



4. siRNA 的制备合成

设计完了，就到合成制备 siRNA 了。要得到小分子双链 RNA，除了简单方便的化学合成，也可以用体外转录合成小分子 RNA，此外还有体外转录长双链 RNA，模拟自然状态下 siRNA 生成过程----用 Dicer 酶或者 RNaseIII 切割为 siRNAs 碎片----这个方法不需要设计具体的 siRNAs，由于得到的是 siRNAs 混合物，基因沉默成功率比单一的 siRNA 要高。不过还是要按照一定的规则如避开与其他基因同源区域等原则选择体外转录的片段。用载体表达 shRNA(前面提到的线路 3)，我们留到后面讨论。

4.1 siRNA 4 种制备方法之比较:

- 化学合成----化学合成是最常用的方

4 种 siRNAs 合成方法各有所长。如何选择合适自己实验需求的 siRNAs 合成方法？生物通小编在这里为你列表说明，我喜欢表格的简单，清晰，明确，虽然我写文章比较的罗嗦。

法，设计完 siRNAs 后，选择值得信赖的 RNA 合成厂家，订单发出把钱付掉，就可以等着收货了。对于普通培养细胞来说，siRNAs 比质粒更容易转染进入细胞。

- 体外转录合成 siRNA----合成 DNA Oligo 比 RNA 要便宜太多了。用合成的 DNA 模板做体外转录。操作上有点麻烦。
- 体外转录+Dicer 酶或则会 RNaseIII 切---无需精确设计 siRNA，基因沉默成功率相对高，节约时间和费用。
- 质粒/病毒载体表达 shRNAs----让载体进入细胞后表达 shRNA，在细胞内加工为 siRNA，可实现其他方法无可比拟的长时间基因沉默效果（2 周以上），载体可循环、长期使用，但是需要大量克隆的苦力工作。

siRNA 制备法	化学合成	体外转录合成 siRNA	体外转录+Dicer 酶切	质粒/病毒载体表达 shRNA
siRNA 制备流程	1.自行设计长 20-25bp 的 siRNAs 2.选择可信赖的合成厂家，定制合成 siRNAs	1.自行设计 siRNAs 2.订购 DNA Oligos 引物 3.体外转录/退火 5.DNase 和单链特异的 RNase 消化未匹配的单链 RNA，DNA 6.过柱纯化	1.设计/制备目标长链 DNA 模板（200-800bp，一端或两端带启动子） 2.体外转录/退火 3.Dicer 酶/RNaseIII 消化为 siRNAs 小片段混合物 4.过柱纯化	1.设计 55-60mer 短发夹结构 shRNA 2.定制合成 DNA Oligos 引物 3.DNA 产物克隆到载体中 4.分离鉴定转化子，测序 5.重组质粒扩增
荧光标记	可荧光标记 siRNA	可用荧光标记 siRNA	可用荧光标记 siRNA	不可标记 siRNAs
基因沉默时效	3-7 天短暂	3-7 天短暂	3-7 天短暂	> 2 周或以上可长期持续沉默基因表达
递送方法	脂质体转染 电转	脂质体转染 电转	脂质体转染 电转	质粒：脂质体转染，电转 病毒颗粒：感染各类培养细胞株，原代细胞、非分裂细胞、神经细胞
其他特点	即用,用完须重新订购		无需精确设计 siRNA，只要选择大段基因特异区域，混合物抑制成功率高. 无法确定最佳的 siRNA 适合只要求达到抑制结果无需知道哪个 siRNA 作用的实验，不适合长期持续性研究和 siRNA 分析	shRNA 克隆载体可以大量复制 有的载体可再生，可重复克隆使用

siRNA Products and Services

Custom siRNA synthesis and a wide array of pre-made and/or pre-designed siRNAs of exceptionally high quality.

Turbo si-Designer

- Bioneer专利siRNA设计软件
- 确定高效的siRNA靶点，成功率高。
- 高效选择功能性siRNAs: 80%被测试siRNA表现出高于75%的敲除率，38%的siRNA表现出高于90%的敲除率。

在培养的哺乳动物细胞中成功进行RNA干扰试验取决于多种因素。设计和确认特异而有效的siRNA位点，并将其高效的运送到预期的靶细胞是尤其重要的。为简化设计过程，Bioneer与韩国国家基因组信息中心合作研发了一种专利的siRNA选择淘汰系统，称为Turbo siRNA designer。该系统能高效确认siRNA靶点，有很高的成功率。Turbo si-designer的性能评估通过设计数百个siRNAs，经实时PCR分析检测其敲除效率来实现。与其他基于网络的设计软件相比，我们的软件可以较高概率地预见到能够进行有效基因敲除的功能性siRNA。值得注意的是，获得较低评分的siRNAs大多是无功能的，表明无效的siRNAs被Turbo si-designer有效的去除(图1)。详细资料请联系ts@bioneer-bj.com获取。

