳性克隆抑制 CSFV 复制增殖的效果。

### 1.3 引物和 MGB 探针设计

参考 Chen 等<sup>[16]</sup>和 Tang 等<sup>[19]</sup>设计 siN1 和 siN2 检测用引物和探针 (表 1): 茎环引物由 5' 端通用茎环结构序列 (5'-CTCAACTGGTGTC GTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG-3') 和 3' 端与 siRNA 3' 端反向互补配对的 siRNA 特异性序列组成, 根据与 siRNA 配对的寡核苷酸数量 (6 或 8 个) 不同对每个 siRNA 设计了两种茎环引物 (分别为 SLP-N1-6、SLP-N1-8 和 SLP-N2-6、

SLP-N2-8)。实时定量 PCR 上游引物包括用于提高  $T_m$  值并延伸 PCR 产物的 5'端通用序列 (5'-ACACTCCAGCTGGG-3') 和 3'端 siRNA 特异序列。MGB 探针由 5'端 6-FAM 标记的通用序列 (5'-TTCAGTTGAG-3') 和 3'端 MGB 标记 siRNA 特异序列组成。选择表达丰度较高且稳定的猪内源性 ssc-miR16 为内参, 监测样本质量、RNA 提取及 RT-PCR 等过程。所用引物均由南京金斯瑞基因有限公司合成, MGB 探针由上海基康基因有限公司合成, 标准品 ssiN1 (人工合成

的 siN1, 序列见表 1) 由 TaKaRa 公司合成。

## 1.4 茎环法 RT-qPCR

### 1.4.1 总 RNA 提取

将获取的抗 CSFV 的 PK-15 细胞克隆培养于 6 孔细胞培养板中, 当满度达 90%至 95%时, 弃培养液, 用 1 mL 冷 PBS 在冰上洗细胞 2 次, 然后按 MirVana miRNA isolation kit 说明书建议加入 500  $\mu$ L 裂解液裂解后提取总 RNA, 以正常 PK-15 细胞为阴性对照。用 NanoDrop 1000 测定 RNA 浓度及质量, 分装于  $-80$   $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 siRNA 及引物和 MGB 探针序列

Table 1 Sequence of siRNA, primer and MGB probe

Primer name	Primer sequence (5'-3')
neo-FP	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
neo-RP	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAG
ssc-miR16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
SLP-miR16	<u>CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGCCAATA</u>
FP- miR16	<u>ACACTCCAGCTGGGTAGCACACGTAAATA</u>
MGB-miR16	(6-FAM) <u>TTCAGTTGAGCGCCAATA</u> (MGB)
siN1/ssiN1	CCUGUCACCCUACCUAUCCUU
SLP-N1-6	<u>CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGGAT</u>
SLP-N1-8	<u>CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGGATAG</u>
FP-N1	<u>ACACTCCAGCTGGGCCTGTCACCCCTACCT</u>
MGB-N1	(6-FAM) <u>TTCAGTTGAGAAGGATAG</u> (MGB)
siN2	CUAAUCCACUUCAGGGUUCUU
SLP-N2-6	<u>CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGAAC</u>
SLP-N2-8	<u>CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGAACCC</u>
FP-N2	<u>ACACTCCAGCTGGGCTAATCCACTTCAGG</u>
MGB-N2	(6-FAM) <u>TTCAGTTGAGAAGAACCC</u> (MGB)
URP	CTCAAGTGTCGTGGGTCGGCAA

SLP: stem-loop primer; FP: forward primer; URP: universal reverse primer; dashed area: universal sequence.

