

Code No. 3660–3662

研究用

Takara

pSINsi-hH1 DNA (Code No. 3660)

pSINsi-hU6 DNA (Code No. 3661)

pSINsi-mU6 DNA (Code No. 3662)

说明书

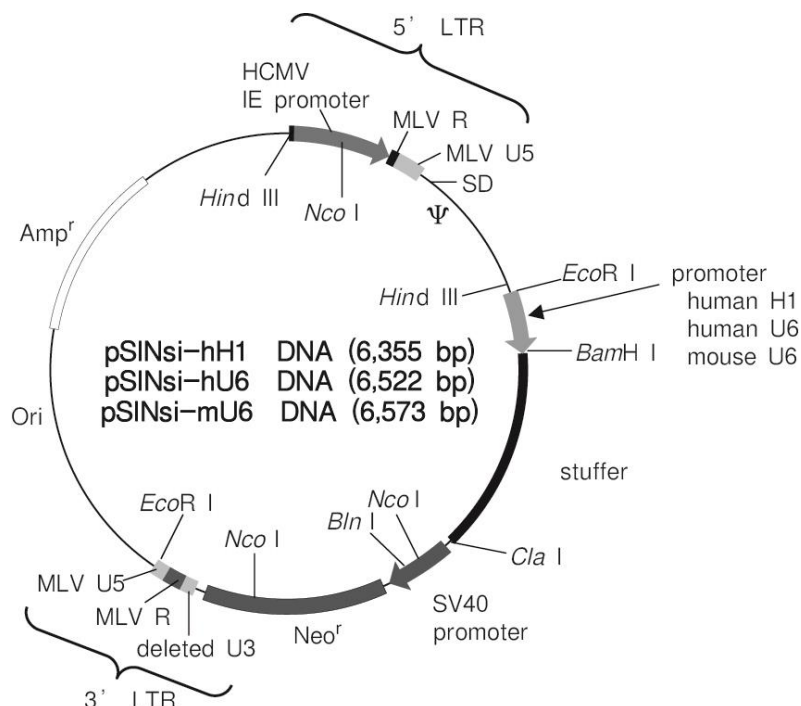
目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 保存	2
● 准备实验: Hairpin 型 RNA 表达用 DNA 的合成	2
● Hairpin 型 RNA 表达载体的构建	3
1. 器具和设备	3
2. 试剂准备	3
3. 双链 Oligo DNA 的制备	3
4. 载体的制备	3
5. 连接及转化	4
6. 插入片的确认	4
7. 质粒 DNA 的大量制备	4
● 逆转录病毒的制备	5
1. 器具和设备	5
2. 病毒制备	5
3. 病毒滴度的测定	6
● 逆转录病毒载体的基因导入实验	6
1. 器具和设备	6
2. 使用 RetroNectin® 进行操作	7
3. 使用 Polybrene 进行操作	7
4. 基因导入细胞的筛选	7
● 关联产品	8
● 参考文献	8

● 制品说明

RNA 干扰 (RNA interference; RNAi) 是基因表达抑制的一种方法。RNAi 是由于双链 RNA 的导入, 分解靶基因的 mRNA, 使其表达受到抑制的一种方法。在哺乳动物细胞中, 使用 21-23 个碱基的短的双链 RNA (short interfering RNA; siRNA) 获得的 RNAi 效果比较明显。RNAi 实验的主要技术有合成的 siRNA 直接导入细胞的方法和表达载体在细胞内表达 siRNA 的方法, 这两种方法应用比较普遍。合成的 siRNA 直接导入细胞的方法 RNAi 效果短暂; 用表达载体在细胞内表达 siRNA 的方法, 能够获得持续性的 RNAi 效果, 一旦获得了导入表达载体的细胞, 就有可能获得基因表达长期受抑制的效果。

因为逆转录病毒载体可以在感染细胞的染色体上稳定的重组目的基因, 所以使用载体转染方法获得长期稳定的 RNA 干扰作用是非常有效的。pSINsi 载体系列是以自我复制缺陷型逆转录病毒载体作为基本骨架, 使用 RNA polymerase III (pol III) 系列的 promoter 表达 hairpin 型 RNA。RNA polymerase III (pol III) 系列 promoter 下游的克隆位点插入表达 hairpin 型 RNA 的合成寡核苷酸 DNA, 就可以获得 siRNA 表达逆转录病毒载体, 以新霉素作为这种载体的抗性筛选基因(参见下图)。