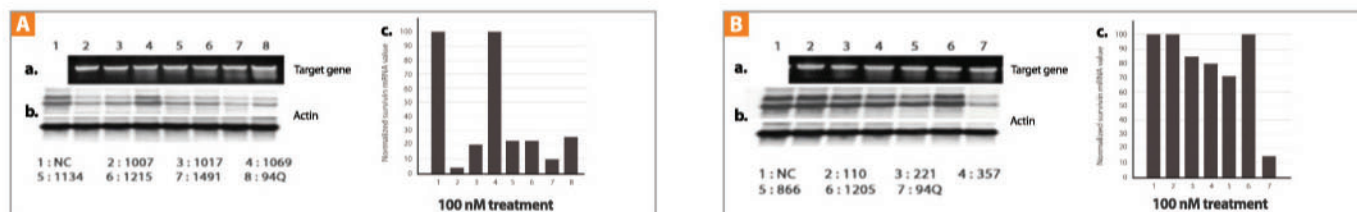


图1. 利用Turbo si-designer设计的siRNAs，通过Northern blot和实时定量PCR分析敲除效率。A) 高分siRNAs的敲除效率 B) 低评分siRNAs的敲除效率 (a: siRNA进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳; b: Northern blot分析; c: 实时定量PCR分析)

Custom siRNA

- 利用Bioneer专利384并行高通量合成仪在洁净室内合成
- 100% MALDI-TOF质量检测

Bioneer使用专利的Turbo si-Designer软件为您提供免费的siRNA设计，您只需把靶基因序列(名称和Genbank号)发送至ts@bioneer-bj.com即可获得设计。Bioneer输出的siRNA使用自主专利的384并行高通量合成系统，在洁净室中生产，并通过MALDI-TOF进行检测，以确保合成质量。还可提供多种包装方式和不同的修饰方式，包括荧光标记。更多合成资料敬请查看Bioneer中文网站: www.bioneer-bj.com。

MALDI-TOF和凝胶分析QC

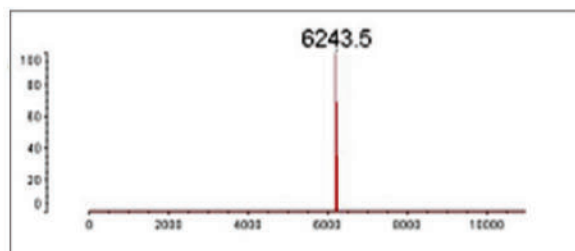


图2A. MALDI-TOF质谱分析合成的siRNA。所有合成后的siRNA都要通过质量控制过程的检测包括(MALDI-TOF和凝胶电泳)

siRNA生产室



图2B. Bioneer生产siRNA的洁净室



化学合成厂家及费用比较:

化学合成的 siRNA 通常可以选择的纯化方法有 4 种级别:

标准纯化包括脱盐,彻底去除碱基上的保护修饰。以 Ambion 为例,即使是一般常用的标准纯化,也要经过如下步骤:合成的单链 siRNA 经过 MALDI-TOF 质谱和 HPLC 分析,退火后经过 PAGE 检查退火效率。保证 80% 以上纯度,通常足以满足多数的培养细胞 RNAi 实验。

HPLC 纯化级别的纯度达到 97%,特别适合合成量较大(>40nmol)、或者修饰过的 siRNA 纯化。

PAGE 纯化对 30bp 以上长度的 dsRNA 纯化精度高于 HPLC,不过对于小于 30bp 的 siRNA 来说区别不大,都在 97%以上。

体内实验 (in vivo) 级别的 siRNA 除了要经过 HPLC 纯化,还要经过透析脱盐,内毒素检测等,可以直接用于动物实验。

国内厂家: 国内厂家 RNA 合成最大的优势是价格便宜,到货速度快。比如上海吉码、上海吉凯、武汉晶赛等等。上海吉码的价格较有优势: 500 元/siRNA(HPLC 纯),4OD, 货期 4 天,特惠套装有一个基因 3 个位点 (2OD), 外加正、负对照和荧光标记负对照, 价格 1680, 再加上荧光定量探针和一对引物则 2100 多。算是实惠之选。

