

短发卡 RNA 所介导的基因表达下调

我们所用的载体是 Plk0.1-puro，包装质粒是 PMD2.G 和 PSPAX2。

- (1) 用 AgeI 和 EcoRI 进行模板的双酶切（一般用 3 μg 模板，50 μL 反应体系，两种酶各用 0.5 μL ，酶切时间为 3 h），用 1%的胶进行电泳时是均一的一条带，然后进行割胶回收，测完浓度以后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。
- (2) 设计 shRNA 序列：序列的主要来源有 Sigma 和自己设计两种，如果是从 Sigma 官网上面直接获取，只需把序列直接 down 下来，然后自己根据已知序列设计反向互补序列以后就可以了。如果是自己设计，需要从 siRNA designer 网站上面进行设计，注意一些规则（以前都是文老师设计），这两种方法所获取的发卡序列都是 21 bp，所以总长度是 58 bp，设计好以后就可以发给公司进行合成。
- (3) 拿到序列以后将引物进行溶解，浓度为 50 ng/ μL ，然后进行退火，打开水浴锅，加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ ，正向和反向引物各取 20 μL ，混匀以后置于水浴锅中 5 min，然后关掉电源，让其自主降温至室温即可，取出退火产物以后稍微离心，然后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。
- (4) 做克隆：取第一步准备的模板 25 ng 左右，取第三步准备的插入片段 1 μL ，T4 DNA ligase 0.5 μL ，10 μL 连接体系，22 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，然后用 GBE180 感受态细胞，按照标准的转化 protocol 做转化，14 h 后挑克隆鉴定。
- (5) 克隆鉴定：当质粒小抽完以后，用 AgeI 进行酶切鉴定（在设计引物的时候 AgeI 酶切位点破坏了，如果连上了不能够进行酶切），如果在电泳图中发现酶切前和酶切后的质粒完全一样，即没有酶切开，那表明这一个克隆已经连接上 shRNA 序列，即克隆成功，然后进行中抽，中抽完以后进行测序。如果测序正确，就可以进行质粒的无菌处理了。同时也应该准备包装质粒。
- (6) 当 Plk0.1-puro-shRNA、PMD2.G、PSPAX2 三个质粒都准备好以后就可以包病毒了，提前一天准备 293T 细胞（一般前一天下午 5 点左右），如果选择六孔板包病毒，每一个孔铺 1.5×10^6 个细胞（一定要提前半小时铺 0.1%明胶），包装体系如下：

质粒：1.0 μg
PSPAX2：0.75 μg
PMD2.G：0.25 μg
Opti-MEM：200 μL
Lipo2000&Fugene：3 μL

24 h 后换液，48 h 收集病毒（病毒用 0.45 μm 滤膜过滤）。

- (7) 按照标准的 protocol 进行病毒滴定的测定，当滴度确定好以后，就可以去感染目的细胞了。
- (8) 病毒在使用前是放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的，因此感染细胞的时候应该置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中 5 min，病毒的数量和目的细胞的数量比例为 5:1~10:1（与目的细胞的种类有关，400 μL 对应 1 个 6 孔板的孔；1 mL 对应 1 个 T25。）。
- (9) 24 h 后更换含有 Puromycin 的培养基，浓度为 2~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （与目的细胞的种类有关），当细胞长满以后，取一部分细胞做 Q-PCR 测定 knock down 的效率，另外的细胞进行传代，等下一代细胞长满以后就可以做 Western Blotting 来检测蛋白水平的表达变化。
- (10) 如果两个层次的 knock down 效率都很高，可以选择冻存一部分细胞，以便后边的实验使用，其余的细胞就可以来做自己想做的实验了。

注：shRNA 病毒感染后 36 h，Hela 细胞不能看到 GFP 的荧光。在 60 h 后可以观察到明显的荧光，荧光不强，不过感染效率很高，荧光细胞率占了 80%以上。