载体序列上的 1,259 的位置(启动子的上游, *Hind* III 和 *Eco*R I 之间)有一个 *Cla* I 的酶切位点, 使用 *dam*⁺大肠杆菌制备的质粒, 受 *dam* methylase 影响, 1,259 位置上的 *Cla* I 位点不能切断。

使用 Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161) 将构建的 siRNA 逆转录病毒表达载体转染到 293 细胞或 293T 细胞中, 短时间内就能够得到 siRNA 重组逆转录病毒。

[注意]

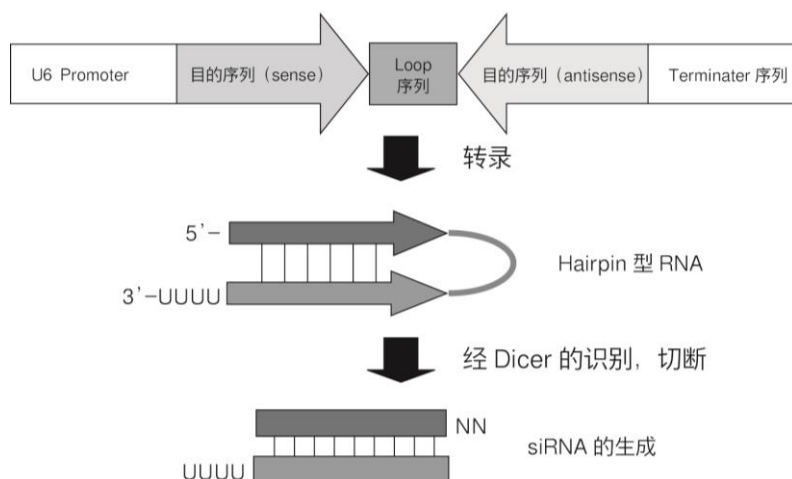
siRNA 逆转录病毒重组表达质粒构建的时候, 虽然使用抗性筛选获得稳定表达细胞株的方法不一定能得到高滴度的病毒液, 但是相对于瞬时转染方法, 还是建议使用细胞克隆株筛选方法。

siRNA 重组逆转录病毒可采用 Polybrene 法或 RetroNectin 法感染靶细胞, 血球系细胞使用 RetroNectin 法非常有效。

pSINsi Vector 系列的逆转录病毒载体的 3' LTR U3 区域的 promoter 活性缺失, 逆转录后被整合到染色体上的原病毒 5' LTR 的 promoter 活性消失, 所以原病毒由来的 mRNA 就不能转录了, 只有 pol III 类 promoter

启动的 hairpin 型 RNA 和 SV40 promoter 启动的新霉素抗性基因能够表达。表达的 hairpin 型 RNA 被细胞内的 Dicer 分解成 siRNA (参照下图)。

Hairpin 型 RNA 表达载体



pSINsi 载体系列有三种不同启动子的载体, 请根据目的细胞和实验目的选择不同载体。

pSINsi-hH1 DNA (Code No. 3660): 含有 human H1 promoter (Accession S68670)

pSINsi-hU6 DNA (Code No. 3661): 含有 human U6 promoter (Accession X07425)

pSINsi-mU6 DNA (Code No. 3662): 含有 mouse U6 promoter (Accession X06980)

各制品包装量为 20 μ g (500 ng/ μ l)。

贮存溶液 10 mM Tris-HCl, pH8.0

1 mM EDTA

● **保存:** -20°C (自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。)

● 准备实验

Hairpin 型 RNA 表达用 DNA 的合成

为了表达 hairpin 型 RNA, 在启动子的下游, 按以下顺序插入 DNA [连接用限制酶切位点序列] [目的序列 (正链)] [Loop 序列] [目的序列 (负链)] [终止子序列] [连接用限制酶切位点序列]。pSINsi 载体的克隆位点上游是 *Bam*H I 识别序列, 下游是 *Cla* I 识别序列。

