

## 金拓思 shRNA 表达载体使用说明书

### 质粒及菌液说明

1、金拓思生物所提供的过表达质粒为高纯度的 DNA 粉末制品，经过真空冷冻干燥的质粒是呈薄膜状或粉末状附在离心管中，请适当离心(10000r/min 10~15s)后小心开启，以免飞扬丢失。请根据实验需要的质粒浓度和质粒的总量加入适量的 ddH<sub>2</sub>O (通常建议储存液浓度 500ng~1μg/μL)，合上管盖充分震荡使其溶解后可用于细胞转染及其他分子生物学实验。粉末制品的 DNA 可长期保存 (建议最好不要超过 6 个月)，质粒溶解后建议在 -20℃ 的环境中存贮，避免多次冻融处理。

2、甘油菌液为含有重组质粒的菌液的过夜培养物与甘油的混合物，甘油的终浓度为 20%。客户收到甘油菌液建议即刻活化 (例如取 50~100μL 到 5mL 含有相应抗性(根据载体种类可以选择 25~50μg/mL 卡那霉素或 50~100μg/mL 氨苄霉素)的 LB 培养基过夜活化 (12~16h)，活化后的菌液与适量甘油混匀后于 -80℃ 保存。)

3、重组质粒测序峰值图文件结果请参见附件报告中的.abl 文件。测序序列文件参见与峰值图文件同名的.seq 文件。测序结果比对文件参考附件报告中的.sqd 文件，还可见同名的.pdf 文件。

### 干扰实验的设计

在使用载体法针对某一基因进行 RNA 干扰研究过程中，通常会遇到如下几个问题：实验对照的确立、细胞转染条件的确定、基因抑制效率的检测。

#### 1 实验对照的确立

在一个完善的 RNA 干扰实验设计中，必须考虑设立正确合理的实验对照组。通常，这些对照组包括空白细胞对照，阴性对照、阳性对照、转染试剂对照。阴性对照可以有两种，一种是采用通用的阴性对照组，在本试剂盒中包括了该对照所需的载体 (shNC) 可以表达与目的基因序列无同源性的 siRNA 片段；另一种是将目的 siRNA 的序列打乱后重新组合所得的阴性对照 (scrambled)。阳性对照组的设立对于 RNA 干扰研究是很有必要的，尤其对于第一次接触 RNA 干扰的用户而言。您可以利用阳性对照来确认 RNAi 实验中转染、RNA 提取和基因表达检测方法的可靠性。阳性对照通常采用已验证的对某些基因有效抑制的 siRNA 片段。本试剂中包括针对人 GAPDH 基因的表达载体 (shGAPDH) 该载体在导入细胞中后，可以有效抑制 GAPDH 基因的表达。

#### 2、细胞转染条件的确定

使用 DNA 载体转染细胞时，为了选择合适的转染方法和确定转染效率，通常采用报告基因来检测 DNA 的导入情况。最常用的报告基因是绿色荧光蛋白。我们公司提供的 shRNA 表达载体有一部分载体中包含绿色荧光蛋白的表达框架，转入细胞后可以表转染效率；如果您所订购的载体中不含绿色荧光蛋白的表达框架，您可以先使用可以表达绿色荧光蛋白的表达载体来

确定转染效率和转染条件，然后使用同样的条件来转染 shRNA 表达载体。

还用一种方法可以用于确定转染条件，就是采用阳性对照载体来转染细胞（如 shGAPDH）检测对照载体对基因的抑制效率，然后采用抑制效率较高时的转染条件来进一步转染 shRNA 表达载体。

### 3、基因抑制效率的检测

通常用两大类方法来检测 RNA 干扰对目的基因表达的抑制效率，一类方法是直接检测目的基因在不同水平如 mRNA 和蛋白水平的变化，具体的方法如 qPCR 和 Western 杂交等；另一类方法是通过检测目的基因的生物学效应和细胞效应来间接的反映目的基因的表达变化，这一类方法很多，不同的基因有不同的检测方法。通常在有效片段筛选过程中多选用 qRT-PCR 和 western 杂交等方法直接检测目的基因的变化情况，可以很直观地反映基因的真实情况，不过也有一部分研究人员通过检测细胞效应如细胞增殖速率等指标间接反映基因变化。

