

Code No. 3220–3228

研究用

Takara

pBAsi DNA Series

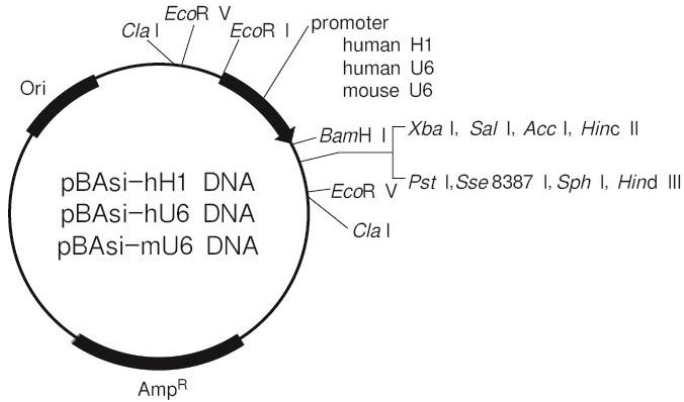
说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 准备实验: Hairpin 型 RNA 表达载体的构建	3
● 表达 hairpin 型 RNA 的合成 DNA 插入	3
1. 器具和设备	3
2. 试剂准备	3
3. Vector 及 insert (双链 oligo DNA) 的制备	3
4. 连接及转化	4
5. 插入片段的确认	4
6. 质粒 DNA 的大量制备	4
● 转染细胞	4
● siRNA 稳定表达细胞的建立	5
● 插入到 Adeno 病毒载体	5
● 实验例	5
● 参考文献	6
● 关联产品	6

● 制品说明

RNA 干扰 (RNA interference; RNAi) 是抑制基因表达的一种方法。RNAi 是由于导入双链 RNA 分解靶基因的 mRNA 使其表达受到抑制的一种方法, 对于哺乳动物细胞, 使用 21-23 个碱基的短小双链 RNA (short interfering RNA; siRNA) 可获得 RNAi 效果。但是, 经合成等手段制备的 siRNA 直接转入细胞时, RNAi 的效果短暂。此外, 细胞的导入效率有时也会出现。为解决上述问题, 开发了使用表达载体的方法。pBasi vector series 是利用 RNA polymerase III (pol III) 系列的 promoter 表达 siRNA 的质粒载体 (参照图 1-1, 图 1-2)。且该质粒搭载了新霉素抗性基因及嘌呤霉素抗性基因。可用于导入细胞的筛选。(参考 siRNA 稳定表达细胞的建立及实验例)