请如下图所示合成 Oligo DNA (Top strand 和 bottom strand; N 代表目的序列)。因为 pol III 系列的启动子的转录起始位点是嘌呤碱基 (G 或 A) 比较好, 所以如果目的序列起始不是 G 或 A 的时候, 请在目的序列前加上 G 或 A。

推荐以下序列作为 Loop 序列: CTGTGAAGCCACAGATGGG (Boden *et al.*¹⁾); 也有使用如下序列: GTGTGCTGTCC (Miagishi *et al.*²⁾), 除此之外, Lee *et al.*³⁾、Paddison *et al.*⁴⁾、Paul *et al.*⁵⁾、Sui *et al.*⁶⁾ 也有使用不同的 hairpin 序列的报道。

Terminator 序列用的是 TTTTTT 序列 (连续的 4 个 T 对 pol III 系列启动子的转录有终止作用)。siRNA 序列和用于 hairpin loop 序列组合在一起的时候可能会出现连续 4 个 T 的情况, 设计合成 DNA 后要确认 Top strand 不要含有 4 个连续的 T。

转录起始点*

*Bam*H I ↓ target sequence (sense) Hairpin loop target sequence (antisense) Terminator *Cla* I

Top strand 5' -GATOC (G/A) NNNNNNNNNNNNNNNNNN CTGTGAAGCCACAGATGGG NNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T) TTTTTT AT-3'

Bottom strand 3' - G (C/T) NNNNNNNNNNNNNNNNNN GACACTCGGTGTCTACCC NNNNNNNNNNNNNNNNNN (G/A) AAAAAA TAGC-5'

*目的序列的第一个碱基不是 G 或 A 的时候需在目的序列前插入 G 或者 A。

RNAi 的效果依目的序列的不同有很大差异。请将您选择的序列用 BLAST 检索确认与其它基因不发生作用。负对照列举了使用目的序列经 Random shuffle 法进行筛选。筛选序列也需要进行 BLAST 检索，确认与其他基因不发生作用。

● Hairpin 型 RNA 表达载体的构建

1. 器具和设备

- 水浴槽 (或 PCR 仪)
- 培养箱
- 琼脂糖凝胶电泳装置

2. 试剂准备

- 10× annealing buffer: 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl
- 限制酶 *Bam*H I (Code No. 1010A)、*Cla* I (Code No. 1034A)、*Bln* I (*Avr* I I) (Code No. 1022A)
- PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (Code No. 5801A)
- DNA 片段回收用
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)等
- DNA Ligation Kit ver.1 (Code No. 6021) 、DNA Ligation Kit ver.2.1 (Code No. 6022)及 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)
- 感受态细胞:
E.coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052), *E.coli* DH5α Competent Cells (Code No. 9057),
E.coli HST08 Premium Competent Cells(Code No. 9128)等。(注意: 不能使用 *dam*⁻的菌株)
- LB Amp 平板 (Ampicillin 终浓度为 100 μg/ml)
- LB Amp 液体培养基 (Ampicillin 终浓度为 100 μg/ml)

3. 双链 Oligo DNA 的制备

(1) 合成互补的 Oligo DNA (Top strand 以及 Bottom strand), 用 1× annealing buffer 溶解, 终浓度为 20 pmol/μl。

(2) 用 PCR 仪 95°C 热处理 5 分钟, 用 30 分钟以上的时间缓慢降至 25°C。

4. 载体的制备

pSINsi Vector	2 μg (4 μl)
<i>Bam</i> H I	10 units
<i>Cla</i> I	10 units
10×K buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl

用灭菌水补足成 20 μl 的反应体系, 30°C 反应 1 小时后, 琼脂糖凝胶电泳, 切除 920 bp 左右的片段, 然后切胶回收载体片段 (hU6/mU6 Vector 约 5.6 kb、hH1 Vector 约 5.4 kb)。乙醇沉淀后, 使用 10-20 μl TE buffer 溶解。通常每个连接反应使用 1 μl。

* : DNA 片段回收建议使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 等。此外, agarose 建议使用 PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT 等高纯度试剂。

5. 连接及转化

A. DNA 溶液的制备

取 1 μl 的 4. 制备的载体, 加入 3 pmol 以上的双链寡核苷酸 DNA、然后加入 TE buffer 补足至 5 μl 。

B. 连接

[使用 DNA Ligation Kit Ver.1 做连接时]

