

中文说明书

T7 RiboMAX™ Express RNAi System

适用产品目录号：
P1700



T7 RiboMAX™ Express RNAi System

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的中文说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱：chinatechserv@promega.com

1. 产品描述.....	2
2. 产品组分和储存条件	6
3. 产生更长的双链 RNA (dsRNA)	6
A. 制备 PCR 模板	7
B. 线性化质粒模板.....	8
C. 合成大量的 dsRNA	9
D. 去除 DNA 模板、退火 dsRNA 和去除 ssRNA	10
E. 纯化双链 RNA	10
F. 测定 RNA 浓度及凝胶电泳分析	11
4. 生成短干扰 RNA (siRNA)	12
A. 设计 DNA 寡核苷酸	12
B. 退火 DNA 寡核苷酸	14
C. 合成大量的 siRNA.....	15
D. 去除 DNA 模板并退火 siRNA	16
E. 纯化 siRNA	16
F. 测定 siRNA 浓度和凝胶电泳分析	16
5. RNAi 和 siRNA 的应用	17
6. 疑难解答.....	18
7. 缓冲液和溶液组成	19
8. 参考文献.....	20
9. 相关产品.....	22

1. 产品描述

T7 RiboMAX™ Express RNAi System^(a) 是一种体外转录系统，用于在较短时间内产生毫克级别的双链 RNA (dsRNA)。该系统生产的 dsRNA 不含蛋白和其他成分的污染物，适用于 RNA 干扰 (RNAi) 实验。T7 RiboMAX™ Express RNAi System 专为合成约 200bp 及更长的 dsRNA 分子设计 (参见图 1)，且可与质粒或 PCR 模板联合使用。T7 RiboMAX™ Express RNAi System 每毫升反应液的产量 > 2 mg dsRNA。对于大多数非哺乳动物系统的 RNAi 应用，通常使用 400bp 或更长的 dsRNA (1,2)。

当用于哺乳动物系统时，T7 RiboMAX™ Express RNAi System 还可用于合成 21bp 的短干扰 RNA (siRNA) (参见图 2)。用于合成 siRNA 的 DNA 模板由包含 T7 RNA 聚合酶启动子的退火 DNA 寡核苷酸组成。一般可观察到每毫升反应液产量等于或大于 500µg siRNA。

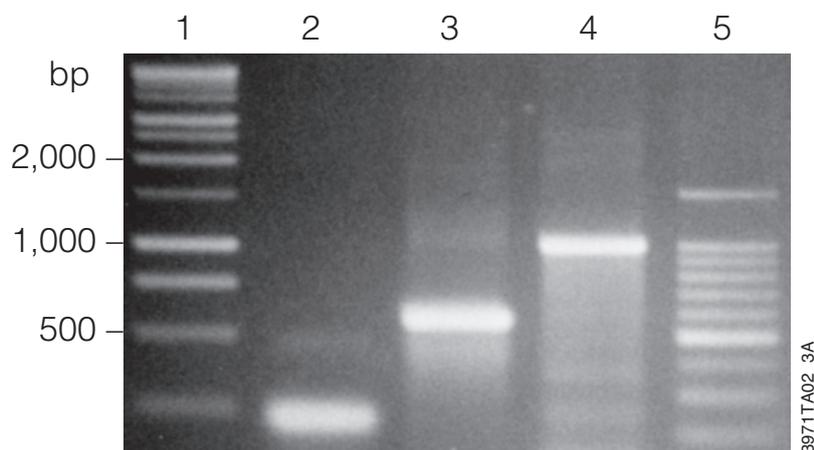


图 1. T7 RiboMAX™ Express RNAi System 生成的不同大小的 dsRNA 分子的非变性琼脂糖凝胶电泳分析。于 1.8% 琼脂糖 /1X TAE 凝胶上分离各种 dsRNA (每种约 4×10^{11} 分子)，并使用 0.5µg/ml 溴乙锭对凝胶染色并观察结果。泳道名称：泳道 1, 1kb DNA Ladder (目录号：G5711)；泳道 2, 74 ng 180 bp dsRNA；泳道 3, 200ng 500bp dsRNA；泳道 4, 400ng 1000bp dsRNA；泳道 5, 100bp DNA Ladder (目录号：G2101)。注：dsRNA 迁移速度比 dsDNA 慢。

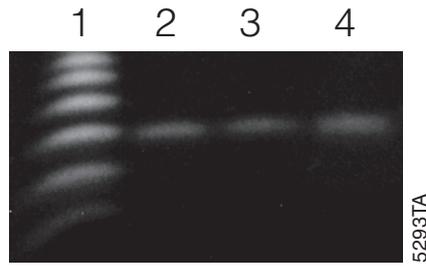


图 2. T7 RiboMAX™ Express RNAi System 生成的不同大小的 siRNA 分子的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。各泳道分别上样约 50ng 各种 siRNA，在 4–20% TBE 聚丙烯酰胺凝胶（电泳缓冲液为 TBE）中进行电泳分析。电泳后，使用 0.5µg/ml 溴乙锭对凝胶进行染色。泳道名称：泳道 1，10bp DNA Ladder（目录号：G4470）；泳道 2，21bp 化学合成的 Renilla siRNA(Dharmacon)；泳道 3，使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi 系统合成的 21 bp Renilla siRNA；泳道 4，使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi 系统合成的 21 bp p53 siRNA。注：siRNA 的迁移速度比双链 DNA 慢。

