

siRNA 表达载体的构建

siRNA 表达载体构建可以：(1) 作为后基因组时代基因功能分析的有力工具；(2) 应用于基因组学、细胞信号传导通路分析；(3) 用于药物靶点筛选、疾病治疗。

实验方法原理:

多数的 siRNA 表达载体依赖三种 RNA 聚合酶 III 启动子(pol III)中的一种，操纵一段小的发夹 RNA(short hairpinRNA, shRNA)在哺乳动物细胞中的表达。这三类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子。之所以采用 RNA polIII 启动子是由于它可以在哺乳动物细胞中表达更多的小分子 RNA，而且它是通过添加一串（3 到 6 个）U 来终止转录的。要使用这类载体，需要订购 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链，退火，克隆到相应载体的 pol III 启动子下游。由于涉及到克隆，这个过程需要几周甚至数月的时间，同时也需要经过测序以保证克隆的序列是正确的。

实验材料:

目的基因

试剂、试剂盒:

LB 培养基

仪器、耗材:

离心管、离心机、水浴锅、漩涡振荡仪等

实验步骤:

一、目的基因的确定

1. 检索文献获取有实验证明有效的靶点序列（核对）。
2. NCBI 查阅：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。
3. 搜索引擎辅助：<http://www.google.cn/> or <http://scholar.google.com>。

二、设计 siRNA 靶序列

在制备 siRNA 前都需要单独设计 siRNA 序列.研究发现对哺乳动物细胞,最有效的 siRNAs 是 21-23 个碱基大小、3' 端有两个突出碱基的双链 RNA; 而对非哺乳动物,比较有效的是长片段 dsRNA。siRNA 的序列专一性要求非常严谨,与靶 mRNA 之间一个碱基错配都会显著削弱基因沉默的效果。

1. 选择 siRNA 靶位点

从转录 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。有研究结果显示 GC 含量在 30%-50%左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效。Tuschl 等建议在设计 siRNA 时不要针对 5'和 3'端的非编码区 (untranslated regions,UTRs),原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域,而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而影响 siRNA 的效果。

2. 序列同源性分析

将潜在的序列和相应的基因组数据库(人或者小鼠、大鼠等等)进行比较,排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列。例如使用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 选出合适的目标序列进行合成.并非所有符合条件的 siRNA 都一样有效,其原因还不清楚,可能是位置效应的结果,因此对于一个目的基因,一般要选择 3-5 个靶位点来设计 siRNA。

通常来说,每个目标序列设计 3-4 对 siRNAs,选择最有效的进行后续研究。

3. 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。

三、表达载体的选用

1. 化学合成与体外转录方法都是在体外得到 siRNA 后再导入细胞内，但是这两种方法主要有两方面无法克服的缺点：siRNA 进入细胞后容易被降解；进入细胞 siRNA 在细胞内的 RNAi 效应持续时间短。针对这种情况，出现了质粒、病毒类载体介导的 siRNA 体内表达。该方法的基本思路是：将 siRNA 对应的 DNA 双链模板序列克隆入载体的 RNA 聚合酶 III 的启动子后，这样就能在体内表达所需的 siRNA 分子。这种方法总体的优点在于不需要直接操作 RNA，能达到较长时间的基因沉默效果。
2. 通过质粒表达 siRNAs 大都是用 Pol III 启动子启动编码 shRNA(small hairpin RNA)的序列。选用 Pol III 启动子的原因在于这个启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA，遇到 4—5 个连续的 U 即终止，非常精确。当这种带有 Pol III 启动子和 shRNA 模板序列的质粒转染哺乳动物细胞时，这种能表达 siRNA 的质粒确实能够下调特定基因的表达，可抑制外源基因和内源基因。采用质粒的优点在于，通过 siRNA 表达质粒的选择标记，siRNA 载体能够更长时间地抑制目的基因表达。当然还有一点，那就是由于质粒可以复制扩增，相比起其它合成方法来说，这就能够显著降低制备 siRNA 的成本。
3. 带有抗生素标记的 siRNA 表达载体可用于长期抑制研究，通过抗性辅助筛选，该质粒可以在细胞中持续抑制靶基因的表达数星期甚至更久。同时 RNAi-Ready 表达载体还能与逆转录病毒和腺病毒表达系统整合 (BD Knockout RNAi Systems)，大大提高 siRNA 表达载体对宿主细胞的侵染性，彻底克服某些细胞转染效率低的障碍，是实现哺乳动物细胞 siRNAs 瞬时表达与稳定表达的理想工具。

四、合成模板

1. 合成编码 shRNA 的 DNA 模板的两条单链，模板链后面接有 RNA PolyIII 聚合酶转录中止位点，同时两端分别设计 BamH I 和 Hind III 酶切位点，可以克隆到 siRNA 载体多