## RNA 干扰实验操作

由于在 RNA 干扰实验中有多种条件选择如试剂和细胞株等，在本实验操作中以 shNC 为阴性对照，shGAPDH 为阳性对照，Lipo2000 为转染试剂，Hela 细胞为实验细胞株，按照上述条件分步阐述 RNA 干扰实验的操作过程。如果用户使用不同的细胞株和转染试剂，可进行相应的调整。

### 转染条件的确定

**选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。DNA 的用量及其与转染试剂的比例可在推荐范围内适当调整**

1、转染前一天，接种  $0.4-1.0 \times 10^5$  细胞/孔至 24 孔板中，加入 500 $\mu$ l 含血清培养液，37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养至 40-70%融合。

2、在 50  $\mu$ l Opti-MEM 培养液或其它无血清培养液中加入 0.5-0.8 $\mu$ g DNA，混匀。

3、使用前轻轻混匀 Lipo2000 试剂，切忌离心处理。用 30 $\mu$ l 无血清的 DMEM 或 Opti-MEM，或其他无血清培养基) 稀释 1-4 $\mu$ l Lipo2000 试剂（可以分别设立 DNA/Lipo2000 的不同用量组，通常 DNA 和 Lipo2000 的用量在 1: 2-1: 5 范围内，针对不同的细胞需要不同的用量）轻轻混匀，室温放置 5 分钟。

4、将稀释好的 DNA 和 Lipo2000 试剂混合，定容到 100 $\mu$ l；轻柔混匀，室温放置 30 分钟，以便形成 DNA/Lipo2000 复合物。

5、将 100 $\mu$ l DNA/Lipo2000 复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中，来回轻柔摇晃细胞培养板板，使 DNA/Lipo2000 混合物均匀覆盖细胞。

6、细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 温育 24h-48h 后，进行转染后的其它检测步骤。如果细胞株比较敏感，孵育 4-6 小时后，除去复合物，更换培养基。

7、如果使用可以表达绿色荧光蛋白的 DNA 载体来检测细胞的转染效率，细胞转染后 24-48 h 后，使用荧光显微镜观察计数表达绿色荧光蛋白的细胞，在明场观察计数同一视野中的总细胞数，转染细胞率=荧光蛋白表达细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。或使用 DAPI 等染料染核

后，使用流式细胞仪进行计数，然后计算转染效率。

8、也可使用阳性对照的抑制率来标定转染效率。例如使用 shGAPDH 来抑制细胞内 GAPDH 基因的表达，如果转染效率较高，shGAPDH 对 GAPDH 基因的 mRNA 和蛋白水平的抑制率通常分别为 70-90%和 70-90%。反之，如果 shGAPDH 对 GAPDH 基因表现出较高的抑制率，也表明细胞的转染效率较高，可以满足进一步实验需要。

9、如果在转染条件摸索实验中没有找到较高效率的转染方法，请更换转染方法和试剂。如无其他方法选择，可以使用流式细胞仪将转染的细胞分选出来用于后续实验。如果无法分选细胞，可以在计算 RNA 干扰抑制效率时去除转染效率的影响，也可以使用抗生素对转染后的细胞进行初筛后再进一步检测抑制效率。或采用电转，病毒侵染等其他方法。

## 细胞的转染

- 1、设定合理的实验组，包括空白细胞对照，转染试剂对照 (mock transfection) 阴性对照 (negative control)、阳性对照 (positive control) 和目的基因实验组。
- 2、按照前面实验确定的细胞接种量接种。37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养至 40-70%融合。
- 3、按照前面实验确定的转染条件转染细胞。如果需要转染不同培养量的细胞。
- 4、转染后 24-48h 后，收集细胞进行下一步的检测工作。通常，目的基因在转染后 24-48h 内就会表现出表达抑制，但有一些蛋白比如稳定性较强、半衰期较长的蛋白在转染后含量降低比较缓慢，所以需要延长检测时间。可以考虑延长到 72-96h