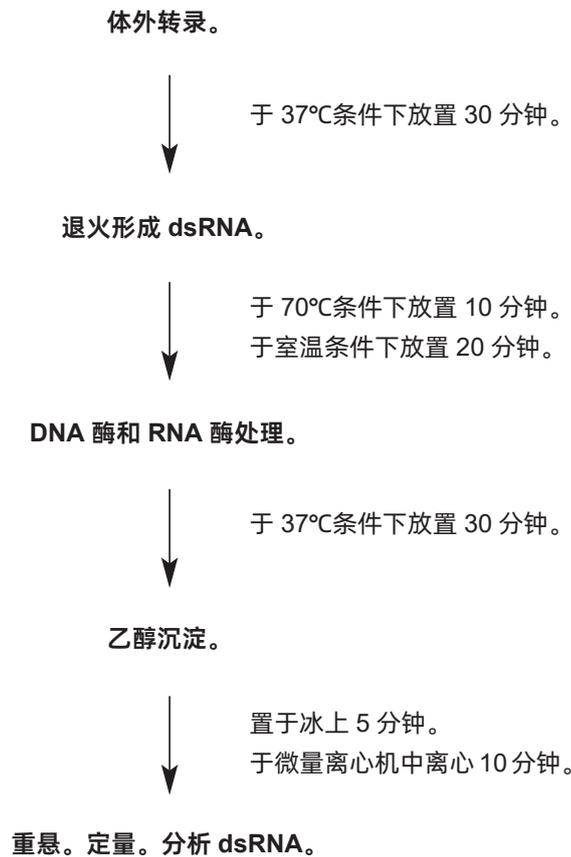


图 3. 使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi 系统生成和纯化 dsRNA 的操作流程概述。

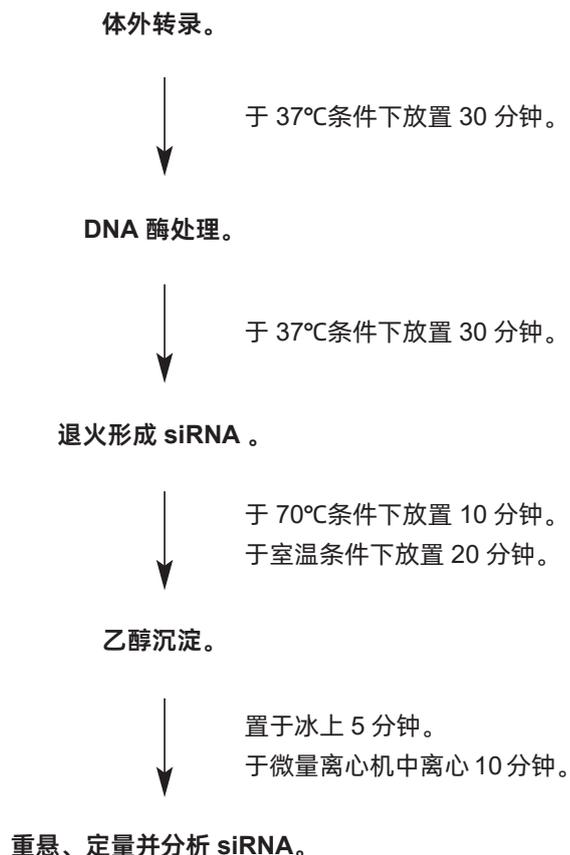


图 4. 使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi 系统生成和纯化 siRNA 的操作流程概述。

使用本系统时，用户提供的 DNA 模板会引导合成两条互补的 RNA 链。转录反应后，将所得的 RNA 链进行退火形成 dsRNA 或 siRNA。对于 dsRNA 的制备，可退火后通过核酸酶消化这一步骤去除残存的单链 RNA 和 DNA 模板。对于 siRNA 的制备，应除去 DNA 模板并随后将 RNA 链退火形成 siRNA。然后通过异丙醇沉淀法纯化 dsRNA 或 siRNA（相关操作流程概述，请参见图 3 和图 4），并可将纯化产物导入目标生物体进行 RNAi 实验。

RNA 干扰现象最初发现于秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) (3) 中，其机制是长 dsRNA 分子特异性抑制靶基因的表达。但现在已在许多生物体中观察到此现象，果蝇 (*Drosophila*) (4)、锥体虫 (Trypanosomes) (5)、涡虫 (*Planaria*) (6)、水螅 (*Hydra*) (7) 以及斑马鱼 (Zebrafish) (8)。RNAi 机制似乎是由更小的 dsRNA 中间体介导。较大的亲本 dsRNA 在体内通过核糖核酸酶 III 样酶（即 Dicer）加工成较小的片段，产生的小干扰 RNA (siRNA) 指导转录后但翻译前阶段的靶 mRNA 的降解 (1,9)。RNA 干扰过程似乎呈现非化学计量学特性，且已观察到其可在细胞之间进行扩散 (3)。

将更长的 dsRNA 引入大多数哺乳动物系统会引发广泛且非特异性的 mRNA 降解及蛋白质合成抑制，此现象称为干扰素反应 (10)。Tuschl 和其同事以及 Fire 及其同事的研究表明，化学合成的 siRNA 可在许多哺乳动物细胞系中诱导特异性基因沉默，而不会触发强效的抗病毒干扰素反应 (11, 12)。后续研究证实，体外合成的 siRNA 在哺乳动物系统中诱导 RNA 干扰的效果与化学合成的 siRNA 相当 (13)。长为 21 个核苷酸的 siRNA 双链体已被证明最为有效，其包含 19bp 的双链核心及两端各 2 个尿苷的 3' 端突出 (1)。RNAi 是通过特定 mRNA 的特异性抑制以研究特定蛋白“基因敲除 / 基因敲低”表型进而研究基因功能的强有力工具。有关 RNA 干扰的研究进展，请参见参考文献 14。

本系统也可通过省略退火和 RNase A 消化步骤，用于合成大量单链 RNA (有关详细信息，请参见《T7 RiboMAX™ Express 大规模 RNA 生产系统技术手册》#TB298)。

T7 RiboMAX™ Express RNAi System 与标准 RiboMAX™ System 存在以下两点不同：

- **节省时间：**T7 RiboMAX™ Express RNAi System 可在短短 30 分钟内产生毫克级别的 RNA，而其他商业化系统 (包括原始的 RiboMAX™ 系统) 则需要 2-4 小时。
- **提供便利：**系统将 rNTP 混合物与转录缓冲液预混，最大限度减少移液误差并缩短操作准备时间。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
T7 RiboMAX™ Express RNAi System	50 × 20μl reactions	P1700

每个系统均包含足够的试剂，可进行 50 次标准的 20μl 反应，可合成 25-50 个 dsRNA 或 siRNA。包括：

- 100μl Enzyme Mix, T7 Express (T7 RNA 聚合酶, 重组 RNasin® 核糖核酸酶抑制剂和重组无机焦磷酸酶)
- 500μl RiboMAX™ Express T7 2X Buffer
- 110units RQ1 RNase-Free DNase, 1u/μl
- 5μg GEM® Express Positive Control Template, 1mg/ml
- 1ml 3M Sodium Acetate (pH 5.2)
- 1.25ml Nuclease-Free Water
- 200μl RNase A 溶液