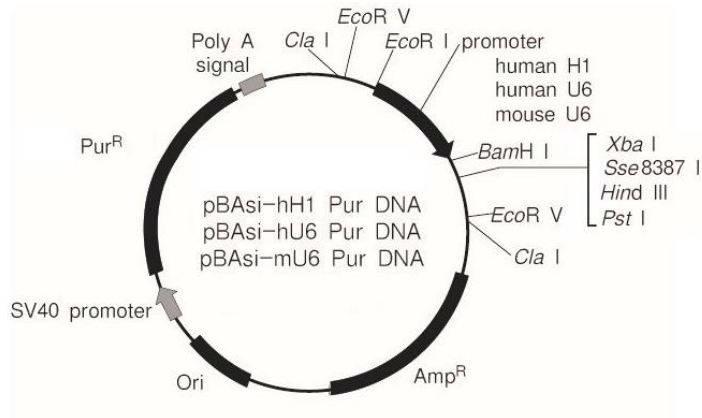
链长

pBasi-hH1 DNA: 2,790 bp

pBasi-hU6 DNA: 2,957 bp

pBasi-mU6 DNA: 3,008 bp

图 1-1. pBasi vector series 的酶切图谱

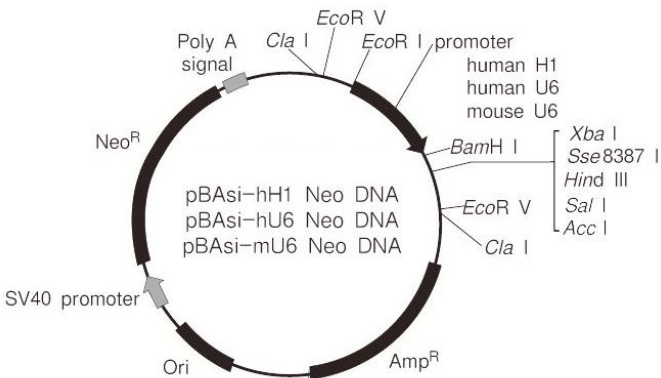


链长

pBasi-hH1 Pur DNA: 3,701 bp

pBasi-hU6 Pur DNA: 3,868 bp

pBasi-mU6 Pur DNA: 3,919 bp



链长

pBasi-hH1 Neo DNA: 3,896 bp

pBasi-hU6 Neo DNA: 3,996 bp

pBasi-mU6 Neo DNA: 4,114 bp

图 1-2. pBasi 载体系列的限制酶图谱 (含嘌呤霉素/新霉素抗性基因)

通过在 pol III 系列的 promoter 的下游插入表达 hairpin 型 RNA 的合成 DNA 序列可制备 siRNA 表达质粒。将得到的质粒转入细胞中，即可用于 RNAi 实验（参照图 2）。

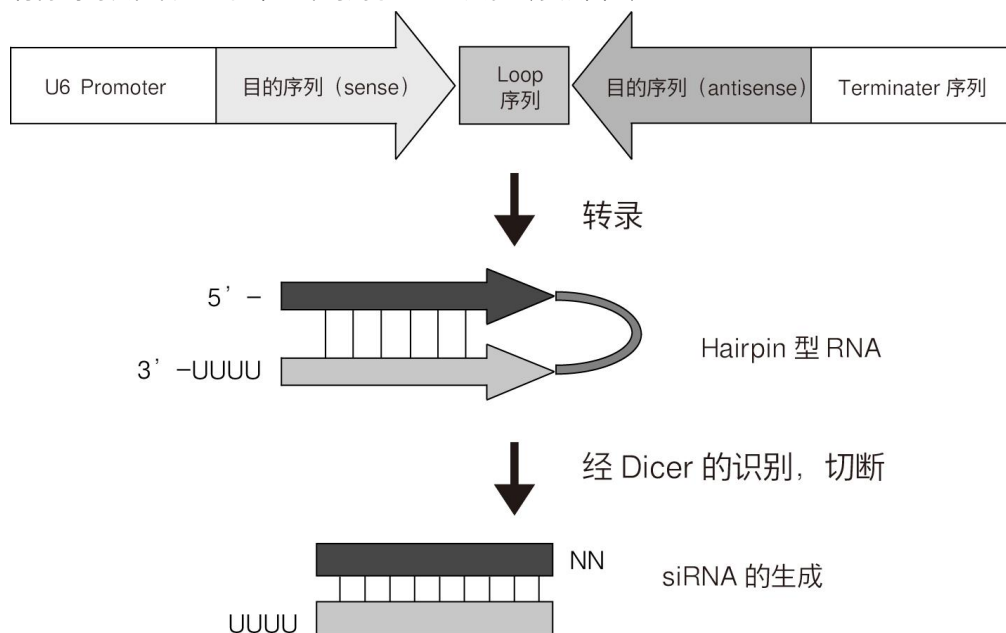


图 2 hairpin 型 RNA 表达生成 siRNA

此外，可以将 promoter+hairpin 型 RNA 序列切下来，重组到 Adeno 病毒载体上。由于 Adeno 病毒载体具有很高的感染效率和广泛的感染域，可通过 *in vivo* 或者 *in vitro* 实验导入基因。关于重组 Adeno 病毒的制备请使用 Adenovirus Dual Expression Kit (Code No. 6170)

pBAsi Vector Series 拥有 9 种不同 promoter 及抗性基因的质粒载体，请参照靶细胞、实验目的进行选择。

● 使用 human H1 promoter (Accession No. S68670);

pBAsi-hH1 DNA (Code No. 3220)