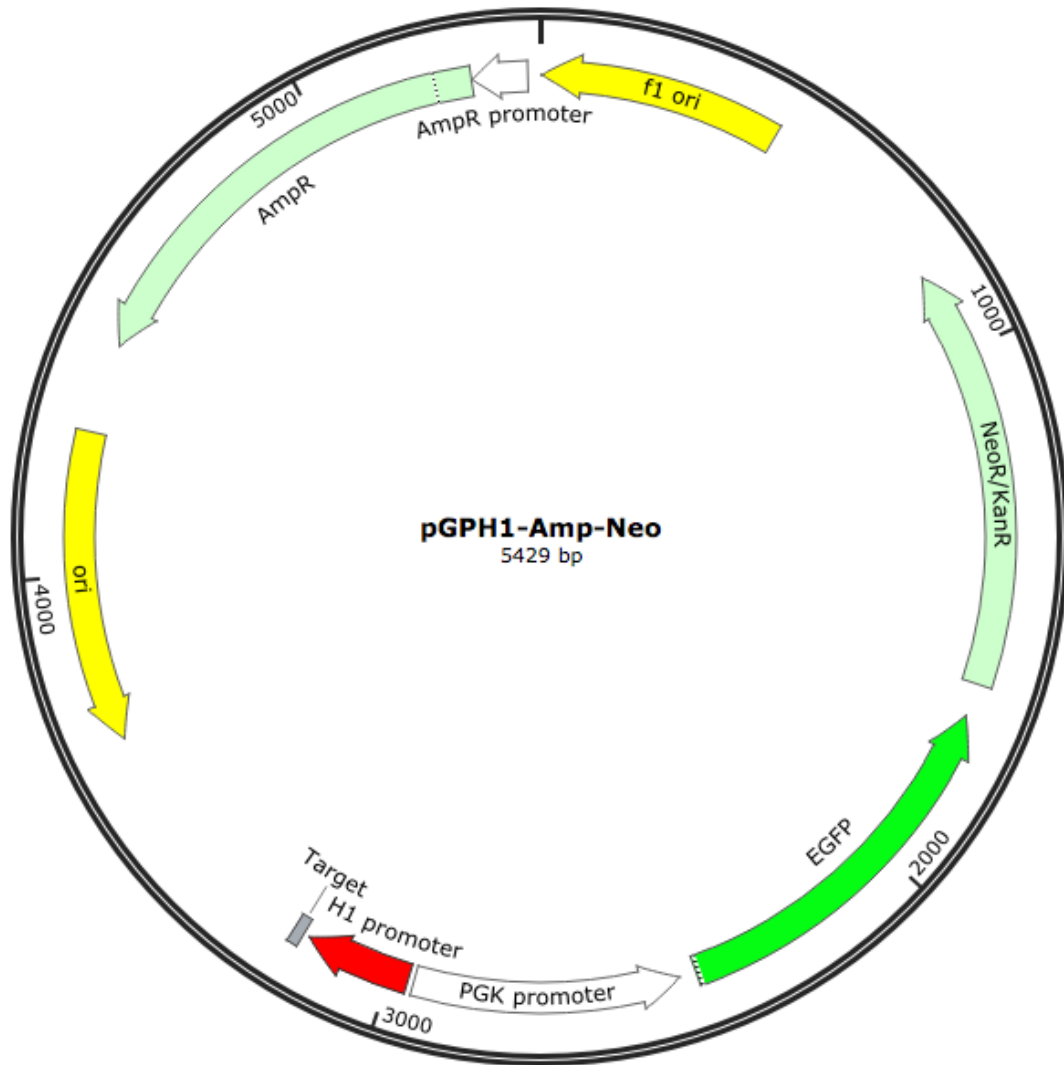
## 基因表达效率的检测

- 1、可以通过 qPCR 技术和 Western blot 方法检测目的基因 mRNA 和蛋白水平表达变化。
- 2、客户也可选用其他间接的方法（如目的基因的生物学功能或细胞生物学特性的变化）来检测目的基因的表达情况。鉴于这方面的检测手段多种多样，需要用户自己进行选择，在此不再赘述