国外厂家: 想要成功鉴定基因阻断的最佳序列,使用高质量无错误的 siRNA 寡核苷酸是重要的开端。虽然由于外币兑换、加上越洋运输和过海关,到货速度比国内慢,而且价格也就上去了,但是国际知名厂家的良好声誉,各自拥有 RNA 合成的专利技术,值得信赖的合成质量,让你用的更放心,国外高级期刊发表文章时更加有保障,不怕专家质疑。包括我们前面介绍的 Ambion、Qiagen、

Dharmacon、Sigma、Bio-Rad、Invitrogen、Bioneer 等公司都有提供定制合成的服务。通常提供同一基因 3 个位点中保证 2 个有效,或者 4 个位点保证 3 个有效的保障。以 Sigma 为例,旗下 Proligo 是四大拥有 MIT 专利授权合成 siRNA 的公司之一,拥有强大的生产技术平台和专利技术。生产基地经 ISO 9000 认证,提供产品质量 100%满意保障。而韩国 Bionner 公司除了使用严格的 MALDI-TOF 质谱来检测其合成的 siRNA 外,更提供包括 HPLC 检测、气相色谱分析、核磁共振分析、重金属含量检测、水分含量检测、生物负荷检测及内毒素检测等多种检测和分析。

4.2 体外转录 siRNA

体外转录可以做长片段,自然也可以做短片段。只是有个难题:体外转录要求 5'端开头的 2 个碱基为 GG 或者 GA 以提高转录效率, siRNA 则要求 3'端为 UU, 这样 2 个条件限制就使得一个基因里可供选择符合要求的位点很少或者没有。另外转录产物的 5'端通常带有几个多余的 GGG, 怎么办呢? 聪明的研究人员还是想出了办法,不单可以自己合成指定的 siRNA, 还可以利用很便宜的 DNA Oligo 合成 (现在一个碱基还不到 2 块钱!) 代替比较昂贵的 RNA 合成。就是操作起来实在有点麻烦。到底这种方法能省钱吗? 生物通小编在这里介绍一下原理和价格,意在给读者一个比较全面的 RNAi 方法小结,是否值得你自己看吧。

Ambion 公司的 Silencer siRNA

Construction Kit: 在设计好 21 碱基的 siRNAs 序列 3'端加上 5'-CCTGTCTC-3'序列 (和 T7 引物 3'端匹配), 分别合成这 2 个 29nt 的 DNA Oligos, 最少的量和脱盐纯化就可以。



试剂盒提供的 T7 引物分别和 DNA Oligo 退火, Klenow 大片段补齐得到带有 T7 启动子 + siRNA 序列的 DNA 片段, 分别体外转录, 得到的单链 RNA 产物合并退火, 用 DNase 去除模板, 单链特异的 RNase 消化未配对的单链 RNA 以及配对的 dsRNA 中 5' 突出端的 GGG, 注意, 单链特异的 RNase 对 UU 突出末端是不切的, 所以最后纯化得到的就是你想要的带有 3' 端 UU 突出, 21nt 的双链 siRNA, 可直接用于 RNAi 实验——如果要做同位素标记, 这个方法是兼容常规的同位素标记方法的, 记住不要标记 UTP, 因为试剂盒提供的 UTP 是经过修饰以提高转录效率的。本来也可以直接合成带有最小 T7 启动子序列的 DNA Oligo 的, 但是最小 T7 启动子转录效率比 T7 小, 并且通过和引物退火 Klenow 片段补齐, 就可以节省 2 条 DNA Oligo 的合成, 合成长度也短很多。

可惜说老实话, 试剂盒也是奔驰价格, 超辣手, 按照 07 年报价, 9158 元/15 次, 每个 siRNA 合成成本高达 600 元, 每次得到的产物足够做 100 次以上 24 孔板反应。试剂盒胜在提供包括引物、纯化柱, DNase, RNase 等在内的制备 siRNA 需要全部产品, 还包括 GAPDH 对照 siRNA, 保证 RNase free, 除了 DNA 模板。一旦有 DNA 模板, 24 小时内就能随时合成需要的 siRNA。

生物通 eBioTips15: 这个试剂盒其实也有个取巧的办法, 就是设计发夹结构的 shRNA 做 DNA 模板, 每对 siRNA 只需做一次体外转录, 得到 shRNA 再用单链特异的 RNase 消化处理, 也一样可以得到 siRNA, 这样试剂的使用次数就可以翻倍! 每次成本几乎减半 (300 左右), 也可能要牺牲一点得率的——不过这样纯化柱子可就不够用了, 要自己做异丙醇沉

