**shRNA载体构建（经典克隆构建方法）**

**流程图**

目的载体的酶切，产物电泳胶回收

从模版上，利用PCR方法调取目的基因

目的基因和载体的连接或者交换

连接或者交换的产物转化，筛选阳性克隆

PCR法筛选基因重组克隆

测序和酶切鉴定

**基因信息**

基因名称： Pyruvate carboxylase [NM\_012744.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NM_012744.2" \t "_blank)

物种： Rat

* 1. **实验材料描述**

**1.1 主要试剂**

试剂名称 试剂来源 cat.No

1kp DNA ladder Marker gene

250bp DNA ladder Marker gene

琼脂糖 bio-rad

in-Fusion™ PCR Cloning Kit clontech

Taq polymerase NEB

dNTP gene

Primer 上海杰瑞

限制性内切酶 NEB，fermentas

Plasmid 抽提 Kit OMEGA

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒 OMEGA

1.2 主要仪器及器材

仪器名称 仪器来源 cat. No.

PCR仪 takara

positive clone 测序 gene

稳压DNA电泳仪 北京六一

凝胶成像仪 天能公司

细菌摇床

细菌培养箱

Gilson移液器 吉尔森公司

高速离心机

一次性平皿

1L烧瓶

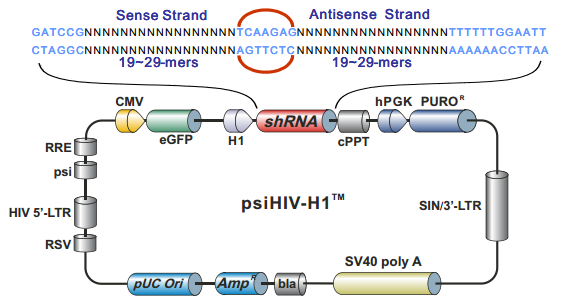
50 ml 聚丙烯管

* 1. **载体信息和酶切：**

载体名称： CH1

元件顺序： CMV-eGFP-H1-shRNA-hPGK-Puro

载体图谱：可下载载体说明书

****

2.1 DNA片段和载体的酶切

* 1. **目的基因片段的获取**
  2. **引物设计**

|  |  |
| --- | --- |
| **ID** | **seq** |
| PF: | 5’--gatccgtgaagcctaccttattggctcaagaggccaataaggtaggcttcattttttgg--3’ |
| PR: | 5’--ttaaggttttttacttcggatggaataaccggagaactcggttattccatccgaagtgc--3’ |

* 1. **PCR反映条件**

3.2.2 PCR反应体系的建立：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 试剂名称 | 体积 |
|  | STE buffer | 2ul |
|  | 引物（5pmol/L） | 2μl |
|  | ddH2O | 16μl |
|  | total | 20μl |

3.2.3 PCR 反应程序：

|  |  |
| --- | --- |
| 95℃ | 5min |
| 95℃ | （-1）20sec  70 cycle |
| 94℃ | （-1）20sec |
| 25℃ | 7min |

注：（-1）表示每个循环降低1℃。

3.2.4 PCR反应完毕后，加30ul H2O稀释PCR产物。

* 1. **PCR结果**

3.3.1 电泳图谱

**4.PCR产物和质粒载体的连接：**

将下列试剂放于冰盒中溶解，将各组分在1.5ml离心管内混匀，室温连接30 sec后，取3ul用于转化：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 试剂 | 用量 |
|  | 载体（300ng/μl） | 0.5μl |
|  | PCR产物 | 5μl |
|  | 10×Ligase buffer | 1μl |
|  | T4 DNA Ligase | 1ul |
|  | ddH2O | 补至10μl |