### 1.4.2 茎环法逆转录反应

逆转录反应体系包括 50 nmol/L 茎环引物, 0.25 mmol/L dNTPs, 3.33 U/ $\mu$ L 逆转录酶, 0.25 U/ $\mu$ L RNA 酶抑制剂, 1 倍逆转录缓冲液, 10 ng 总 RNA, 用无 RNA 酶水补至 15  $\mu$ L。反应条件为冰上放置 5 min, 16  $^{\circ}$ C 30 min, 42  $^{\circ}$ C 延伸 30 min, 85  $^{\circ}$ C 酶灭活 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。所有逆转录反应均为两个重复。

### 1.4.3 实时定量 PCR 反应

实时定量 PCR 反应体系为 10  $\mu$ L PCR 预混液, 1.5  $\mu$ mol/L 上游引物, 0.7  $\mu$ mol/L 通用下游引物, 0.2  $\mu$ mol/L MGB 探针, 1.2  $\mu$ L cDNA 产物, 去离子水补至 20  $\mu$ L。在 Agilent Stratagene Mx3000P 实时定量 PCR 仪上完成反应, 条件为: 95  $^{\circ}$ C 热启动 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 在 60  $^{\circ}$ C 收集荧光, 共 40 个循环。所有反应包括阴性细胞对照 (NC) 和空白对照 (NTC) 均为 2 个重复, 结果取均值, 产物连接 T 载体测序验证。

### 1.4.4 标准曲线的绘制及灵敏度分析

为准确定量细胞克隆的 siRNA 表达水平, 以 10 mg/L 浓度的 PK-15 细胞总 RNA 为稀释液 10 倍梯度稀释已知拷贝数的标准品 ssiN1, 取 8 个梯度 (拷贝数从 10 到  $1.0 \times 10^8$ ) 进行茎环法 RT-qPCR 检测绘制标准曲线, 计算细胞表达的 siRNA 拷贝数, 并分析此方法检测灵敏度。

### 1.4.5 特异性分析

因细胞表达数百种与 siRNA 大小相似的内源性 miRNA, 可作为特异性分析材料, 所以选择 PK-N1、PK-N2 和 PK-siC 细胞克隆及阴性细胞 PK-15 和 PFF 的总 RNA 为模板进行 siN1 和 siN2

的茎环法 RT-qPCR 检测, 以评价检测特异性。

## 1.5 数据分析

用 Agilent 公司的 Stratagene Mx3000P 软件分析 PCR 结果。采取手动方式将阈值选定在固定荧光阈值 6000 得到各反应管的  $C_q$  值 (Quantification cycle), 软件自动生成标准曲线。用 SPSS 软件完成数据统计分析。

## 2 结果

### 2.1 抗 CSFV PK-15 细胞克隆的制备及鉴定

将 G418 筛选获得的 PK-15 细胞克隆进行 *neo* 基因 PCR 鉴定, 均成功扩增出了 *neo* 基因片段 (图略), 说明细胞克隆均整合了目的基因片段; 抗 CSFV 检测结果如图 1 所示, IFA 结果中阳性细胞克隆荧光比例为 5% 左右, 远远低于对照细胞 PK-siC 的 80%~85%, 表明有效降低了 CSFV 抗原的合成; 阳性细胞克隆的病毒基因组拷贝数和 TCID<sub>50</sub> 测定结果均显著低于对照细胞 ( $P < 0.01$ ), 表明有效抑制了病毒基因组复制和成熟病毒粒子装配。以上结果共同表明已成功获得了抗 CSFV 的 PK-N1 和 PK-N2 细胞克隆。

### 2.2 茎环逆转录引物筛选

应用两种茎环引物分别以相应阳性克隆、PK-15 细胞的总 RNA 为模板进行茎环法 RT-qPCR 检测。为筛选出最佳茎环引物, 以具有较高逆转录效率且较低的背景信号为筛选原则, 并引入  $\Delta C_q$  进行量化评价, 每种逆转录引物的  $\Delta C_q = C_q$  (阴性细胞对照) -  $C_q$  (阳性细胞克隆),  $\Delta C_q$  越大, 则逆转录引物具有越高的逆转录效率且产生越低的背景信号。结果如图 2 所示, siN1 检测体系的茎环引物 SLP-N1-6 的  $\Delta C_q$  (7.09) 远