淀或者另外配了。这里的试剂也可以自备, 不过要保证 RNase free, 一定每步都严防死守 RNase。

前面介绍过的 Promega 的 T7 RiboMAX Express RNAi System 不单可用于长双链 RNA 合成, 也可以用于直接体外转录 siRNA。

Promega 的设计是用户自行合成带有 T7 启动子序列和 siRNA 序列的 DNA, 直接做体外转录。虽然转录只需要 DNA 中的一条作为模板, 实验表明, 双链 DNA 模板转录效率远高于单链 DNA 模板, 因此每条单链 siRNA 都需要合成 2 个独立的, 不同的 DNA 双链模板 (共计 4 条单链)。选择目标 siRNA 序列结构为 5'G.N(17).C3', 正义链和反义链 5' 端分别加上 T7 最小启动子序列 (24nt), 合成 4 条 DNA Oligo, 分别退火得到 2 条双链模板, 直接进行体外转录, 得到 2 条 siRNA 单链退火, 去除 DNA 模板, 异丙醇沉淀纯化。试剂盒本身很实惠, 总产量可达毫克级, 3100 多, 每次 20ul 体系足以做 50 次。虽说 DNA 合成现在已经很便宜了, 可是每个 siRNA 需要合成 4 条 43—45 个碱基的 Oligo, 还是有点费用的), 厂家还提供另一取巧的方法——合成带有 T7 启动子的 shRNA, 目的是体外转录得到 shRNA, 这样就只需要合成 2 条 60 多碱基的 Oligo。实验结果显示, shRNA 直接转染后, 基因沉默效果决不亚于 siRNA, 还比较省事呢。

4.3 体外转录+Dicer/RNaseIII 酶切:

我们前面的路线图可以看出, 细胞内的 RNAi 过程是 dsRNA 经过 Dicer 酶降解为 siRNAs, 然后再和其他元件结合为 RISC 发基因沉默。之所以我们这么煞费苦心的设计合成 siRNA 是因为在哺乳动物细胞内不能直接转



染 dsRNA，以免引发非特异的细胞毒抗病毒应答反应。那么在体外模拟 Dicer 酶切过程，将长双链 dsRNA 消化为 siRNAs 混合物后，再将 siRNAs 混合物转染到细胞中，是否行得通呢？答案是可以的。自从出现商品化的 Dicer 酶，以及类似功能的 RNaseIII 后，越来越多人采用这种方法以避免单个 siRNAs 的设计合成和验证这一系列的工作。实验表明，用这种方法得到的 siRNAs 混合物进行 RNAi 实验，目前的结果都没有显示出有细胞毒性，或者非特异干扰其他非目标基因，而且 RNAi 效率和成功率往往比单个 siRNA 更高。基本上，只要你能合成双链 dsRNA，就可以考虑自行配一个 Dicer 酶或者 RNaseIII，直接酶切已经纯化的 dsRNA，得到可用于 RNAi 的 siRNA 混合物。

合成长双链 dsRNA 可选择目标基因上 200—500nt 左右的片断作为模板，可以在两端引入反向 T7 启动子序列，以之作为体外转录的模板；也可以合成两段 5'端分别带有 T7 启动子序列的模板，混合两个模板再进行体外转录。

那么 Dicer 酶和 RNaseIII 这两种酶的使用上区别在哪里呢？体内自然发生的 RNAi 实验是经过 Dicer 酶降解得到 21-23bp 大小的 siRNA，理论上说用 Dicer 酶能更准确模拟哺乳动物细胞内真实的反应产物。只是 Dicer 酶的表达纯化有困难，纯化后的 Dicer 酶活性不高，反应时间比较长，需要 10 多个小时，价格非常贵--Ambion 公司提供的 Dicer 酶 250Unit 价格要 ¥9818。来自 E.coli 的 RNaseIII 酶切 dsRNA 得到的产物比较小，多在 12-15bp 之间，不超过 30bp（这个似乎通过调控 Mg 离子浓度可以令酶切得到稍大的产物），同样不会引发哺乳动物抗病毒应答，也同样能有效引发目标基因沉默，酶切 dsRNA 1 个小时足

够，价格不到 Dicer 的三分之一。

生物通 eBioTips16: dsRNA 模板的长度以 200bp-500bp 为佳。不必是全长基因。有实验表明 200bp-500bp 的 dsRNA 用 Dicer 或者 RNaseIII 酶切后得到的产物比较均一，siRNAs 种类虽然不如较长 dsRNA 酶解产物种类多，不过胜在浓度更高。因而 RNAi 的效率比那些更长片断酶切结果的效率更高。