pBAsi-hH1 Pur DNA (Code No. 3223): 搭载有嘌呤霉素抗性基因

pBAsi-hH1 Neo DNA (Code No. 3226): 搭载有新霉素抗性基因

● 使用 human U6 promoter (Accession No. X07425);

pBAsi-hU6 DNA (Code No. 3221)

pBAsi-hU6 Pur DNA (Code No. 3224): 搭载嘌呤霉素抗性基因

pBAsi-hU6 Neo DNA (Code No. 3227): 搭载有新霉素抗性基因

● 使用 mouse U6 promoter (Accession No. X06980);

pBAsi-mU6 DNA (Code No. 3222)

pBAsi-mU6 Pur DNA (Code No. 3225): 搭载嘌呤霉素抗性基因

pBAsi-mU6 Neo DNA (Code No. 3228): 搭载有新霉素抗性基因

【各制品的包装量】 20 μ g (500 ng/ μ l)

【贮存溶液】 10 mM Tris-HCl, pH8.0

1 mM EDTA

● 准备实验： Hairpin 型 RNA 表达载体的构建

为了表达 hairpin 型 RNA, 按以下顺序设计合成 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], 并将其插入到启动子下游。

不含抗性基因的 pBAsi 系列载体, 上游可以使用 *Bam*H I 识别位点, 下游可以使用 *Xba*I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Sal*I、*Acc*I、*Hinc* II、*Pst*I、*Sph*I 其中任意一个识别位点, 含有嘌呤霉素抗性基因的 pBAsi 系列载体可以使用 *Xba*I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Pst*I, 含有新霉素抗性基因的 pBAsi 系列载体可以使用 *Xba*I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Sal*I、*Acc*I。

例如, 插入到 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点时, 按下图制备合成 oligo DNA (Top strand 与 Bottom strand 两条链; N 代表靶序列)。由于 pol III 系列 promoter 的复制起始点是嘌呤碱基 (G 或 A) 较好, 当靶序列不是以 G 或者 A 起始时需在靶序列的前面插入 G 或者 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 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 序列依据组合在一起使用的 hairpin loop 序列的不同可能会出现四个以上连续的 T 的情况, 因此合成 DNA 设计好后一定要确保 Top strand 上没有出现 4 个以上连续的 T。

转录起始点*				
	<i>Bam</i> H I ↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator <i>Hind</i> III
Top strand 5'	-GATCC (G/A) NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T)	TTTTTT A-3'
Bottom strand 3'	-G (C/T) NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTGGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN (G/A)	AAAAA TTOGA-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 的效果受靶序列的影响很大。使用自行设计的序列时, 请将您选择的序列用 BLAST 检索确认与其它基因不发生作用。

● 表达 hairpin 型 RNA 的合成 DNA 插入

1. 器具和设备

- 水浴槽 (或 PCR 仪)
- 培养箱
- 琼脂糖凝胶电泳装置: Mupid-2plus (Code No. M-2P) 等

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)、*Hind* III (Code No. 1060A)
- DNA Ligation Kit <Mighty Mix>, ver.1 或 ver.2.1 (Code No. 6023/6021/6022)
- 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。
- 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. Vector 及 Insert(双链 oligo DNA)的制备

3.1 双链 oligo DNA 的制备

- (1) 合成的互补 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。

3.2 载体的制备

pBAsi Vector	2 μ g (4 μ l)
<i>Bam</i> H I	10 units
<i>Hind</i> III	10 units
10 \times K buffer	2 μ l
灭菌水	up to 20 μ l

37°C反应 1 小时后，进行乙醇沉淀，使用 10–20 μ l TE buffer 溶解。通常每个连接反应使用 1 μ l。由于作为 insert 使用的双链 oligo DNA 的摩尔浓度高，通常即使不通过切胶回收去除小片段，也可以获得目的克隆。