大于 SLP-N1-8 (0.32), siN2 检测体系的 SLP-N2-8 的  $\Delta C_q$  (10.48) 远大于 SLP-N2-6 (5.93), 所以均为最佳的茎环引物。

### 2.3 特异性分析

特异性分析结果如表 2 所示, PK-N1 和 PK-15 的 siN2 检测结果相同, PK-N2 和 PK-15 的 siN1 检测结果也相同, 说明 siN1 和 siN2 两种检测体系不会相互影响, 均只能特异性地检测各

自目的 siRNA; PK-siC 和 PK-15 的 siN1 检测结果相同, 说明乱序的 siN1 分子不会影响 siN1 的检测; 而两种阴性细胞 PK-15 和 PFF 的  $C_q$  均在 35 左右, 且远大于阳性克隆 ( $C_q$  为 25-28), 说明检测背景底, 可通过  $C_q$  的差异有效地区分阴阳性结果。以上结果共同表明我们建立检测 siN1 和 siN2 的茎环法 RT-qPCR 受内源性 miRNA 的干扰很小, 具有很高的检测特异性。

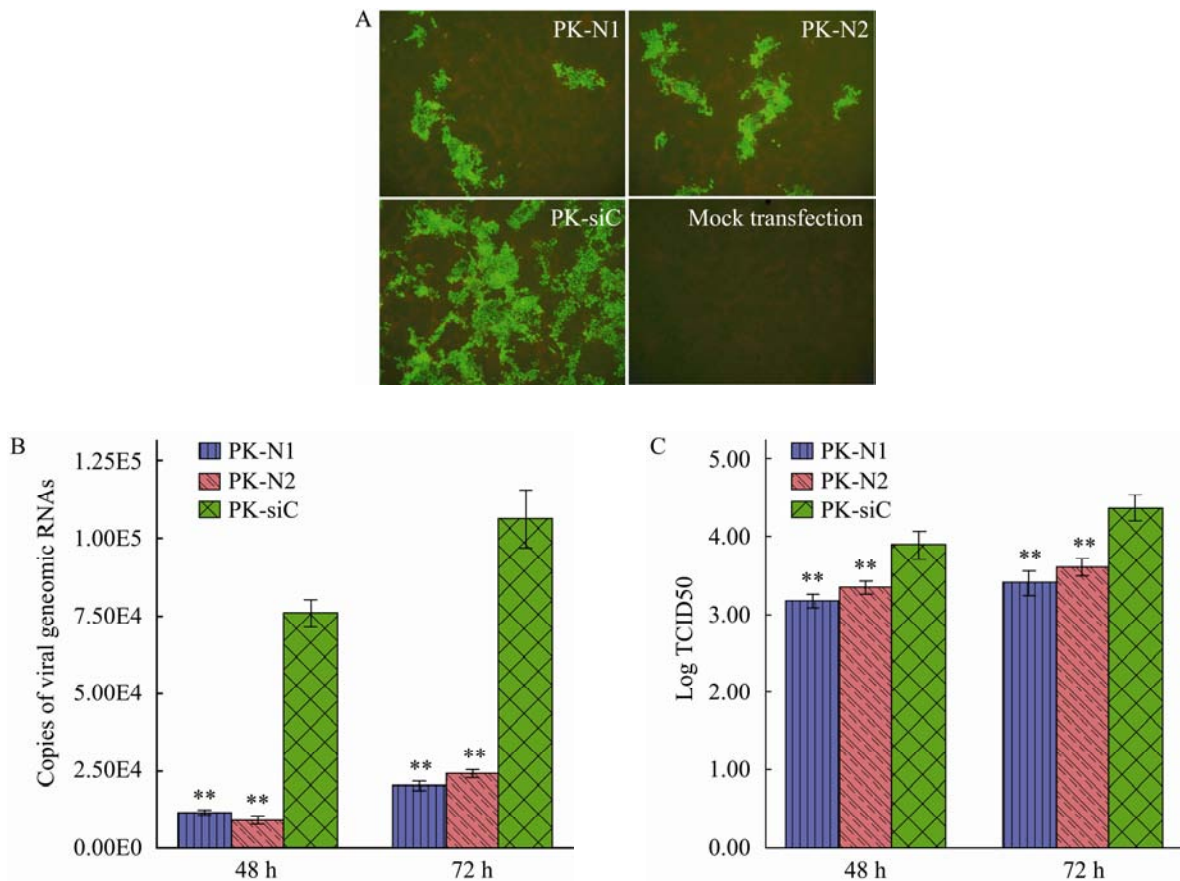


图 1 抗 CSFV PK-15 细胞克隆鉴定

Fig. 1 Identity results of anti-CSFV cell clones. (A) IFA results of PK-15 cell clones at 72 h after CSFV infection (40 $\times$ ). Mock transfection: stained with CSFV-negative serum. (B,C) Quantity of CSFV genomic RNAs and infectious CSFV production at 48 h and 72 h after CSFV infection. PK-siC: PK-15 cell clones expressing scrambled siN1. \*\*  $P < 0.01$ , very significant difference with PK-siC control.