储存和稳定性：将所有组分储存在 -20°C 下。**RNase A 溶液**初次解冻后需于 25°C 保存，若储存及操作得当，其稳定性可维持 12 个月。

注：pGEM® Express 阳性对照模板仅用作转录反应的对照，不适用于操作流程后续步骤的对照。

3. 产生更长的双链 RNA (dsRNA)

用户需提供的材料

(溶液配方见第 7 节。)

- 氯仿：异戊醇 (24:1)
- TE 饱和 (pH 8.0) 苯酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1)
- 70% 乙醇
- 基因特异性扩增引物或模板
- 异丙醇或 95% 乙醇

在非哺乳动物靶标的 RNAi 实验中，一般使用 400bp 或更大的 dsRNA (1, 2, 15)。建议用于 RNAi 的最小 dsRNA 约为 200bp。一般来说，用于 RNAi 实验的 dsRNA 的转录模板应与大多数或所有靶序列信息相对应。数据显示，较长 dsRNA 分子在等摩尔浓度基础上对蛋白质表达的沉默效果更优，但更高浓度的较小 dsRNA 分子也可能具有类似的沉默作用，Promega 的实验数据表明，较短 dsRNA 在非哺乳动物系统中诱导 RNA 干扰的效果与效率可媲美长链 dsRNA (16)。

在本系统中，dsRNA 的合成要求 DNA 靶序列的两条链 5' 端均含有 T 聚合酶启动子。应使用两个单独的 DNA 模板，且每个模板均包含相对于 T7 启动子方向不同的靶序列。转录完成后，将生成的 RNA 产物混合并进行转录后退火。

3.A. 制备 PCR 模板

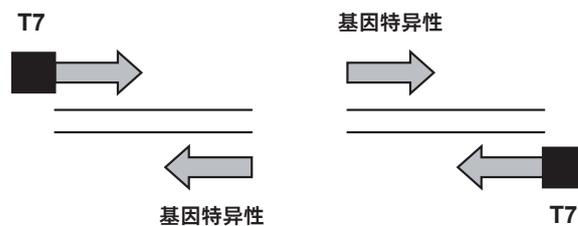
可通过在 PCR 扩增引物的 5' 端添加 T7 启动子序列，使任何 DNA 序列获得 T7 RNA 聚合酶启动子。

最小 T7 RNA 聚合酶启动子序列要求为：

5'-TAATACGACTCACTATAGGN₍₁₇₋₂₂₎-3'.

加粗的 +1 位碱基 (G) 是掺入 RNA 链的第一个碱基 (RNA 链合成的起始位点)，随后是第二个碱基 G，后续连接的应该是 17-22 个基因特异性核苷酸。在最小 T7 RNA 聚合酶启动子序列 (示例中粗体显示) 上游引入额外的碱基后产量可能会增加，因为聚合酶结合和启动更为有效 (即 5'GGATCC-TAATACGACTCACTATAGGN₍₁₇₋₂₂₎ 3')。因此，建议使用扩展后的 T7 启动子序列。

具有单个 T7 启动子的两个单独的 PCR 反应生成两个
独立的单个启动子模板



- 需 4 个 PCR 引物才能产生 2 个 PCR 产物

5301MA

图 5. 通过 PCR 法将 T7 启动子引入至 DNA 模板的策略。

生成必要的两个 DNA 模板需四个 PCR 引物和两次 PCR 扩增 (请参见图 5) 使用含 T7 启动子序列的引物进行扩增时，可采取以下策略：前 5–10 个循环的退火温度设定为比基因特异性序列解链温度高约 5°C，随后进行的 20–35 个循环的退火温度设定为比包含 T7 启动子的完整引物解链温度高约 5°C。

转录前，应通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，以确认是否生成了单一的预期大小的 PCR 产物。我们建议使用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (目录号：A9281) 对 PCR 产物进行纯化，然后通过其在 260nm 处的吸光度进行定量。此系统既可用于纯化也可用于浓缩，而且必要时还可进行 PCR 产物的凝胶纯化。少量未纯化的 PCR 产物可用作模板 DNA (每 20µl 反应 1-2µl)，但一般来说，纯化后产物所得产量会更高。

3.B. 线性化质粒模板

用质粒模板生成 dsRNA 需构建两个独立的克隆，二者含有相同靶序列，但靶序列以相反方向插入。两个克隆产物中，每一个的靶序列应在其不同末端含有 T7 RNA 聚合酶启动子。可将 PCR 产物直接克隆至 pGEM[®]-T (目录号: A3600) 或 pGEM[®]-T Easy (目录号: A1360) 载体中。这些载体在多克隆位点上游含单一 T7 启动子序列。随后可通过以下方法筛选克隆方向: 使用载体特异性引物与内部引物进行 PCR 扩增 (不同方向的克隆将产生不同大小的片段), 或通过限制性酶切选择不同方向的克隆。

最佳 RNA 产量依赖于使用高质量 DNA 模板开始实验。氯化铯纯化和 Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (目录号: A1330) 均可制备适用于转录反应的 DNA。需确保 DNA 中不含 RNase。若怀疑存在 RNase 污染, 需将 DNA 与含 100µg/ml 蛋白酶 K、0.5% SDS 的 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM CaCl₂ 混合, 37°C 孵育 30 分钟 (5), 随后用 TE 饱和 (pH 8.0) 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提并通过乙醇沉淀进一步纯化。

体外转录之前, 应将 DNA 模板线性化, 以生成确定长度的 RNA 转录本。使用在靶序列下游切割的合适的限制性内切酶消化 DNA 以实现 DNA 的线性化, 随后进行适当纯化 (如酚抽提后乙醇沉淀)。或者, 也可使用 Wizard[®] DNA Clean-Up System (目录号: A7280) 纯化酶切后的 DNA。使用无核酸酶水溶解 DNA 模板, 然后再将其添加至转录反应体系中。建议线性化处理时的起始 DNA 量比转录反应所需 DNA 量多至少 30%, 以补偿纯化过程中的 DNA 损失和可用于凝胶电泳进行观察。