- (1) 5 μl DNA 溶液中加入 20 μl 的 A 液, 混合均匀, 然后加入 5 μl 的 B 液, 混合均匀。
- (2) 16°C 反应 30 分钟。

[使用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 做连接时]

- (1) 5 μl DNA 溶液中加入 5 μl 的 Solution I, 混合均匀。
- (2) 16°C 反应 30 分钟。

[使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix>做连接时]

- (1) 5 μl DNA 溶液中加入 5 μl 的 Ligation Mix, 混合均匀。
- (2) 16°C 反应 30 分钟。

C. 转化

- (1) 10 μl 连接液转化到 100 μl 的感受态细胞中。
- (2) 于 LB Amp 平板上 37°C 培养 16 小时。

6. 插入片段的确认

- (1) 由 5-C 转化获得的克隆在 2-5 ml 的 LB Amp 液体培养基中 37°C 培养 16 小时, 提取质粒。
- (2) 使用 *Bam*H I、*Bln*I 双酶切约 500 ng 质粒 DNA。2% 琼脂糖凝胶电泳确认大小约 340 bp 的条带, 通常能够获得约 80-90% 含有合成寡核苷酸 DNA 的克隆子。
- (3) 如有必要, 使用测序引物 pSINsi Primer R1 以及 pSINsi Primer R2 确认碱基序列。

测序引物的部位如下图所示:



```
GATCTCGAAA CGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC  
CTAGAGCTTT GCGTACGTAG AGTTAATCAG TCGTTGGTCC ACACCTTTCA GGGTCCGAG GGGTCGTCCG
```

← [G TCGTTGGTCC ACACCTTTC] pSINsi Primer R1

```
AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCCGCC CCTAACTCCG CCCATCCCGC  
TCTTCATACG TTTTCGTACGT AGAGTTAATC ATCGTTGGT ATCAGGGCGG GGATTGAGGC GGGTAGGGCC
```

← [G TTTTCGTACGT AGAGTTAAT] pSINsi Primer R2

Hairpin 型 DNA 因为有三级结构, 解析比较困难, 最好使用 pSINsi Primer R1 以及 pSINsi Primer R2 分别进行序列解析, 相互比对确认 DNA 序列。

7. 质粒 DNA 的大量制备

因为质粒 DNA 经常用于转染到包装细胞中, 所以制备高纯度的 DNA 是必要的。pSINsi 载体是高拷贝质粒, 25-40 ml 的大肠杆菌培养液大约可以获得 100 μg 的质粒。得到的质粒经氯化铯密度梯度超离心或 NucleoBond Xtra Midi (Code No. 740410.10/.50/.100) 等纯化, 灭菌水无菌溶解至终浓度为 1 mg/ml。

● 逆转录病毒的制备

1. 器具和设备

- Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161)
- 用于制备逆转录病毒的 G3T-hi 细胞 (Code No. 6163)、293 细胞、293T 细胞等
- 明胶或者胶原蛋白包被平板
- 5 ml 聚苯乙烯圆底试管
- 培养基 (DMEM 4.5 g/L Glucose, with L-Glutamine)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- 灭菌水
- Penicillin-Streptomycin Mixture
- polybrene (Hexadimethrine bromide, Aldrich, 8 mg/ml 水溶液)
- 滴度测定细胞 (NIH/3T3 等)
- 电动移液器
- 0.45 μm 灭菌滤膜 (低吸附型)
- 带滤膜的枪头

2. 病毒制备

前一天

G3T-hi 细胞、293 细胞或 293T 细胞于 6 cm 培养皿中接种 3×10^6 Cells。

第一天(转染)

- (1) 溶解 Retrovirus Packaging Kit 中的载体(pGP、pE-eco/ampho)、氯喹、必要量的转染 Buffer。
- (2) 使转染 Buffer、灭菌水温度升至室温。
- (3) 于培养基中 (10% FBS/DMEM) 按 1/1000 添加试剂盒中的氯喹, 培养基于 37°C 预温。
- (4) 细胞生长密度达到 70%–80% 时, 更换 3 ml 氯喹培养基。
- (5) DNA 混合液的制备 (以下溶液于 5 ml 的聚苯乙烯圆底试管混合)。

pSINsi retrovirus vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 水溶液)	10 μl
pGP Vector	5 μl
pE-eco/ampho Vector	5 μl
2 M CaCl_2	62 μl
灭菌水	418 μl