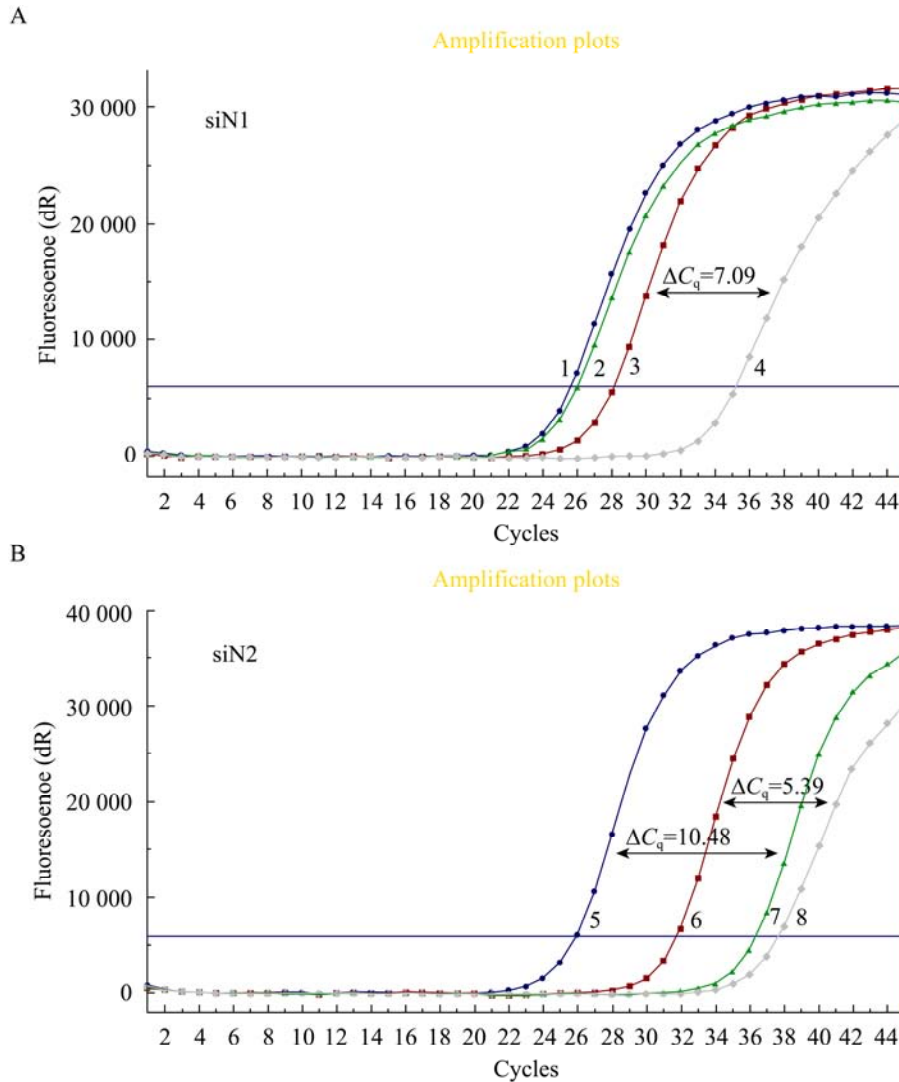


图 2 茎环引物的筛选结果

Fig. 2 Results of screening stem-loop primers. (A) 1, 3: PK-N1 RNA reverse transcribed with SLP-N1-8 ( $C_q=25.71$ ) and SLP-N1-6 ( $C_q=28.14$ ); 2, 4: PK-15 with SLP-N1-8 ( $C_q=26.03$ ) and SLP-N1-6 ( $C_q=35.23$ ). (B) 5, 6: PK-N2 RNA reverse transcribed with SLP-N2-8 ( $C_q=25.97$ ) and SLP-N2-6 ( $C_q=31.82$ ); 7, 8: PK-15 with SLP-N2-8 ( $C_q=36.45$ ) and SLP-N2-6 ( $C_q=37.75$ ).