注意避免使用可产生 3' 突出端的限制性内切酶 (请参见表 1)。当使用此类模板进行转录时, 报告的不仅有预期转录产物, 还有其他无关的转录产物 (17)。这些无关的转录产物包含与预期转录产物互补的序列以及与载体 DNA 相对应的序列。如果必须使用此类酶, 则可在转录之前使用 DNA 聚合酶 I 大 (Klenow) 片段或 T4 DNA 聚合酶将线性化模板的末端补平。

表 1. 产生 3' 突出端的常用限制性内切酶。

<i>Aat</i> II	<i>Bsp</i> 1286 I	<i>Hha</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sph</i> I
<i>Apa</i> I	<i>Bst</i> X I	<i>Kpn</i> I	<i>Sac</i> II	
<i>Ban</i> II	<i>Cfo</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sfi</i> I	
<i>Bgl</i> I	<i>Hae</i> II	<i>Pvu</i> I	<i>Sgf</i> I	

3.C. 合成大量的 dsRNA

系统提供的线性对照 DNA 可产生长度为 1.1kb 和 2.3kb 的单链转录产物。pGEM[®]Express 阳性对照模板产生的转录产物不为互补，因此不会形成双链 RNA。这些转录产物仅作为系统转录活性及转录后 RNA 完整性的阳性对照使用。

1. 于室温条件下设置适当规格的反应体系。可以根据需要调整 20 μ l 反应体系的大小（总体积最大为 500 μ l；对于大于 500 μ l 的反应体积，请使用多个离心管）。按如下所示顺序添加组分。

T7 反应组分	样品反应	对照反应
RiboMAX [™] Express T7 2X Buffer*	10.0 μ l	10.0 μ l
线性 DNA 模板（共约 1 μ g；参见说明 1）	1–8 μ l	–
pGEM [®] Express 阳性对照模板	–	1.0 μ l
无核酸酶水	0–7 μ l	7.0 μ l
酶混合物，T7 Express	2.0 μ l	2.0 μ l
最终体积	20.0μl	20.0μl

* 冷冻后的 RiboMAX[™] Express T7 2X 缓冲液中可能会出现沉淀物，但可通过将缓冲液加热至 37 $^{\circ}$ C 并充分混匀使其溶解。请注意，该缓冲液中含亚精胺，在低于室温的条件下可能导致 DNA 沉淀。

2. 轻柔混匀后于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟（请参见说明 1-3）。

说明：

1. 对于质粒模板，每 20 μ l 反应体系中最多可含 3 μ g 纯化后模板。
2. 为实现产量的最大化，37 $^{\circ}$ C 孵育时间可延长至 2–6 小时。但是一般来说，孵育 30 分钟后，除较小的转录产物（约 200 个碱基）外，产量并不会显著增加。可进行时程实验以确定最大 RNA 合成量的最佳孵育时间。
3. 在 42 $^{\circ}$ C 条件下进行孵育可提高包含二级结构转录产物的 dsRNA 产量。如果在 37 $^{\circ}$ C 条件下产量不佳，且模板的 GC 含量较高，则可于 42 $^{\circ}$ C 条件下孵育反应。

3.D. 去除 DNA 模板、退火 dsRNA 及去除 ssRNA

转录反应后，可用 DNA 酶进行消化以去除 DNA 模板。经测试验证，RQ1 RNase-Free DNase（目录号：M6101）可在降解 DNA 的同时保持 RNA 完整性。如果需要测定 RNA 的精确浓度，则应使用 DNA 酶对 RNA 进行处理，并纯化以去除可能的抑制性或干扰性成分。

1. 对 RNA 链进行退火时，先将等体积的互补 RNA 反应液混合，然后于 70°C 条件下孵育 10 分钟，并缓慢冷却至室温（约 20 分钟）。这可实现双链 RNA 的退火。
2. 向 199 μ l 无核酸酶水中添加 1 μ l RNA 酶，以对提供的 RNA 酶溶液进行稀释（1: 200）。对于每 20 μ l 的反应体积，加入 1 μ l 新鲜稀释的 RNA 酶溶液和 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase，并于 37°C 条件下孵育 30 分钟。这可去除所有残存的单链 RNA 和 DNA 模板，只留下双链 RNA。**请勿保存或重复使用稀释后的 RNA 酶溶液。**

3.E. 纯化双链 RNA

1. 添加 0.1 体积的 3M 醋酸钠（pH5.2）和 1 体积的异丙醇或 2.5 体积的 95% 乙醇。混匀并置于冰上 5 分钟。此阶段反应体系会变得浑浊。置于微量离心机中并按最高转速离心 10 分钟。
2. 离心管底部应可见白色沉淀。小心倒出或抽提上清液，并使用 0.5ml 的预冷的 70% 乙醇对沉淀进行洗涤，并在洗涤后移除所有乙醇。将沉淀置于室温条件下风干 15 分钟，然后将 RNA 样品重悬于无核酸酶水中，其体积应为原始反应体积的 2-5 倍（充分重悬至少需要 2 倍体积）。于 -20°C 或 -70°C 条件下储存。

! 不可过度干燥 RNA 沉淀，因为过度干燥可能会不利于完全重悬。

3. 沉淀后可使用 G25 微量离心柱对 dsRNA 进行进一步纯化，根据生产商的说明书指导操作（Amersham Biosciences，目录号：27-5325-01）。此操作可除去所有残存的 rNTP，可实现通过 260nm 处吸光度进行准确定量。每个离心柱的处理量不应超过 40 μ l 初始反应体积。G25 纯化后，预计产量会有所下降（回收率约为 66%）。

3.F. 测定 RNA 浓度及凝胶电泳分析

用户需提供的材料

(溶液配方见第 7 节)

- Blue/Orange Loading Dye, 6X (目录号: G1881)
- RNA 样品缓冲液
- RNA 上样缓冲液

除去 DNA 模板、未并入的核苷酸 (通过 G25 色谱法) 和任何残存的单链 RNA 后, 可通过紫外吸光度对 dsRNA 的浓度进行定量。制备稀释比例为 1: 100 至 1: 300 的 RNA 稀释液, 并读取 260nm 波长时的吸光度。一个 A_{260} 单位等于约 40 μ g/ml 的 dsRNA。