我们前面提到过根据评估，针对同一目标基因随机设计的 siRNAs 大约有一半能达到 50% 的基因沉默效果，25% 的几率能达到有效的基因表达抑制。一段 200bp 长度的 dsRNA 被消化能得到 7—16 个 siRNAs 混合物，理论上几乎可以肯定能有效诱导 RNA 干扰，已经足够了。另外一个考虑是较小的 dsRNA 在体外转录法合成时比长链更为容易快捷，产量也更高。有人曾来 email 问生物通，目标模板应该选择在基因的什么位置比较好呢？C 端？N 端？还是中间？实验表明这个模板位于基因的哪一端，对 RNAi 结果都没有明显的影响。不过在设计时仍然应该回避已知的调控蛋白结合区域、以及那些高度保守的，和其他基因有同源区域的序列。

生物通 eBioTips17: 带反向 T7 启动子的单一模板在 800bp 以下时无需额外的退火，但是如果是分别带启动子的 2 个模板，无论单管内一起体外转录或者分开转录再混合，或者模板大于 800bp 的转录产物则需要经过 75 度保温 5 分钟后降到室温以帮助退火。

生物通 eBioTips18: Dicer 或者 RNaseIII 酶切产物需要经过 DNase 消化去除模板，RNase 去除未匹配单链 RNA，同样很重要的

是要去除没有被Dicer消化或者消化完全而残留的 dsRNA，如果这些较长的 dsRNA 混入 siRNAs 混合物中转染，就有可能引发非特异的细胞毒应答。

RNaseIII 价格比较:

New England Biolabs 的 ShortCut

RNaseIII: ¥1260/130Unit, ¥5040/650Unit

Ambion RNaseIII: ¥3053/250Unit

Epicentre: ¥663/50Unit

试剂盒比较:

Ambion Silencer siRNA Cocktail Kit

(RNase III), 2007 年价格 7053, 20 次反应, 每次得到的产物足够做 100 次以上 24 孔板反应。试剂盒包含体外转录所需试剂, RNaseIII, DNase, siRNA 纯化柱 (去除未降解完全的 dsRNA), 还有 GAPDH 模板以制备正对照的 siRNA 混合物。

New England Biolabs 有个 ShortCut

RNAi Kit, 实际上就是前面介绍的 HiScribe 长双链 RNA 体外转录试剂盒加上 130 个单位的 ShortCut RNaseIII 和 siRNA 分子量 Marker, 这个 RNaseIII 酶切得到的是 18-25bp 的双链 RNA 产物, 130Unit 足够酶切 100ug 的 dsRNA, 以 24 孔板为例整个试剂盒足够做 100

次转染。由于不带纯化柱等试剂, 需要自己另配, 不过就比较灵活些。这个 Kit 配的 RNaseIII 未免少了些---整个体外转录试剂盒最高可以合成 2mg 的 dsRNA, Kit 里配的 RNaseIII 却只够处理 100ug 的 dsRNA。价格 5040 人民币。不那么划算。

Roche 的 X-tremeGENE RNAi Dicer Kit,

也是建议用 PCR 方法制备带有 T7 启动子的目标模板, 体外转录, Dicer 酶切, 去除未降解完全的长 dsRNA 以免引发非特异反应, 最后纯化 siRNA。包含足够做 10 体外转录和 Dicer 酶切, siRNA 纯化所需的完整试剂, 每次反应得到 10-30ug siRNA 混合产物, 价格 7326。每 1ug siRNA 相当于 70pmol 左右 (21bp)

生物通 eBioTips19: PCR 制备带有 T7 启动子的 DNA 模板时,

可在引物 5'端加入 24-26 碱基的 T7 启动子序列, 通常再接 25 个基因特异的序列, 如果是质粒载体做 PCR, 20 个基因特异的碱基就可以了。

生物通 eBioTips20: Dicer 酶不可以过量,

否则会得到更碎的产物。由此可以联想, 大幅减少 RNase III 酶的量, 延长反应时间, 是否会得到较长的产物?



New genomewide solutions from QIAGEN provide potent, specific siRNAs and matching, ready-to-use, validated primer sets for SYBR® Green based real-time RT-PCR assays.

- One database — easy online access to RNAi and gene expression solutions at the GeneGlobe™ Web portal
- Two matching solutions — siRNAs and matching real-time RT-PCR assays you can rely on
- Three complete genomes — siRNAs and RT-PCR assays are available for the entire human, mouse, and rat genomes



Gene Company Limited
基因有限公司

A Gene Group Company

