2. 体内 shRNA 表达及对付难以转染的细胞株、原代细胞，完全分化静止细胞之策略二

除了质粒载体，shRNA 还可以用病毒载体表达。由于病毒感染细胞的效率远远高于任何转染试剂，对付那些难转染的细胞系，原代细胞，彻底分化的静止细胞等，病毒载体是除电转之外的另一个选择，病毒载体也是动物活体内表达 shRNA 的手段之一。目前最常用的哺乳动物细胞病毒载体包括：逆转录病毒(Retrovirus)，腺病毒(Adenovirus)，腺相关病毒(Adeno-Associated Virus,AAV)，和慢病毒(Lentivirus)。其中逆转录病毒和慢病毒等载体还可以用于构建整合到染色体上的稳定的长期基因沉默细胞株。为安全起见，通常病毒基因组中的重要元件都被拆分到 2-3 个载体中，一个用于构建外源基因插入的重组载体，一个包括其他病毒蛋白或者包装元件，在实验中共同转染到包装细胞中，最后包装成为具有感染力同时携带重组基因信息的重组病毒；最后用重组病毒感染目标细胞株。在几个病毒体系中，以慢病毒和腺病毒载体最有代表性。慢病毒是逆转录病毒的一种，具有逆转录病毒的几乎全部优点，可以整合到染色体稳定表达，也可以感染包括静止期细胞在内的各种细胞，更优于传统的逆转录病毒。而腺病毒则以游离染色体外做瞬时表达而见长。

腺病毒 shRNA 载体：腺病毒可以非常高效感染多种哺乳动物细胞株和组织，由于其感染不受细胞周期限制，可以感染分裂期或者非分裂期细胞，因而特别适合连逆转录病毒也难以对付的完全分化的静止期细胞。由于不能整合到染色体上，因而不能作为长期稳定表达 shRNA 之用，不过也因此减少了插入突变的风险，有短期治疗的前景。腺病毒容易引起哺乳动物的免疫应答。腺病毒 shRNA 载体操作需要将目标 shRNA 克隆到线性病毒载体中，和辅助质粒共转染 HEK293 包装细胞，得到包含 shRNA 表达框的病毒颗粒，然后感染目标细胞。Ambion 公司的 pSilencer™ adeno 1.0-CMV System 是选择 CMV 启动子，5 次转导价格 8800 多，包含构建载体转染包装细胞用的转染试剂等在内的全套系统腺病毒载体构建相关试剂，但是不含包装细胞。

生物通 ebioTips24: HEK293 包装细胞的活力对病毒的产生和产量影响很大，传代数越小越好，40 代以上的不要用。10 代以内为好。

逆转录病毒 shRNA 载体：想要建立长期稳定的 shRNA 表达细胞株，研究长期基因沉默，逆转录病毒是更适合的选择。由于可以随机插入基因组中，得到稳定的 shRNA 表达细胞株，因而可以长效干扰目标基因表达。不过由于随机插入，也有插入突变的风险。逆转录病毒可以感染广泛的哺乳动物细胞株和组织，可以用于体内或者体外 RNAi 实验。由于逆转录病毒的感染以来细胞分裂周期，所以不能用于彻底分化的非分裂期细胞。实验步骤包括将目标基因 shRNA 对应的回文结构 DNA 序列插入线性载体中，转染包装细胞，得到的病毒颗粒就可以用于感染目标细胞株。Ambion 的逆转录病毒载体有 U6 和 H1 这 2 种启动子可供选择，pSilencer. 5.1 Retro（20 次反应）价格 4249，只包括线性化病毒载体和正对照载体颗粒，负对照空白载体，DNA 退火 Buffer，不含包装细胞。

慢病毒 shRNA 载体：慢病毒 Lentivirus 是逆转录病毒的一种，可整合到染色体上，也很少引发干扰素响应，经过改造后，可以感染几乎任何一种细胞，包括静止期的细胞如神经