经 DNase 处理的 dsRNA 转录产物可通过非变性凝胶电泳法 (并使用 1X Blue/Orange Loading Dye) 检测, 用于验证 A_{260} 定量法的准确性, 并评估全长 dsRNA 转录本的完整性。将 1kb DNA Ladder (目录号: G5711) 添加至凝胶上可更好地确定 dsRNA 样品的大小。请注意, 双链 RNA 的迁移速度可能比双链 DNA 更慢。每个泳道均使用 1-5 μ l 稀释后的 dsRNA (使用无核酸酶的水稀释至少 50 倍) 或每个泳道使用 50-500ng。通过与已知量的双链 DNA 进行对比, 实现 dsRNA 的凝胶定量。

根据所涉及转录产物的长度, 使用 1X TAE 制备琼脂糖凝胶或丙烯酰胺微型凝胶 (对于长度在 200 至数千个核苷酸之间的转录产物, 琼脂糖浓度应在 0.7-2.0% 之间)。用 0.5mg/ml 溴乙锭或 1: 10000 稀释的 SYBR[®] Green II 染色剂 (Molecular Probes) 对凝胶染色以观察分离后 dsRNA。我们不建议将染色剂掺入凝胶中, 因为会改变 dsRNA 的迁移速率, 从而增加准确测定 dsRNA 大小的难度。

评估单链 RNA 的完整性时, 可使用 RNA 样品缓冲液和 RNA 上样缓冲液进行变性凝胶电泳实验。将 RNA Marker (目录号: G3191) 添加至凝胶上可帮助确定 RNA 样品的大小和完整性。

虽然使用变性凝胶 (含有甲醛、乙二醛或 8M 尿素) 可实现变性 RNA 的最高分辨率, 但我们发现使用载有变性 RNA 的非变性凝胶通常情况下也可获得可接受的结果。将 1-5 μ l 稀释后 RNA (使用无核酸酶水至少稀释 50 倍) 添加至 10-20 μ l 的 RNA 样品缓冲液中。再加入 2-5 μ l RNA 上样缓冲液, 然后于 65-70 $^{\circ}$ C 条件下加热样品 5-10 分钟, 然后上样至凝胶。于进行 DNA 样品分析的标准条件下进行电泳实验, 并在电泳后使用溴乙锭或 SYBR[®] Green II 染色剂观察 RNA。通过与已知量的 ssRNA 进行比对, 实现对变性 dsRNA 的凝胶定量。

线性对照 DNA 产生两个单链 RNA 转录产物, 其长度分别约为 2.3kb 和 1.1kb。这些链并不互补, 也不会退火形成 dsRNA。它们在非变性凝胶中将呈现较为弥散的条带。

4. 生成短干扰 RNA (siRNA)

用户需提供的材料

(溶液配方见第 7 节。)

- 2X 寡核苷酸退火缓冲液 (Oligo Annealing Buffer)
- 无核酸酶水
- 基因特异性 DNA 寡核苷酸
- 异丙醇
- 70% 乙醇

4.A. 设计 DNA 寡核苷酸

用于体外转录 siRNA 的 DNA 模板为短双链寡核苷酸, 包含正义或反义靶 mRNA 序列且任一条序列上游包含一个 T7 RNA 聚合酶启动子。将两条 DNA 寡核苷酸退火以生成用于合成 siRNA 每条链的单独模板。单链短 RNA 分别合成后, 经退火处理形成双链 siRNA。

为实现 siRNA 的体外合成 (使用 T7 RNA 聚合酶合成), 必须筛选靶标 mRNA 序列中是否存在 5'-GN₁₇C-3' 序列。建议针对特定靶标生成 3-5 个不同 siRNA 序列以筛选最佳靶点, 因为 siRNA 在同一靶标中的不同位点之间的沉默效率的差异可能很大。目前, 无法预测 siRNA 的有效性, 因此为实现最佳抑制效果需针对特定靶 mRNA 筛选出多个 siRNA。

寡核苷酸由靶序列、T7 RNA 聚合酶启动子序列以及最小启动子序列上游的 6 个额外核苷酸 (以提高 T7 RNA 聚合酶结合效率) 组成。寡核苷酸结构如下: (带下划线的是 T7 启动子序列):

mRNA 序列:

5'-XXXXXG₁N₂₋₁₈C₁₉XXXXX-3'

互补序列:

3'-XXXXXC₁N₂₋₁₈G₁₉XXXXX-5'

寡核苷酸 1 (正义链顶链):

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATA-G₁N₂₋₁₈C₁₉-3'

(G₁N₂₋₁₈C₁₉= 正义 mRNA 序列)

寡核苷酸 2 (正义链底链):

3'-CCTAGGATTATGCTGAGTGATAT-C₁N₂₋₁₈G₁₉-AA-5'

要订购的寡核苷酸 2:

5'-AA-G₁₉N₁₈₋₂C₁-TATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3'

寡核苷酸 3 (反义链顶链) :

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATA-G₁₉N₁₈₋₂C₁-3'

(G₁₉N₁₈₋₂C₁= 反义 mRNA 序列)

寡核苷酸 4 (反义链底链) :

3'-CCTAGGATTATGCTGAGTGATAT-C₁₉N₁₈₋₂G₁-AA-5'

要订购的寡核苷酸 4:

5'-AA-G₁N₂₋₁₈C₁₉-TATAGTGAGTCGTATTAGGATCC-3'

将一组额外的两个腺嘌呤核苷酸添加至寡核苷酸 2 和寡核苷酸 4 的 5' 末端, 以实现在 siRNA 链中形成两个尿苷的 3' 突出端。

使用通用型的仅含最小 T7 RNA 聚合酶启动子的顶链寡核苷酸 (即, 顶链 oligo 全序列为: 5'-GGATCCTAATAGC-ACTCACTATAG-3'), 从而将制备 DNA 模板所需的寡核苷酸数量降至最低。但是, 我们观察到使用完全型的双链寡核苷酸所得 siRNA 产量最佳 (如上图所示)。然而, 部分模板使用最小顶链寡核苷酸或全长顶链寡核苷酸时, 其 RNA 产量相近, 该效应似乎具有模板依赖性。

