

GenePharma shRNA 表达载体使用说明

RNA 干扰实验设计

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：实验对照组的确立、细胞转染条件的确定、基因抑制效率的检测。

1、实验对照组的确立

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。本试剂盒中包括针对人 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。上海吉玛还向用户提供其他的阳性对照以资选择，详细情况请参见本公司的产品目录或《RNAi 产品使用手册》。

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。上海吉玛公司提供的 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

达绿色荧光蛋白，是用荧光显微镜或流式细胞仪可以很容易的确定转染效率；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，RNAi-Mate 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，可根据吉玛公司的《RNAi 产品使用手册》进行相应的调整。

1 转染条件的确定



NOTE

如果您选用可表达绿色荧光蛋白的 pGPU6/GFP/Neo 或 pGPH1/GFP/Neo 载体，可以直接用这些载体来确定转染效率；如果选用其他载体，可用其他表达绿色荧光蛋白的载体来确定转染条件，或使用阳性对照载体如 shGAPDH 来去确定转染条件。



IMPORTANT

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 μ l 含血清培养液，37°C 5% CO₂ 培养至 40-70% 融合。
- 2、在 50 μ l Opti-MEM I 培养液或其它无血清培养液中加入 0.5-0.8 μ g DNA，混匀。
- 3、使用前轻轻混匀 RNAi-Mate 试剂，切忌离心处理。用 30 μ l 无血清的 DMEM 或 Opti-MEM，或其他无血清培养基）稀释 1-4 μ g RNAi-Mate 试剂（可以分别设立 DNA/RNAi-Mate 的不同用量组，通常 DNA 和 RNAi-Mate 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 siRNA 和 RNAi-Mate 试剂混合，定容到 100 μ l；轻柔混匀，室温放置 30 分钟，以便形成 siRNA/RNAi-Mate（或 DNA/RNAi-Mate）复合物。
- 5、将 100 μ l DNA/RNAi-Mate 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，使 DNA/RNAi-Mate 混合物均匀覆盖细胞。
- 6、细胞在 CO₂ 培养箱中 37°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 50-90% 和 50-90%。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。

2 细胞的转染

- 1、设定合理的实验组，包括转染试剂对照（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% CO₂ 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，试剂的用量可以根据本公司《RNAi 产品使用手册》第 9 页和第 13 页所述进行相应的变化。
- 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。

3 基因抑制效率的检测

- 1、在本公司的《RNAi 产品使用手册》（14 页-19 页）中较详细地介绍了使用荧光定量 PCR 技术和 Western blot 方法检测目的基因表达变化的操作步骤和注意事项，用户可以酌情选用。
- 2、用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）来检测目的基因的抑制情况。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。