4. 连接及转化

4.1 DNA 溶液的制备

在 1 μ l vector 中加入 3 pmol 以上退火的双链寡核苷酸 DNA、加入 TE buffer 补足至 5 μ l。

4.2 连接

使用 DNA Ligation Kit (Mighty Mix) 做连接时

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

使用 DNA Ligation Kit Ver.1 做连接时

- (1) 5 μ l DNA 溶液中加入 20 μ l A 液混匀，然后加入 5 μ l 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 μ l DNA 溶液中加入 5 μ l Solution I 混和均匀。
- (2) 16°C反应 30 分钟。

4.3. 转化

- (1) 10 μ l 连接液加入到 100 μ l 的感受态细胞中，转化。
- (2) 涂布 LB Amp 平板，将平板 37°C培养 16 小时。

5. Insert 的确认

- (1) 由 4.3 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、*Hind* III 双酶切 500 ng 质粒 DNA。2%琼脂糖凝胶电泳确认 60 bp 的条带，通常得到的克隆子约 90%含有合成的 oligo DNA 插入。必要的情况下可使用 M13 Primer M4 或 RV 确认碱基序列。注意，含有嘌呤霉素及新霉素抗性基因的载体(Code No. 3223–3228) 不能使用 M13 Primer RV。

6. 质粒 DNA 的大量制备

质粒 DNA 转染细胞时，需要纯化为高纯度的 DNA。pBAsi 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 μ g 的质粒。质粒用氯化铯密度梯度超离心或 NucleoBond Xtra Midi(Code No. 740410.10/.50/.100)等纯化，乙醇沉淀后，灭菌水溶解，终浓度为 1 mg/ml。

● 转染细胞

使用 Trans IT series (Trans IT–X2、Trans IT–2020、Trans IT–LT1、Trans IT–293 等) 或 Xfect™ Transfection Reagent (Code No. 631317/631318) 等导入动物细胞的基因导入试剂，将操作 6. 制备的 siRNA 表达用 pBAsi Vector 导入细胞。

※ 操作顺序请参考各试剂的操作说明书。

● siRNA 稳定表达细胞的建立

瞬时转染细胞选择嘌呤霉素抗性基因及新霉素抗性基因作为选择性标记，通过克隆长期稳定表达菌株，可能获得稳定knock down细胞。

(1) 按上述转染细胞步骤将siRNA表达用pBAsi Vector导入目的细胞、在不含筛选药物的培养基中培养24~48 小时。

(2) 准备含药物的培养基。以嘌呤霉素抗性基因为筛选标记的时候，培养基中添加1~10 $\mu\text{g/ml}$ 的嘌呤霉素，以新霉素抗性基因为筛选标记的时候，使用含有400~1,000 $\mu\text{g/ml}$ G418 的培养基。最适药物浓度因细胞及培养条件的不同而不同，建议做预实验研讨。

(3) 一经转染的细胞剥离后，以细胞数变为原来的1/10、1/30、1/90、1/270、1/810 各传代2、3个，在含有药物的培养基中培养。

(4) 必要时每3~4天更换含有药物的培养基培养2周，筛选药物抗性克隆。

(5) 选择克隆不相接的plate，经克隆操作将药物抗性克隆转移到24孔板（20个克隆左右）。

(6) 使用汇合细胞进行扩大培养、制备细胞冻结库存同时制备RNAi效果确认用sample。

(7) 确认各克隆的RNAi效果，进行克隆筛选之后的实验。

※ 耐药性细胞不一定是siRNA表达细胞，因此必须进行RNAi效果确认选择克隆。

● 插入到 Adeno 病毒载体

由于Adeno病毒载体容易获得高滴度（ $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml）病毒，可广泛感染细胞，*in vitro*及*in vivo*均可使用，因此作为siRNA delivery system也很有用。经pBAsi构造的siRNA表达质粒可经EcoR V（平滑末端）或Cla I切断获得「Pol III promoter + hairpin型RNA序列」重组到Adeno病毒载体上。制备重组Adeno病毒请使用Adenovirus Dual Expression Kit (Code No. 6170)。

● 实验例

质粒转入细胞的方法有很多，但是不管哪种方法转入效率都不可能是100%。以检测靶细胞mRNA定量knock down的效果为例，由于转入效率低及未转入细胞的影响，想要检出knock down的效果很困难。