细胞，因而兼具前面几种病毒载体的优势，优于传统的逆转录病毒。如果你的实验不必担心整合到染色体上的问题，又需要长期基因沉默效果，目标细胞又很难转染，那慢病毒可以说是非常理想的选择。不过也要留意染色体上随机插入整合可能导致沉默效果的差异，也可能导致非预期的结果，特别后面一个问题也限制了其在治疗的应用。慢病毒转导效率一般 90%以上，可以高达 100%。如果实在不确定你的细胞是否可以用慢病毒转导，可以PubMed(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/)查。

慢病毒 shRNA 载体 Sigma、Dharmacon 和 Invitrogen 公司都有，各有特色。Sigma 公司的 Mission TRC shRNA 慢病毒提供的是已经设计好、克隆、测序验证过、包装好的病毒颗粒，质控滴度达到 1x106 TU/ml，实际平均滴度更高，买来即可马上用于转导难对付的目标细胞，由于省掉了设计、Oligo 合成、克隆筛选和测序，还有讨厌的病毒包装步骤，可谓超级方便。Mission TRC shRNA 慢病毒库是基于麻省理工(MIT)和哈佛等 11 个著名研究所及制药公司组成的 RNAi 协会(The RNAi Consortium, TRC)研发的强大技术平台，其中包含靶向人类 15000 个基因对应的 75000 个 shRNA（每个基因平均对应 5 个 shRNA）克隆，和小鼠 15000 个基因对应的 75000 个 shRNA 克隆。

Mission 慢病毒主要元件分别位于 3 个载体上，信号和顺势作用元件位于 Transfer 载体上，shRNA 对应的 DNA 序列就克隆在这个载体上的 LTR（long terminal repeat）之间，启动子是 U6 启动子；所有病毒结构和复制必须的元件都克隆在另外的 Packaging 载体中；envelop 载体包含各种衣壳蛋白组分，还包含了 VSV-G (glycoprotein of vesicular stomatitis virus)蛋白，使得包装出来的重组病毒颗粒可以感染几乎任何一种细胞，包括非分裂的，彻底分化的细胞。这 3 种载体一起共转染包装细胞 HEK293，只有 Transfer 载体上的 LTRs 之间的序列被包装组合成重组病毒颗粒。利用重组病毒颗粒感染目标细胞，LTRs 间的序列会整合到染色体中，使得目标 shRNA 得到稳定持续的表达。如果你的研究目标是人或者小鼠基因，那 Mission 真是方便之选。

大名鼎鼎的**Dharmacon**公司也和慢病毒载体的专业公司Lentigen合作，提供用户定制的shRNA慢病毒颗粒，只要用户提供基因的ID，Dharmacon公司就可以帮你设计好shRNA，构建shRNA载体，测序、包装制备得到滴度高达 10^8 TU/ml的病毒颗粒，你可以立即用于实验。同样是嘌呤霉素筛选标记，启动子是sCMV，还有TurboGFP报告基因，可以用流式细胞仪测定转导效率。VSVg包装蛋白使得该慢病毒体系几乎可以感染绝大多数的细胞，包括非分裂的静止期细胞。慢病毒转染效率一般 90%以上，可以高达 100%。不过具体实验前也需要摸索条件，包括MOI，Polybrene的浓度，细胞密度等。

生物通 ebiotips25: 感染复数 Multiplicity of infection (MOI)通俗的说是指有效转导时每个细胞需要病毒的颗粒数；Polybrene 和 Hexadimethrine bromide （海美溴铵，HDB）通属于多价阳离子聚合物，凝聚胺，可用于中和细胞膜上电荷从而提高转导效率 2-8 倍。确定好细胞密度，MOI，Polybrene 后，按比例将病毒颗粒加入培养细胞中，温育 4-19 小时就可以。

Invitrogen 公司提供的 BLOCK-iT 慢病毒 shRNA 表达载体，借助 Gateway 技术构建，将 shRNA 序列克隆到 Entry 载体、测序验证后，可以通过同源重组的方法将 shRNA 表达