## 2.4 标准曲线的绘制及灵敏度分析

以 ssiN1 为标准品绘制标准曲线, 结果如图 3 所示, 1~7 个梯度有很高的重复性, 并能与阴性对照相区分, 能检测 100 个拷贝的 siRNA; 检测线性范围宽, 可达 7 个数量级; 平行性好

( $R_{sq}=0.999$ ), 扩增效率高 (Eff.=98.2%); 可对目的 siRNA 进行定量分析。

## 2.5 PK-N1 和 PK-N2 细胞克隆的 siRNA 定量检测

以经抗 CSFV 鉴定的 PK-N1 和 PK-N2 细胞克隆各 3 个进行 siRNA 定量检测, 用  $2^{-\Delta C_q}$  法计

算目的 siRNA 相对于内参 ssc-miR16 的表达水平, 如表 2 所示, 结果表明阳性细胞克隆 PK-N1 和 PK-N2 均表达了目的 siRNA, 但每个克隆的 siRNA 表达水平不同, 最高为内参 ssc-miR16 的

5.54 倍, 最低的为 0.62 倍, 通过标准曲线计算其拷贝数在  $1.0 \times 10^4$  左右。产物经测序鉴定正确, 表明成功建立了可准确定量检测 siN1 和 siN2 的茎环法 RT-qPCR。

