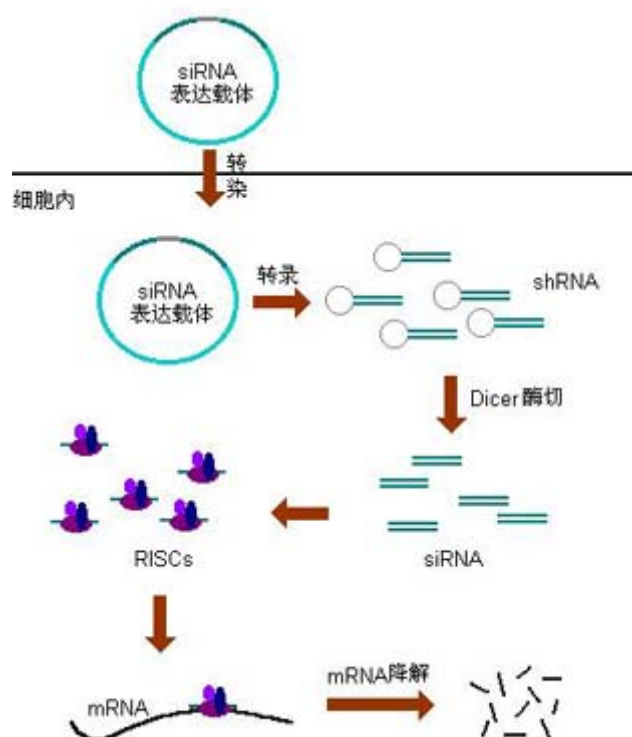


## 比昂生物 RNA 干扰技术服务简介

RNAi (RNA interference, RNA 干扰) 技术, 即将与内源 mRNA 编码区同源的小片段 (19 – 23bp) 外源双链 RNA (double stranded RNA) 导入细胞中, 通过一系列细胞内反应引发细胞中相应 mRNA 的降解, 从而导致特定基因表达沉默的一种技术。RNAi 的作用提供了一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段, 有助于研究该基因在生物模型系统中的作用, 是研究基因功能的重要工具, 并且逐步成为病毒性疾病、遗传性疾病以及肿瘤等的基因治疗研究的一种手段。

### 原理

对使用小型干扰 RNA (siRNA) 的各种方法进行了研究比较, 选择使用 siRNA 表达载体法构建载体。



### ■ siRNA 表达载体的构建技术服务

本公司提供构建好的 siRNA 表达载体, 可用于直接转染细胞进行 RNAi 操作。载体在真核细胞中可转录出 shRNA, shRNA 的环状结构被切除, 产生 siRNA, siRNA 的反义链在细胞内与特定蛋白质结合形成 RISCs (RNA-induced silencing complexes), 并且通过反义链与特异 mRNA 序列互补结合, 剪切 mRNA 导致 mRNA 降解, 从而在细胞内产生特定基因的沉默效果。此方法是多种 siRNA 制备方法中唯一可以进行长期基因沉默研究的方法。

比昂生物使用的 siRNA 表达载体具有以下优点：

### 1 长效性

siRNA 表达载体是一种双链 DNA 结构，与体外合成 siRNA 相比，更稳定、不易降解。其载体的保存和使用过程中，均是对 DNA 进行操作，操作过程简单方便，实验稳定性强。纯化后的表达载体可永久保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2 新霉素抗性标记 — 有助于载体富集