框架转移到慢病毒 DEST 载体中。采用 BLOCK-iT 自行构建任何自己感兴趣的目标基因 shRNA 病毒颗粒，但从实验的角度来说，如果不是非要诱导表达，不妨优先选择 Sigma Mission TRC shRNA 现成的病毒颗粒，毕竟包装病毒还是件很费钱很费力的工作。

3. 质粒 DNA 的转染

质粒 DNA 的转染本身和 RNAi 实验并不直接关联，生物通在新技术专栏里有做过转染专题，里面有介绍各类转染试剂的特点和价格。我们在这里不再重复。当然，时隔两年，不断有新的产品推出，生物通将于近期重新整理添加补充新品信息。至于有无必要专门用于 shRNA 质粒载体的转染试剂？答案自然是不需要的。

但是有一种情况例外，就是将 siRNA 和质粒共转染细胞，我们前面有介绍几种可用于共转染的转染试剂。

MISSION™ shRNA Libraries由麻省理工和哈佛等11个著名研究所及制药公司組成的RNAi协会《The RNAi Consortium, TRC》所研发，共包括靶向人和小鼠各15,000个基因的150,000个预制的shRNA克隆，可用于瞬时和/或稳定的转录沉默实验，是研究基因功能以及探索开发新药的强大技术平台。**Sigma-Aldrich于2005年3月成为RNAi协会的一员，参与这一技术平台的研发与生产，并负责推广与销售。**

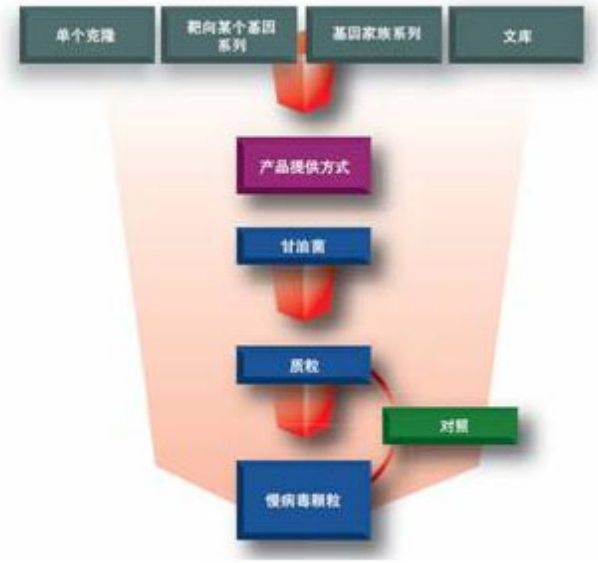
产品特点：

- 全面，针对每个基因有3-5个不同位点的克隆
- 经济，质粒可复制
- 灵活，可用于瞬时或稳定的RNAi试验
- 慢病毒颗粒，让转染率低不再是问题
- 质量保证，每个克隆都经过测序验证

您可以输入基因的RefSeq No, Gene Symbol等信息查找该靶基因相关的系列。每个系列包括3－5个克隆，最大可能地覆盖了基因序列，以便于结果分析。某些系列还包括针对基因 3'-UTR的shRNA克隆，可用于phenomic rescue 实验，使您的实验更严谨。

- 搜索单个靶基因系列
- 也支持同时搜索多个靶基因系列

Gene Family Sets 靶向某个基因家族的系列
Target Sets & Individual Clones 靶向某个基因的系列& 单个克隆



The RNAi Consortium (TRC)-- 致力于研究与推广RNAi技术平台的国际性组织

- **Academic Institutions**
  - Broad Institute, MIT/Harvard
  - Massachusetts General Hospital, Harvard
  - Dana Farber Cancer Institute, Harvard
  - Whitehead Institute, MIT
  - Washington University
  - Columbia University
- **International Life Science Organizations**
  - Sigma-Aldrich
  - Novartis
  - Eli Lilly
  - Bristol-Myers Squibb
  - Academia Sinica, Taiwar

Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司
热线电话：800-819-3336
sigma-aldrich.com
SIGMA