以下所举例子显示，只通过使用药物对转化后的转入细胞进行筛选能明确检出knock down的效果。

【方法】

(1) 在pBAsi-hU6-Neo DNA上插入合成oligo，构建以人GAPDH为靶基因的表达siRNA的质粒（pBAsiGAPDH-Neo）。

(2) 实验前一天在平板中准备A549细胞，使基因导入时细胞汇合率达40~70%。

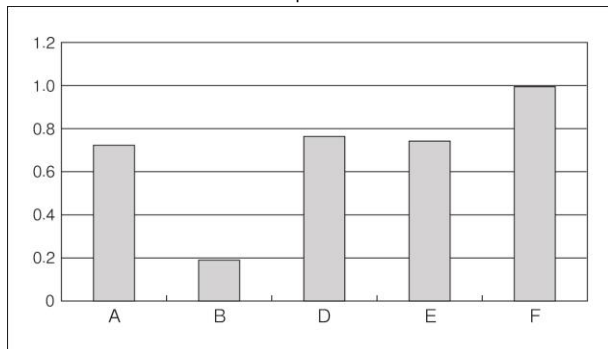
(3) 使用基因导入试剂Trans IT-LT1 经标准操作方法导入质粒。以未插入合成oligo的空载体为对照。此时的导入效率约为40%。

(4) 次日将细胞10倍稀释后接种到含有1,000 $\mu\text{g/ml}$ G418的培养基以及不含G418的培养基进行培养。

(5) 4日后提取各自的total RNA，经Real Time PCR对GAPDH mRNA进行定量。

【结果】

GAPDH mRNA的值是使用 β -actin mRNA的值进行标准化的相对值。



Sample#	导入质粒	Neo添加
A	pBAsi-hU6-Neo	有
B	pBAsiGAPDH-Neo	有
C*	No Plasmid	有
D	pBAsi-hU6-Neo	无
E	pBAsiGAPDH-Neo	无
F	No Plasmid	无

*：细胞已死亡。

【考察】

未进行药物筛选时 (E)，由于未导入细胞的影响不能检出knock down的效果，然而使用药物筛选时 (B)，knock down效果可以明确的检出。

注意：药物浓度、未导入细胞死亡所需天数因细胞不同而不同。请做预实验研讨最适反应条件。

● 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.
- 8) Tuschl T. *et al.* (2003) *Nat Biotech.* **20**: 446–44.
- 9) Shen C. *et al.* (2003) *FEBS Lett.* **537**: 111–114.

● 关联产品

Adenovirus Dual Expression Kit (Code No. 6170)
 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)

感受态细胞：

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)
E. coli DH5 α Competent Cells (Code No. 9057)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)

限制酶：

*Bam*H I (Code No. 1010A/B)
Xba I (Code No. 1093A/B)
Sal I (Code No. 1080A/B)
Acc I (Code No. 1001A/B)
Hinc II (*Hind* II) (Code No. 1059A/B)
Pst I (Code No. 1073A/B)
*Sse*8387 I (Code No. 1183A/B)

Sph I (Code No. 1246A/B)

Hind III (Code No. 1060A/B)

*Eco*R V (Code No. 1042A/B)

Cla I (Code No. 1034A/B)

Mupid-2plus (Code No. M-2P)

Trans IT Series:

Trans IT-X2 Dynamic Delivery System (Code No. MIR6000/MIR6003 ~ MIR6006)

Trans IT-2020 Transfection Reagent (Code No. MIR5400/MIR5404 ~ MIR5406)

Trans IT-LT1 Transfection Reagent (Code No. MIR2300/MIR2304 ~ MIR2306)

Trans IT-293 Transfection Reagent (Code No. MIR2700/MIR2704 ~ MIR2706) 等

Xfect™ Transfection Reagent (Code No. 631317/631318)

M13 Primer M4 (Code No. 3832A/B)

M13 Primer RV (Code No. 3830A/B)

NucleoBond Xtra Midi (Code No. 740410.10/.50/.100)

Xfect is a trademark of Takara Bio USA, 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.takarabio.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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202107Da