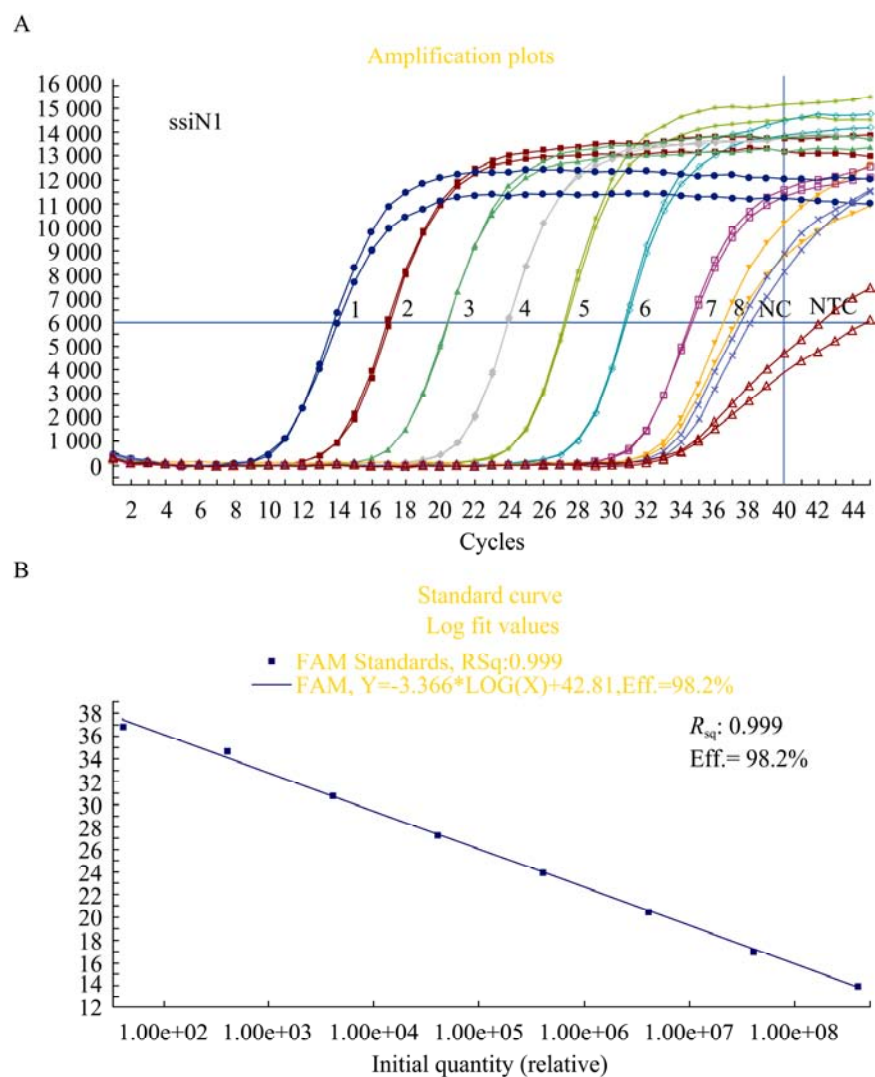


图 3 ssiN1 检测动态范围及灵敏度分析

Fig. 3 Dynamic range and sensitivity of the ssiN1 assay. (A) Amplification plot of ssiN1 over eight orders of magnitude. 1-8: ssiN1 input ranged from 10 to  $1.0 \times 10^8$  copies; NC: negative control; NTC: no template control. (B) Standard curve of the ssiN1.



表 2 阳性细胞克隆检测及特异性分析结果

Table 2 Results of positive cell clones and specificity analysis

	siN1	siN2	ssc-miR16	$2^{-\Delta C_q}$
PK-N1-1	26.61	36.23	28.50	3.70
PK-N1-2	28.27	35.78	27.86	0.75
PK-N1-3	27.51	36.56	27.13	0.77
PK-N2-1	35.12	26.67	25.98	0.62
PK-N2-2	36.10	27.45	28.48	2.04
PK-N2-3	35.67	25.13	27.60	5.54
PK-siC	36.16	35.98	26.56	
PK-15	35.58±0.38	36.38±0.34	27.45±0.28	
PFF	34.47±0.54	33.69±0.63	28.34±0.78	

### 3 讨论

目前, RNAi 已广泛地应用于抗病毒治疗研究, 一般通过测定细胞接毒后病毒基因组拷贝数 (Real time RT-PCR) 和蛋白表达水平 (IFA) 及成熟病毒粒子装配水平 (TCID<sub>50</sub>)<sup>[4,6]</sup> 来评价抗病毒效果, 但在某些情况下定量检测 siRNA 的表达水平是非常必要的。我们曾为确定 siRNA 四表达载体是否表达了每种 siRNA 而按 ter Brake 等<sup>[1]</sup> 的方法构建了 siRNA 靶基因和报告基因 GFP 融合表达的报告质粒, 与 siRNA 表达质粒共转染细胞, 可通过报告基因的表达来判断 siRNA 是否表达及其抑制效果<sup>[6]</sup>。但这种间接的方法应用范围窄, 仅能评价 siRNA 载体的有效性, 所以需要建立一种直接检测 siRNA 的方法, 以满足广泛的需要。