5 大肠杆菌的转化及重组菌的筛选

5.1 将感受态细胞从-80℃冰箱取出置于冰中融化。

5.2 于超净工作台中取出灭菌的1.5ml离心管，用marker笔在其管盖上标记相应的编号。

5.3 用移液枪取5μl连接产物到已标记好的1.5ml离心管的底部，置于冰中。

5.4 于超净台中用移液枪将融化的感受态细胞混匀，取50μl加到步骤3中的1.5ml离心管的底部，冰浴30min。此时将水浴锅设置为42℃。

5.5 静置于42℃水浴锅中热激45sec，迅速转移到冰盒冰浴2-4min。

5.6 于超净工作台中点燃酒精灯，用移液枪加入400μl的S.O.C培养基，然后放入37℃摇床，225rpm培养1h。

5.7 从摇床中取出转化物于超净台中用移液枪取200μl到相对应的已标记好的LB平板上，将转化物涂匀涂干后，将LB平板倒置放入37℃恒温培养箱，培养12-16h。

5.8 菌落图：

6 PCR法筛选基因重组克隆

6.1 将LB平板倒置，常温下随机挑选平板上的单克隆并编号。

6.2 每个PCR管里分装16μl ddH2O和1μl载体引物（5pmol/μl，引物序列见克隆说明书datasheet），用枪头在LB平板上轻点；然后将沾有菌体的枪头置于相应的PCR管中吹打数下。

6.3 将PCR其他组分配成PCR mix分装于每个PCR管里，使总体积达到25μl，然后混匀，盖紧管子。PCR配方如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 试剂名称 | １×体积 |
|  | 10×PCR buffer | 2.5μl |
|  | dNTP(25mM) | 0.2μl |
|  | Mg2+（50mM） | 0.75μl |
|  | rTaq | 0.2μl |
|  | ddH2O | 4.35μl |
|  | total | 8μl |

6.4 将混有菌体的PCR混合物短暂离心后置于PCR仪中，PCR反应程序如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 94℃ | 5min |
| 94℃ | 30sec  25 cycle |
| 58℃ | 30sec |
| 68℃ | 2min |
| 68℃ | 10min |

6.5 电泳检测PCR产物，对照marker估计DNA片段的大小，选择出含目的DNA片段的阳性克隆。

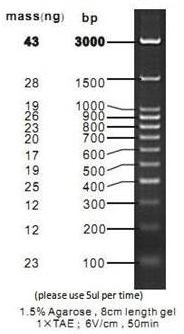
 

图1 菌落PCR图 图2 Marker 100

Lane1：Marker 100; Lane2：菌落PCR1； Lane3：菌落PCR2； Lane4：菌落PCR3；

6.6 挑选阳性克隆接种到5ml LB/含抗生素的液体培养基中，37°C搖床培养12-16h，准备提取质粒。

7 用OMEGA的E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I提取质粒DNA；

8 送去测序,结果分析：

RSH049071-CH1 GAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC 60

seq ------------------------------------------------AAGAACGGCATC 12

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC 120

seq AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC 72

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 TACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG 180

seq TACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG 132

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTG 240

seq AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTG 192

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 GAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGCTCGAG 300

seq GAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGCTCGAG 252

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 TGCGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTG 360

seq TGCGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTG 312

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGATCGCAATA 420

seq ATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGATCGCAATA 372

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 TTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGG 480

seq TTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGG 432

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 GAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGGATCCGTGAAGCCTACCTTATTGGCTCAAGA 540

seq GAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGGATCCGTGAAGCCTACCTTATTGGCTCAAGA 492

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

shRNA sequence

RSH049071-CH1 GGCCAATAAGGTAGGCTTCATTTTTTGGAATTCGCGGCCCTAGCTTGGGATCTTTGTGAA 600

seq GGCCAATAAGGTAGGCTTCATTTTTTGGAATTCGCGGCCCTAGCTTGGGATCTTTGTGAA 552

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 GGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTC 660

seq GGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTC 612

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 TAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTAGCTGCATATGCTTGCTG 720

seq TAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTAGCTGCATATGCTTGCTG 672

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 CTTGAGAGTTTTGCTTACTGAGTATGATTTATGAAAATATTATACACAGGAGCTAGTGAT 780

seq CTTGAGAGTTTTGCTTACTGAGTATGATTTATGAAAATATTATACACAGGAGCTAGTGAT 732

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

RSH049071-CH1 TCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCACAGTCCCAAGGCTCATTTCAGGCCCCTCAGTCC 840

seq TCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCACAGTCCCAAGG---------------------- 770

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*