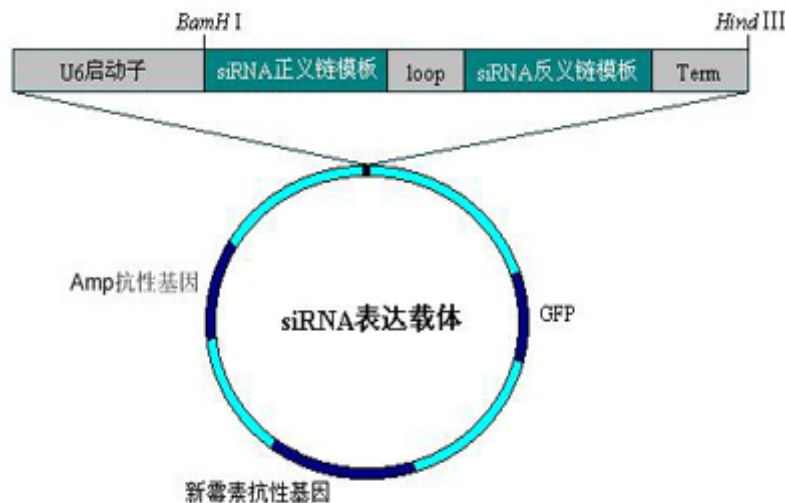
载体中加有新霉素抗性标记，载体转染细胞后加入含 G418 的培养基进行培养，未转染入载体的细胞因不具有新霉素抗性而死亡。由此可以快速筛选出载体成功转染的细胞，消除未转染细胞对研究基因表达沉默现象的影响，对于某些特殊的较难转染的细胞，使用带抗性标记的表达载体效果更好。因为，用这种载体进行转染有助于快速富集带载体的细胞；加强载体在细胞中表达 siRNA 抑制作用的长效性，抑制效果一般长达数周以上；并可以用来建立稳定表达 siRNA 长期基因沉默的细胞系。

### 3 GFP 绿色荧光标记 — 便于实时检测

载体上携带有 GFP 绿色荧光标记，在转染入细胞后，载体同时表达 GFP 蛋白。此蛋白是一种很好的活体分子标记物。其具有分子量小、对细胞无毒、使用方便及容易检测等优点，并且不需要任何外源底物或协同因子，在长波紫外光激发下可以发出性质稳定的荧光，便于实时检测表达载体的转染效率。可方便地对细胞的转染条件进行优化以提高载体的转染效率，增强 siRNA 的表达以及目的基因的基因沉默效果。

### 4 Amp 抗性基因 — 方便载体扩增

当需要大量的 siRNA 表达载体时，可以将载体质粒转化到大肠杆菌中（如 DH5 $\alpha$ ），在含有氨苄青霉素的培养基中培养，无限量扩增表达载体。

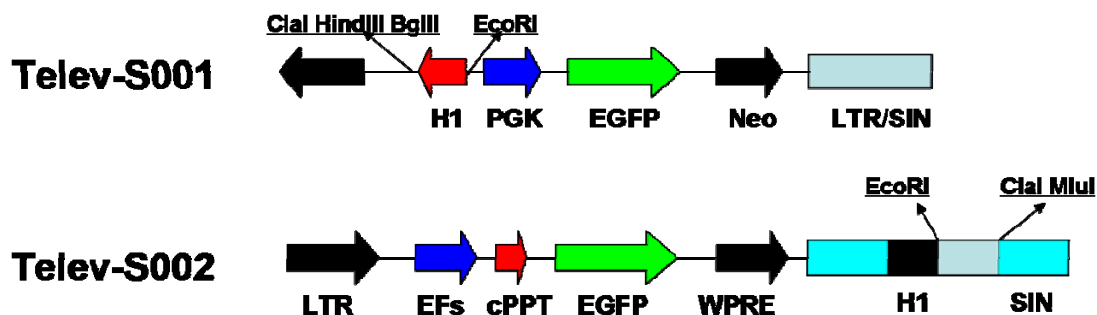


本公司提供 siRNA 载体的构建服务，siRNA 载体可以在细胞内直接转录出 shRNA，其干扰效果等同于 siRNA，而且能够解决 siRNA 干扰时间短的缺点。您只需提供需干扰基因的详细信息，包括基因的 mRNA 序列，Genbank Accession No. 和所属物种，本公司负责设计 3 条针对目的 mRNA 的 siRNA 靶序列，在短时间内构建三个可用于目的 mRNA 干扰实验的 siRNA 载体。可以为您节省大量的时间与精力。