目前已有多种可用于检测 siRNA 的方法, 而选择最适的方法是本实验成败的关键。荧光定量 PCR 是基因表达定量分析的金标准, 尽管 siRNA 的短小对其提出了巨大挑战, 但仍有多种实时定

量方法被开发出来<sup>[9-16]</sup>, 这些方法兼具了实时定量 PCR 的高灵敏度、高特异性、准确定量及宽动态范围的实时监测等优点。而茎环法 RT-qPCR 因创新地设计了茎环引物, 其茎部的碱基堆积作用大大增加了 RNA-DNA 杂交双链的热稳定性, 另外, 茎环的空间限制作用使之比常规线性引物有更高的特异性, 并联合特异性 MGB 探针, 使其成为准确定量 siRNA 的最佳选择。

在茎环引物的筛选过程中, 我们发现对于 siN1 检测体系 (图 2A), 用 SLP-N1-8 逆转录阳性细胞 (25.71) 和阴性细胞对照 (26.03) 的  $C_q$  值基本相同, 可能是体系中上游引物与茎环引物产生杂交反应, 产生很高的假阳性信号, 是不合格的引物; 而 SLP-N2-6 有较低的背景信号 (35.23), 可有效区分阴阳性结果, 是较理想的逆转录引物。对于 siN2 检测体系 (图 2B), 无论 SLP-N2-6 还是 SLP-N2-8 的阴性细胞对照均有较低的背景信号, 但 SLP-N2-8 的阳性细胞 (25.97) 的  $C_q$  远小于 SLP-N2-6 (31.82), 而这种

信号不可能来自于较低的背景信号,所以说明 SLP-N2-8 有更高的逆转录效率,为较佳的逆转录引物。根据以上研究结果我们发现茎环引物的 3'端与 siRNA 配对的碱基个数对实验成败至关重要,配对 8 个可能会与上游引物重叠导致杂交反应,造成假阳性结果,而配对 6 个又可能会降低逆转录效率,所以本实验设计两种茎环引物,以实验来筛选效果最佳者,并引入  $\Delta C_q$  来进行量化评价,结果选择了 SLP-N1-6 和 SLP-N2-8 为最佳茎环引物。

因为 siRNA 和 miRNA 均为 21 nt 左右的 RNA 分子,所以 siRNA 的检测一般会受到细胞内源性数百种且表达量较高的 miRNA 的干扰。我们曾用 Shi 等<sup>[15]</sup>的 Poly (A) 加尾法 RT-qPCR 检测目的 siRNA,但其阴性细胞对照及水对照均有扩增曲线(数据未显示),可能是受 miRNA 的干扰所致,再加上引物二聚体与扩增产物的溶解曲线  $T_m$  大小相近,给阴阳性结果的分析判断带来极大困难。而 Cheng 等<sup>[17]</sup>报道了茎环法 RT-qPCR 也会产生非特异性曲线,他们设计的 107 个 siRNA 检测体系,在以 HeLa 细胞 RNA 为阴性对照时,绝大多数体系(101 个)  $C_q$  值大于 35,有 5 个  $C_q$  值在 30 至 35 之间,1 个  $C_q$  值小于 30,而阳性结果均小于 30,所以阴性细胞对照的  $C_q$  值大于 35 可说明体系有较低的非特异性扩增反应,不会影响目的 siRNA 的检测。为了探明细胞内数百种 miRNA 对我们所建立的 siN1\siN2 检测体系的影响,选择了具有独特 miRNAs 表达谱系的 PK-15 和 PFF 两种阴性细胞,结果 PK-15 细胞(见表 2)的  $C_q$  值均大于 35,而 PFF 细胞的  $C_q$  值均在 33 到 35 之间,说明了