## 常用 shRNA 载体

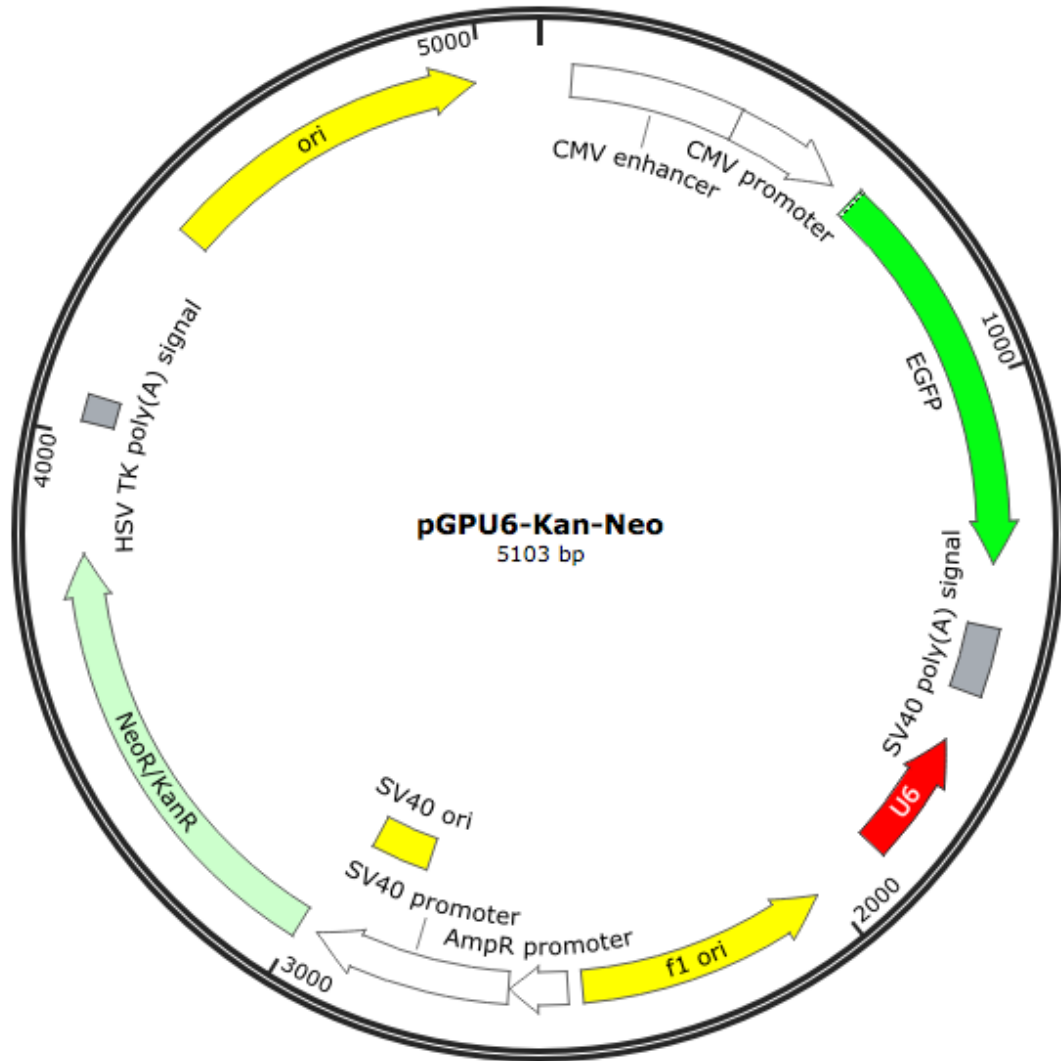
pGPH1-Amp-Neo

Created with SnapGene®



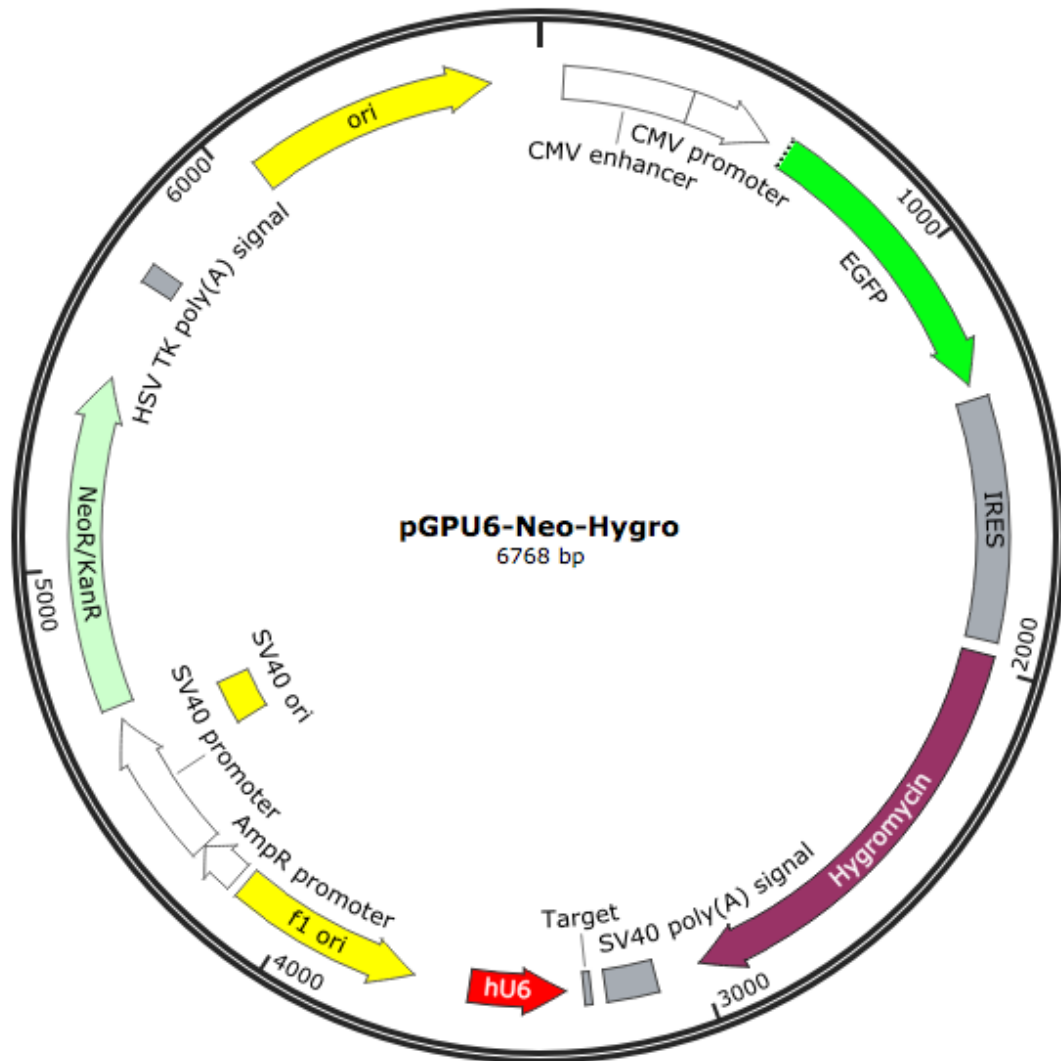
pGPU6-Kan-Neo

Created with SnapGene®



pGPU6-Neo-Hygro

Created with SnapGene®



pGPU6-Neo-Puro