表 2. 使用通用型的最小 T7 RNA 聚合酶启动子顶链寡核苷酸或更长的 T7 顶链寡核苷酸生成 6 个不同短 RNA 的 6 种不同 DNA 模板的 RNA 产量比较。

产生的 RNA	通用的最小寡核苷酸 (任意设定为 100%)	更长的顶链寡核苷酸
模板 1	100%	86%
模板 2	100%	132%
模板 3	100%	20%
模板 4	100%	90%
模板 5	100%	258%
模板 6	100%	147%

4.B. 退火 DNA 寡核苷酸

将合成的 DNA 寡核苷酸单链重悬于无核酸酶水中，并使其终浓度为 100pmol/μl。

按下述方式组合每对 DNA 寡核苷酸，以生成用于合成正义链 RNA 或反义链 RNA 的模板：

寡核苷酸 # 1 (100pmol/μl)	10μl
寡核苷酸 # 2 (100pmol/μl)	10μl
2X Oligo 退火缓冲液	50μl
无核酸酶水	30μl
最终体积	100μl

将寡核苷酸混合物于 90-95°C 条件下加热 3-5 分钟，然后使混合物缓慢冷却至室温。**退火后寡核苷酸的终浓度为 10pmol/μl。**将退火的寡核苷酸 DNA 模板存储于 4°C 或 -20°C 条件下。

注：将寡核苷酸混合物置于装有 90-95°C 水的烧杯中孵育 3-5 分钟，随后将此烧杯转移至室温水浴中缓慢冷却，此方法已被 Promega 的科学家验证有效。此过程大约需要 2 小时。或者，可将加热后的装有水的烧杯静置缓慢冷却至室温（过夜）。

4.C. 合成大量的 siRNA

系统提供的线性对照 DNA 可产生长度为 1.1kb 和 2.3kb 的单链转录产物。pGEM[®] Express 阳性对照模板产生的转录产物不互补，因此不会形成双链 RNA 或 siRNA。它们仅用作系统转录活性和转录后 RNA 完整性的阳性对照。

1. 于室温条件下设置适当规格的反应液体系。20 μ l 反应体系可按需调整规格（总体积最大为 500 μ l；对于大于 500 μ l 的反应体积，请使用多个离心管）。按如下所示顺序添加组分。每种 siRNA 均需组装两个独立的反应体系，因为每条短 RNA 链均是单独合成的，然后在转录后进行混合。

T7 反应组分	样品反应	对照反应
RiboMAX [™] Express T7 2X Buffer* 退火后寡核苷酸模板 DNA (上述所得; 10pmol/ μ l; 参见说明 1)	10.0 μ l 2.0 μ l	10.0 μ l
pGEM [®] Express Positive Control Template	–	1.0 μ l
无核酸酶水	6.0 μ l	7.0 μ l
酶混合物, T7 Express	2.0 μ l	2.0 μ l
最终体积	20.0μl	20.0μl

* 冷冻后的 RiboMAX[™] Express T7 2X 缓冲液中可能会出现沉淀物，但可通过将缓冲液加热至 37 $^{\circ}$ C 并充分混匀使其溶解。请注意，该缓冲液中含亚精胺，在低于室温的条件下可能导致 DNA 沉淀。

2. 于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟（请参见说明 2-3）。

说明：

1. 最多可将 6 μ l 退火后的 DNA 寡核苷酸模板添加至单个 20 μ l 体外转录反应中，否则会因退火缓冲液产生抑制作用。经验证，每 20 μ l 体外转录反应使用约 20pmol 退火后的 DNA 寡核苷酸模板可获得最佳 RNA 产量。
2. 为最大化产物得率，37 $^{\circ}$ C 孵育时间可延长至 2 小时。一般来说，孵育超过 30 分钟后，产量不会显著增加。但是，有时可观察到取决于模板的时间依赖性产量增加。可进行时程实验以确定最大 RNA 合成量的最佳孵育时间。
3. 在 42 $^{\circ}$ C 条件下进行孵育可提高包含二级结构转录产物的 siRNA 产量。如果在 37 $^{\circ}$ C 条件下产量不佳，且模板的 GC 含量较高，则可于 42 $^{\circ}$ C 条件下孵育反应。

4.D. 去除 DNA 模板并退火 siRNA

转录反应后，可用 DNA 酶进行消化以去除 DNA 模板。经测试验证，RQ1 RNase-Free DNase（目录号：M6101）可在降解 DNA 的同时保持 RNA 完整性。如果需要测定 RNA 的精确浓度，则应使用 DNA 酶对 RNA 进行处理，并纯化以去除可能的抑制性或干扰性成分。

! 切勿在 siRNA 制备反应中加入稀释的 RNase A 溶液。RNase A 会切割转录产物的 3' 端 2 个尿嘧啶构成的突出结构，该结构对于 siRNA 诱导的 RNAi 是必需的。对于非哺乳动物系统中较长 RNA 分子诱导的 RNAi 而言，则不需要突出端。

1. 向每 20 μ l 转录反应液中加入 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
2. 将正义和反义反应液混合，并于 70 $^{\circ}$ C 条件下孵育 10 分钟，然后使试管冷却至室温（约 20 分钟）。此步骤可使独立的正义链与反义链 RNA 退火形成 siRNA。

4.E. 纯化 siRNA

1. 加入 0.1 体积的 3M 醋酸钠（pH5.2）和 1 体积的异丙醇（请参见说明）。混匀并置于冰上 5 分钟。此阶段反应体系会变得浑浊。置于微量离心机中并按最高转速离心 10 分钟。
2. 离心管底部应可见白色沉淀。小心吸弃上清，用 0.5ml 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀，洗涤后彻底去除乙醇。将沉淀置于室温条件下风干 15 分钟，然后将 RNA 样品重悬于无核酸酶水中，其体积应为原始反应体积的 2-5 倍（充分重悬至少需要 2 倍的体积）。不可过度干燥 RNA 沉淀，因为过度干燥可能会不利于完全重悬。于 -20 $^{\circ}$ C 或 -70 $^{\circ}$ C 条件下储存。