## 比昂生物 siRNA 慢病毒载体构建服务程序：

### 1. siRNA 表达载体的选用：

本公司选用的 siRNA 慢病毒表达载体含 GFP 绿色荧光标记，可以建立稳定表达系，同时可以实时监测载体在细胞中的转染效率。载体中还含有 Amp 抗性基因，可以无限扩增。



### 2. 设计 siRNA 靶序列

- A、根据目的 mRNA 序列，设计 3 条 RNA 干扰靶序列，靶序列一般为 19 – 21nt 长。  
 B、对于每条选定的 siRNA 靶序列，设计 siRNA 正义链和反义链，以 loop(9nt) 相连，称为 shRNA ( short hairpin RNA )。

### 3. 合成模板：

合成每条编码 shRNA 的 DNA 模板的两条单链，退火 DNA 单链得到 shRNA 的 DNA 双链模板。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 Mlu1I 和 Cla1 酶切位点，可以克隆到 siRNA 慢病毒载体多克隆位点的 Mlu1I 和 Cla1 酶切位点之间。

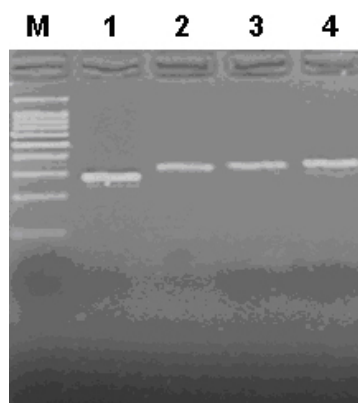
### 4. siRNA 空载体用 Mlu1I 和 Cla1 双酶切后，1 % 琼脂糖凝胶电泳，回收线性载体。

### 5. 连接与转化：

把退火的 DNA 模板双链连接到线性载体中。采用 T4 连接酶，插入片断与载体的摩尔比约为 3 : 1。连接产物转化 DH5  $\alpha$  大肠杆菌，在 LB Amp 培养基上涂板，37  $^{\circ}$ C 培养过夜。

### 6. PCR 鉴定：

挑取转化的菌落 PCR，2 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定具有 shRNA 编码序列的阳性克隆(图例)。



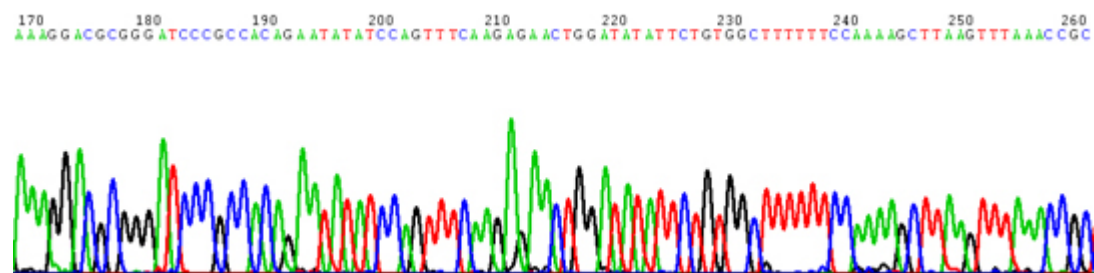
M : 100bp DNA Ladder

1 : siRNA 空载体为模板的 PCR 产物

2-4 : 阳性菌落作为模板的 PCR 产物

## 7. 测序鉴定:

对 PCR 鉴定阳性的克隆再进行测序鉴定, 确定 shRNA 编码框架和模板序列正确无误 (图例)。



## 8. 柱抽提阳性克隆载体并定量

### 9 shRNA慢病毒载体病毒颗粒的包装, 纯化

### 10 与阴性和阳性对照病毒分别感染目的细胞

### 11 Western检测靶点有效性

### 12 有效靶点的shRNA慢病毒载体的大量包装