- (6) 磷酸钙沉淀的制备以及转染

- 量取 500 μl transfection buffer (使用移液器)
- 缓慢的加到 (5) 的溶液中 (边加边振荡混合), 添加后, 立即使用移液器吸打混合 (10 到 20 秒)。
- 1 到 2 分钟内均匀的滴加到细胞培养皿中, 与培养基混合 (长时间放置有可能形成大的结晶, 尽量避免)。
- 37°C、5% CO_2 培养箱培养 (7–11 小时)。
- 显微镜下观察呈雪粒状, 这说明磷酸钙沉淀形成。
- (转染 7–11 小时后) 除去培养皿中的培养基 3 ml, 加入新的 10% FBS/DMEM 4 ml。

第二天 (转染 24 小时后)

更换培养基 (10% FBS/DMEM、4 ml)

第三天 (转染 48 小时后)

上清液用 0.45 μm PVDF 膜过滤, 获得病毒液。制备的病毒液可分装后 -80°C 保存, 避免反复冻融。使用 293T 细胞制备病毒时, 可以获得 10^5 – 10^6 cfu/ml 的病毒。

3. 病毒滴度的测定

(实验例)

前一天 NIH/3T3 细胞于 6 孔板中 5×10^4 cells/well 的密度接种。

第一天 (感染)

病毒储备液的溶解、稀释以及感染

(1) -80°C 保存的病毒液, 在 37°C 水浴中迅速溶解, 溶解后在冰上保存。

(2) 梯度稀释

使用含有 10% FBS 的 DMEM 将病毒液稀释 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍, 各稀释液 200 μl 以上备用。

(3) 用含有 8.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ polybrene 的 10% FBS 培养基, 900 μl /孔更换 NIH/3T3 细胞培养基。

(4) 取 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍稀释的病毒液各 100 μl 分别添加至各孔中并振荡混匀感染。

(病毒液的最终稀释浓度变为 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍, polybrene 的终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。)

(5) 感染 4 到 6 个小时后, 各孔中添加 1 ml 10% FBS 培养基。

第二天

(6) 感染 24 小时后, 用含有 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 10% FBS 培养基 2 ml/孔更换培养基。(更换培养基的时候注意保持水分。)

(7) 在此之后, 3-4 天更换一次 G418 培养基, 培养 9-12 天。

第 10-14 天 (克隆染色)

出现的细胞克隆用吉姆萨 (Giemsa) 或亚甲基蓝染色 (Methylene blue)。

[染色方法例: 亚甲基蓝染色]

准备:

- PBS
- 0.2% 亚甲基蓝/甲醇溶液

流程:

- 除去培养皿中的培养基, 每孔添加 1 ml PBS 清洗细胞、再除去 PBS。
- 在超净工作台内打开培养皿盖, 风干。
- 培养皿完全干燥后, 每孔加入 0.5 ml 的 0.2% 亚甲基蓝/甲醇溶液, 染色 10 分钟。
- 除去亚甲基蓝染色液, 水洗, 干燥。
- 计算蓝色克隆数, 选用 10-100 个克隆范围内的值乘以它的稀释倍数, 从而获得病毒滴度。

*也可以应用 Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (Code No. 6166), 通过 Real time RT-PCR 迅速测定滴度 (RNA titer)。

● 逆转录病毒载体的基因导入实验

1. 器具和设备

- CO_2 培养箱
- 生物安全柜
- 细胞观察显微镜
- 电动移液器
- 细胞培养用培养皿
- 带滤嘴的灭菌枪头

2. 使用 RetroNectin 进行操作

A. 试剂准备

· RetroNectin(Code No. T100A/B)以及 nontreatment type 培养容器、2% BSA/PBS 溶液、PBS 或 RetroNectin Dish (Code No. T110A)。