注：在异丙醇沉淀步骤中添加糖原可提高产量。我们建议每微升转录反应使用 50ng 糖原（购自 Roche Applied Science，目录号：901-393）。纯化后 siRNA 中残留的糖原不会干扰后续定量或功能实验。

4.F. 测定 siRNA 浓度及凝胶电泳分析

用户需提供的材料

（溶液配方见第 7 节。）

- 蓝色 / 橙色上样染料，6X（目录号：G1881）

DNA 酶处理的 siRNA 转录产物可通过非变性凝胶电泳进行检测，以确定全长 siRNA 转录产物的完整性。将 10bp DNA Ladder（目录号：G4471）添加至凝胶上可更好地确定 siRNA 样品的大小。请注意，siRNA 的迁移速度比双链 DNA 慢。每个泳道均使用 1-5 μ l 稀释后的 siRNA（使用无核酸酶水稀释至少 20 倍）或每个泳道使用 50-500ng。通过与已知量的用于产生 siRNA 链的退火 DNA 寡核苷酸模板进行对比，实现 siRNA 的凝胶定量。对于绝对定量，则应使用和荧光扫描仪对纯化后的化学合成的 siRNA 进行凝胶分析。需进行绝对定量时，应使用 SYBR[®] Green II 染色剂，通过与纯化的化学合成 siRNA 标准品进行对比，并结合荧光扫描仪，进行凝胶分析。

4.F. 测定 siRNA 浓度及凝胶电泳分析 (续)

根据目标转录产物长度选择制备 2-3% 琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺微型凝胶 (siRNA 建议使用 10-20% 聚丙烯酰胺凝胶)。用 0.5mg/ml 溴乙锭或 1: 10000 稀释的 SYBR[®] Green II 染色剂 (Molecular Probes) 对凝胶染色以观察分离后 siRNA。我们不建议将染色剂掺入凝胶中, 因为会改变 siRNA 的迁移速率, 从而增加准确测定 siRNA 大小的难度。

另外, 纯化后的 siRNA 可使用 RiboGreen[®] 染料和 RiboGreen[®] 试剂盒中提供的核糖体 RNA 标准品进行定量, 按高浓度标准曲线建立方法, 并将 siRNA 样本进行连续 1:10 梯度稀释后测定 (Molecular Probes; 目录号: R-11490)。

我们不建议使用 260nm 处的吸光度进行定量。残留的核糖核苷酸会干扰该方法的准确性, 而 G-25 柱纯化会导致 siRNA 产量显著下降。

5. RNAi 和 siRNA 的应用

以下参考文献作为技术指南提供。针对非哺乳动物与哺乳动物系统的 RNA 干扰实验方案持续更新优化, 建议查阅最新文献获取前沿技术方法。

用于秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*)

- **注射线虫:** 参考文献 1 和 18 包含了使用 dsRNA 注射完整线虫的指南。
- **浸泡线虫:** 参考文献 19 中介绍了将线虫浸泡在含有 dsRNA 的溶液中的方法。
- **喂食线虫:** 参考文献 20-22 中介绍了通过喂食携带饲喂载体 (可表达双链 RNA) 的细菌向线虫递送双链 RNA 的实验方案。

用于昆虫细胞培养物

- 已经使用培养的果蝇 S2 细胞进行了多项 RNAi 研究。参考文献 16 所述的实验方案已通过 Promega 科学家验证, 可与 T7 RiboMAX[™] Express RNAi 系统合成的双链 RNA 兼容使用。
- 参考文献 24 中介绍了使用转染试剂将 dsRNA 引入昆虫细胞的方法。还介绍了在培养的蚊子细胞 (25) 或培养的果蝇器官 (26) 中进行 RNAi 实验的流程。

用于哺乳动物细胞系统

- 可以使用多种不同的方法将体外合成的 siRNA 或发夹结构 siRNA 转染至哺乳动物细胞系中 (12, 13, 27)。

6. 疑难解答

若您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。

联系信息见：www.promega.com。电子邮箱：techserv@promega.com

问题	原因和意见
使用标准转录方案合成的 RNA 量少	<p>转录 2X 缓冲液中含有的亚精胺沉淀 DNA 模板。确保反应组分均于室温条件下并按所列顺序配制。</p>
	<p>模板 DNA 中存在抑制剂。常见的抑制剂包括残留的 SDS、盐、EDTA 和 RNA 酶。用于沉淀模板 DNA 的残留 NaCl 可能会抑制 RNA 聚合酶活性（最高可达 50%）。模板 DNA 可通过柱层析法进行脱盐并使用另一种盐进行沉淀。使用 70% 乙醇洗涤所得沉淀 1-2 次。</p>
	<p>模板 DNA 中存在核酸酶。建议在所有体外转录反应中均使用重组 RNasin[®] 核糖核酸酶抑制剂。酶混合物中包含 RNasin[®] 核糖核酸酶抑制剂。任何未提供的溶液均应使用 0.1% DEPC 处理后的水制备。</p>
	<p>如果存在核酸酶，则可使用蛋白酶 K 进行处理以提高模板质量。于 50°C 条件下，使用蛋白酶 K（100-200ug/ml）和 SDS（0.5%）处理模板 DNA 30 分钟，然后进行苯酚 / 氯仿抽提和乙醇沉淀。进行乙醇沉淀前，可将核酸稀释多倍以最大程度地减少 SDS 残留。重悬前，使用 70% 乙醇充分洗涤沉淀。</p>
	<p>模板效率较低或存在二级结构。 克隆 DNA 模板以使插入片段的不同区域邻近转录起始位点。调整 T7 启动子相对于转录序列的转录起始点位置可解决转录问题。</p>
	<p>在 42°C 条件下而非 37°C 条件下孵育可能会增加包含二级结构模板的转录。</p>
	<p>RNA 聚合酶失活。RNA 聚合酶的活性可通过对照模板的体外转录进行评估。</p>

6. 疑难解答 (续)

问题	原因和意见
存在	RNA 合成提前终止。将孵育温度从 37°C 降至 30°C。在某些情况下, 这会增加全长转录产物的占比 (28)
存在比不完全转录产物预期更大的转录产物	DNA 模板上存在突出 3' 末端。如果 DNA 模板已用可产生突出 3' 端的限制性内切酶进行了线性化, 则转录会导致大量长 RNA 分子的合成, 这些长 RNA 分子在模板末端开始形成 (17)。若必须使用此类限制性内切酶, 需在转录反应前用 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 将线性 DNA 末端补平。 样本中存在未线性化的质粒。通过凝胶电泳法分析样品。如果发现未消化的载体, 则使用适量的限制性内切酶进行重新消化。