细胞的 miRNAs 表达谱系会对检测有所影响,但这种影响又是微乎其微的(两种阴性细胞仅相差 1 到 2 个  $C_q$ ,而与阳性细胞相差 7 到 10 个  $C_q$ ),综上所述表明,我们所建立的检测 siN1 和 siN2 的茎环法 RT-qPCR 均有很高的检测特异性。

为了准确定量细胞 siRNA 的表达水平,曾应用 Promega 公司的 Riboprobe System-T7 系统体外转录的 siN1 分子为标准品,但因无法准确测定 siN1 拷贝数而选择了 ssiN1,并用 10 mg/L 的正常 PK-15 细胞总 RNA 为稀释液进行 10 倍梯度稀释,模拟细胞内的真实环境,充分考虑了细胞内源性 miRNA 的干扰,以达到准确定量 siRNA 的目的。

虽然筛选获得的抗 CSFV 细胞克隆均表达了目的 siRNA,但每个克隆的 siRNA 表达水平显著不同,这可能是由于外源基因随机地整合到受体细胞染色体的任意位置,产生了位置效应,也可能是随机整合了多个外源基因所致。

本研究建立的茎环法 RT-qPCR,可用于准确定量检测细胞抗病毒 siRNA 的表达水平,联合 IFA 等检测病毒水平的方法定量评价 RNAi 抗病毒的有效性。在抗猪瘟病毒转基因动物的构建过程中,此方法可用于筛选 siRNA 高效表达的供体细胞克隆,从而提高抗病毒转基因动物的成功率,并可应用于未来转基因动物的抗病毒效果的评价。另外,本方法对 siRNA、miRNA 等小 RNA 的检测工作具有很好的参考价值。

## REFERENCES

- [1] ter Brake O, 't Hooft K, Liu YP, et al. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and

- urable HIV-1 inhibition. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 557–564.
- [2] Wu CJ, Huang HW, Liu CY, et al. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res*, 2005, 65(1): 45–48.
- [3] Ruggli N, Bird BH, Liu LZ, et al.  $N^{pro}$  of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- $\alpha/\beta$  induction. *Virology*, 2005, 340(2): 265–276.
- [4] Xu XR, Guo HC, Xiao C, et al. *In vitro* inhibition of classical swine fever virus replication by siRNAs targeting  $N^{pro}$  and NS5B genes. *Antiviral Res*, 2008, 78(3): 188–193.
- [5] Li JN, Guo HC, Shi ZX, et al. *In vitro* inhibition of CSFV replication by retroviral vector-mediated RNA interference. *J Virol Methods*, 2010, 169(2): 316–321.
- [6] Li JN, Dai YJ, Liu S, et al. *In vitro* inhibition of CSFV replication by multiple siRNA expression. *Antiviral Res*, 2011, 91(2):209–216.
- [7] Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, et al. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by Northern blot. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(8): e60.
- [8] Várallyay É, Burgyán J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 2007, 43(2): 140–145.
- [9] Jiang M, Arzumanov AA, Gait MJ, et al. A bi-functional siRNA construct induces RNA interference and also primes PCR amplification for its own quantification. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): e151.
- [10] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*, 2005, 11(11): 1737–1744.
- [11] Ro S, Park C, Jin JL, et al. A PCR-based method for detection and quantification of small RNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(3): 756–763.
- [12] Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 2007, 3: 12.
- [13] Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, et al. miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC Mol Biol*, 2008, 9(1): 34.
- [14] Stratford S, Stec S, Jadhav V, et al. Examination of real-time polymerase chain reaction methods for the detection and quantification of modified siRNA. *Anal Biochem*, 2008, 379(1): 96–104.
- [15] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519–525.
- [16] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [17] Cheng AG, Li M, Liang Y, et al. Stem-loop RT-PCR quantification of siRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Oligonucleotides*, 2009, 19(2): 203–208.
- [18] Yu XH, Tu CC, Lu HW, et al. DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 2001, 19(11/12):1520–1525.
- [19] Tang FC, Hajkova P, Barton SC, et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): e9.