B. 准备工作 (用 RetroNectin Dish 的时候不需要)

Nontreatment type 培养容器经 RetroNectin 包被, 2% BSA/PBS 溶液封闭后, 用 PBS 或者 Hank's 缓冲液洗净 (详细信息请参阅 RetroNectin 制品说明书)。

C. 感染

(1) 在 RetroNectin 包被的平板上, 按 $125\text{--}250\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 量添加病毒液。然后在 32°C 或者 37°C CO_2 培养箱培养 3–5 小时。

[注意]

当病毒效价较低的时候, 或者希望得到高效率细胞导入的时候, 可以将病毒离心后与 RetroNectin 结合的方法。具体内容可以参考 RetroNectin 使用说明书。

(2) 回收增殖期的细胞, 用新鲜的增殖培养基, 按终浓度 $0.2\text{--}1 \times 10^5$ cells/ml 悬浮。

(3) 从感染前的 RetroNectin 平板上吸除病毒液, 用 PBS 清洗一次, 注意平板表面不要干燥。

(4) 洗净后立即在平板上添加细胞, 接种的密度根据细胞的大小、繁殖速度而不同, 一般的推荐量是 $0.5\text{--}2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。

3. 使用 Polybrene 进行操作

A. 试剂准备

Polybrene (8 mg/ml 水溶液)

B. 准备工作

感染的前一天在培养皿上接种细胞, 接种的密度根据细胞的大小、繁殖速度而不同, 一般的推荐量是 $0.5\text{--}2.5 \times 10^4$ cells/cm²。血球系的悬浮细胞使用 Polybrene 法基因导入的效率低, 所以推荐使用 RetroNectin 法。

C. 感染

(1) 按病毒液的 1/1000 量添加 Polybrene, 使病毒液的 Polybrene 浓度为 $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。注意: 病毒液使用原液滴度过高时, 可能会阻碍感染, 因此, 添加 Polybrene 前, 要用增殖培养基稀释 3–4 倍以后再使用。

(2) 从平板上吸除培养基, 迅速的添加含有 Polybrene 的病毒液 $125\text{--}250\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$, 在 CO_2 培养箱中培养。

(3) 培养 4–6 小时后, 加入一定量的增殖培养基稀释 Polybrene., 如果细胞株对 Polybrene 的敏感性较高, 需要更换新的增殖培养基。

4. 基因导入细胞的筛选

pSINsi Vector 是以新霉素抗性基因作为 Marker 基因, 因此, 可以用 G418 筛选细胞。G418 筛选一般在感染 24 小时以后开始。每隔 3–4 天更换 G418 培养基, 使用 RetroNectin 法感染贴壁细胞系的时候, 将细胞重新接种在培养皿上后再用 G418 筛选。G418 筛选开始后约两周时间之内可以得到能够稳定表达目的基因的细胞克隆。由于细胞株对 G418 的敏感性不同, 所以要进行 G418 的最适浓度筛选的预实验。

● 关联产品

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code No. 6160/6161)
Retrovirus 制备用 G3T-hi 细胞 (Code No. 6163)
Retrovirus Constructive System Eco/Ampho (Code No. 6164/6165)
RetroNectin[®] (Code No. T100A/B)
RetroNectin[®] Dish (Code No. T110A)
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (Code No. 6166)
PrimeGel™ Agarose LE 1–20K GAT (Code No. 5810A)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)
NucleoBond Xtra Midi (Code No. 740410.10/.50/.100)
DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (Code No. 6023)
E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)
E. coli DH5α Competent Cells (Code No. 9057)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)
*Bam*H I (Code No. 1010A)
Cla I (Code No. 1034A)
Bln I (Code No. 1022A)
pSINsi-DK I DNA Set (Code No. 3663)
pSINsi-DK II DNA Set (Code No. 3664)

● 参考文献

- 1) Boden *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 1154–1158.
- 2) Miyagishi *et al.* (2004) *J. Gene Med.* **6**, 715–723.
- 3) Lee *et al.* (2002) *Nat. Biotech.* **20**, 500–505
- 4) Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev.* **16**, 948–958
- 5) Paul *et al.* (2002) *Nat. Biotech.* **20**, 505–508
- 6) Sui *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5515–5520
- 7) Kawasaki H. *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 700–707.

RetroNectin is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

PrimeGel is a trademark of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201607Da