7. 缓冲液和溶液组成

2X Oligo 退火缓冲液

20mM Tris-HCl (pH7.5)

100mM 氯化钠

使用无核酸酶水制备缓冲液。置于室温条件下储存。

RNA 上样缓冲液

50% 甘油

1mM EDTA

0.4% 溴酚蓝

使用高级别甘油 (低级别甘油含核糖核酸酶活性)。分装后储存于 -20°C。

RNA 样品缓冲液

10.0ml 去离子甲酰胺

3.5ml 37% 甲醛

2.0ml MOPS 缓冲液

按等体积进行分装, 并于 -20°C 条件下储存 (最长 6 个月)。冻融次数不得超过两次。

TE 缓冲液

10mM Tris-HCl (pH8.0)

1mM EDTA

TE 饱和苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1)

将等体积的 TE 缓冲液和苯酚混合, 静置使相分离。取下层酚相与氯仿: 异戊醇 (24:1) 按体积比 1:1 混合。

注: 如用于在转录后除去 DNA 模板, 请使用 pH 为 4.5 的 TE 缓冲液, 而不是 pH 为 8.0 的 TE 缓冲液制备上述溶液。

MOPS 缓冲液 (10X)

0.2M MOPS (pH7.0)

50mM 醋酸钠

5mM EDTA (pH8.0)

8. 参考文献

1. Elbashir, S.M. S.M.,Lendeckel,W. 和 Tuschl,T.(2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188–200.
2. Yang,D.,Lu,H.and Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **10**, 1191–2000.
3. Fire,A.*et al.*(1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–11.
4. Misquitta,L.and Paterson, B.M. (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i) : A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1451-6.
5. Ngo,H.*et al.*(1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14687-92.
6. Sanchez-Alvarado,A. 和 Newmark,P.A.(1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049-54.
7. Lohmann,J.U.*et al.*(1999) Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev. Biol.* **214**, 211–14.
8. Wargelius,A.*et al.*(1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 156–61.
9. Zamore,P.D.*et al.*(2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33.
10. Gil,J.and Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action. *Apoptosis* **5**, 107–14.
11. Caplen,N.J.*et al.*(2001) Specific inhibition of gene expression by small double- stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9742-47.
12. Elbashir,S.M.*et al.*(2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**,494-8.
13. Donze,O.and Picard, D. (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nuc. Acids Res.* **30**, e46.
14. Betz,N.(2003) RNAi: RNA Interference. *Promega Notes* **83**, 33–6.
15. Hammon,S.M.*et al.*(2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–6.

8. 参考文献 (续)

16. Betz, N. (2003) RNAi in *Drosophila* S2 Cells: Effect of dsRNA size, concentration and exposure time. *eNotes* (www.promega.com/enotes/applications/0307/ap0050.htm) .
17. Schenborn, E.T. and Mierendorf, R.C. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: Dependence on template structure. *Nucl. Acids Res.* **13**, 6223–36.
18. Grishok, A., Tabara, H. and Mello, C.C. (2000) Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* **287**, 2494–7.
19. Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C.C. (1998) RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430–1.
20. Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
21. Kamath, R.S. *et al.* (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0002.
22. Fraser, A.G. *et al.* (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325–30.
23. Clemens, J.C. *et al.* (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6499–503.
24. Caplen, N.J. *et al.* (2000) dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: A tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* **252**, 95–105.
25. Levashina, E.A. *et al.* (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* **104**, 709–18.
26. Biyasheva, A. *et al.* (2001) Glue secretion in the *Drosophila* salivary gland: A model for steroid-regulated exocytosis. *Dev. Biol.* **231**, 234–51.
27. Chiu, Y.-L. and Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: Basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular Cell* **10**, 549–61.
28. Krieg, P.A. (1990) Improved synthesis of full-length RNA probe at reduced incubation temperatures. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6463.

9. 相关产品

RNA 生产

产品	目录号
Riboprobe® System–SP6	P1420
Riboprobe® System–T3	P1430
Riboprobe® System–T7	P1440
Riboprobe® System Buffers	P1121
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System–SP6	P1280
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System–T7	P1300
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems	P1320

仅供实验室使用。

DNA 纯化

产品	规格	目录号
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	50 preps	A1330
	250 preps	A1460
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	50 preps	A7100
	100 preps	A7500
	250 preps	A7510
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	25 preps	A7640
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	10 preps	A7270
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	5 preps	A7300
Wizard® DNA Clean-Up System	100 preps	A7280
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	50 preps	A9281
	250 preps	A9282

仅供实验室使用。

9. 相关产品 (续)

单链 RNA 分子量标记

产品	规格	目录号
RNA Markers	50µl	G3191

仅供实验室使用。

扩增产品

产品	规格	目录号
PCR Master Mix	10 reactions	M7501
	100 reactions	M7501
	1,000 reactions	M7505

仅供实验室使用。

PCR 克隆产品

产品	规格	目录号
pGEM [®] -T Vector System I	20 reactions	A3600
pGEM [®] -T Vector System II	20 reactions	A3610
pGEM [®] -T Easy Vector System I	20 reactions	A1360
pGEM [®] -T Easy Vector System II	20 reactions	A1380

仅供实验室使用。

10. 内容变更总结

本文件的 9/16 修订版对以下内容进行了变更：

1. 删除了 siRNA Target Designer 软件（无法再用）参考文件。
2. 更新了相关产品。

^(a) This product is covered under license from Carnegie Institution of Washington under U.S. Pat. Nos. 6,506,559, 7,538,095, 7,560,438, Australian Pat. No. 743798 and other patents pending. Commercial use of this product will require a separate license from Carnegie.

© 2003, 2005, 2009, 2013, 2016 Promega Corporation. All Rights Reserved.

pGEM, Riboprobe, RNasin and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation. RiboMAX is a trademark of Promega Corporation.

SYBR and RiboGreen are registered trademarks of Molecular Probes, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.