克隆位点的 BamH I 和 Hind III 酶切位点之间。

2. 95°C, 5 min, 缓慢退火, DNA 单链得到 shRNA 的 DNA 双链模板。

五、连接与转化

1. 将 100 μ l 感受态细胞于冰上解冻。

2. 取 5 μ l 连接产物加入到感受态细胞中, 轻轻旋转几次以混匀内容物, 在冰上放置 30 分钟。

3. 将管放入预加温到 42°C 的水浴中, 热激 90 秒。快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 1~2 分钟。

4. 每管中加 700 μ l LB 培养基, 37°C 振荡培养 1 小时, 进行复苏。

5. 室温 4 000 rpm 离心 5 分钟, 弃去上清后, 用剩余 100 μ l 培养基重悬细胞并涂布到含抗性的 LB 琼脂平板表面。注意: 细胞用量应根据连接效率和感受态细胞的效率进行调整。

6. 将平板置于室温直至液体被吸收。

7. 倒置平皿, 于 37°C 培养, 12~16 小时后可出现菌落。

六、PCR 鉴定和测序鉴定

在插入编码 shRNA 的 DNA 双链模板两侧设计鉴定 PCR 引物, 扩增片段在 100-200bp 之间。

注意事项:

1. 从转录本 (mRNA) 的 AUG 起始密码开始, 寻找 “AA” 二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点。有研究结果显示 GC 含量在 30%—50% 左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效。

Tuschl 等建议在设计 siRNA 时不要针对 5' 和 3' 端的非编码区 (untranslated regions, UTRs), 原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域, 而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始

复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而影响 siRNA 的效果。

2. 将潜在的序列和相应的基因组数据库（人，或者小鼠，大鼠等等）进行比较，排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列。例如使用 BLAST（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）

3. 选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA，以找到最有效的 siRNA 序列。

4. 一个完整的 siRNA 实验应该有负对照，作为负对照的 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 序列打乱，同样要检查结果以保证它和其他基因没有同源性。

如果计划合成 siRNA，那么可以直接提供以 AA 打头的 21 个碱基序列，厂家会合成一对互补的序列。注意的是通常合成的 siRNA 是以 3' dTdT 结尾，如果要 UU 结尾的话通常要特别说明。有结果显示，UU 结尾和 dTdT 结尾的 siRNA 在效果上没有区别。因为这个突出端无需和靶序列互补。

其他：

一、siRNA 操作成功要点

1. 对每个基因设计并检测两到四个 siRNA 序列

为了找到潜在靶位点，扫描靶基因中的 AA 序列。记录每个 AA 3' 端 19 个核苷酸作为潜在 siRNA 靶位点。潜在靶位点需通过 GENBANK 数据库的 BLAST 分析，去除那些与其它基因明显同源的靶位点。如果可能，siRNA 应根据 mRNA 低二级结构的区域设计。

2. 选择低 GC 含量的 siRNA

Ambion 公司研究发现 GC 含量在 40-55% 的 siRNA 比 55% 以上的活性高。

3. 纯化体外转录 siRNA

在转染前要确认 siRNA 的大小和纯度。为得到高纯度的 siRNA，推荐用玻璃纤维结合，洗

脱(Ambion siRNA 体外合成试剂盒中已包括纯化柱保证 siRNA 纯度)或通过 15-20%丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸, 小的寡核苷酸, 蛋白和盐离子。注意: 化学合成的 RNA 通常需要跑胶电泳纯化(即 PAGE 胶纯化)。

4. 避免 RNA 酶污染

微量的 RNA 酶将导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNA 酶普遍存在, 如皮肤, 头发, 所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品...因此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。Ambion 公司在这方面有一整套的产品线, 如除 RNA 酶的喷剂, 拭纸及液剂, 检测和去除 RNA 酶。

5. 健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

通常, 健康的细胞转染效率较高。此外, 较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验, 推荐用 50 代以下的转染细胞, 否则细胞转染效率会随时间明显下降。

6. 避免适用抗生素

Ambion 公司推荐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。有些细胞和转染试剂在 siRNA 转染时需要无血清的条件。这种情况下, 可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验, 以得到最佳转染效果。QIAGEN 推出的专门针对 RNA 转染的试剂

7. 选择好的转染试剂转染 siRNA

针对靶细胞类型, 选择好的转染试剂和优化的操作对 siRNA 实验的成功至关重要。siRNA 实验要求选择适合转小的 RNA 的转染试剂(目前大多数转染试剂都针对转染比较大的质粒 DNA, 而非小的 RNA 分子, 宿主范围大小也不同)。Ambion 公司的 Silencer siRNA Transfection Kit, QIAGEN 的 Transmessenger Transfection Reagent 都是专门针对转 siRNA 优化的转染试剂, 是您的理想选择。

8. 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。Ambion 公司提供多种靶基因的阳性 siRNA。

9. 通过阴性对照 siRNA 排除非特异性影响

合适的阴性对照可通过打乱活性 siRNA 的核苷酸顺序设计而得。必须注意它要进行同源比较确保相对所要研究的生物的基因组没有同源性。

10. 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。