siRNA 文库存储板的制备方法

Preparation of whole genome siRNA library

杨荣超, 韩帅, 陈铭*

化学生物学平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心

*通讯作者邮箱: chenm@sibcb.ac.cn

引用格式: 杨荣超, 韩帅, 陈铭. (2020). siRNA 文库存储板的制备方法. *Bio-101* e1010848. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010848.

How to cite: Yang, R.C., Han, S. and Chen, M. (2020). Preparation of whole genome siRNA library . *Bio-101* e1010848. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010848. (in Chinese)

摘要: 商业化的 siRNA 文库一般以干粉形式存储于多孔板中。使用 siRNA 文库开展细胞水平的筛选实验之前, 需要预先将粉末状态的 siRNA 文库进行溶解, 并稀释到特定浓度, 既便于存储又便于后续转染实验。在文库溶解及制备过程中需要考虑仪器操作的精准范围、减少死体积导致的试剂浪费、避免孔间交叉污染及尽量节约成本等多方面因素。本文介绍了作者单位利用自动化液体工作站将商业化的人和小鼠全基因组 siRNA 文库由粉末状制备成筛选用户可直接用于筛选的实验板的操作流程。

关键词: siRNA 文库, 自动化液体工作站, Biomek FX, 文库制备

材料与试剂

1. siRNA 文库 (Dharmacon)
 - 1.1 G-105005-E2 OTP Human Genome Lot 11170 (38 Plates)
 - 1.2 G-104655-E2 OTP Human Drug Target Lot 11169 (18 Plates)
 - 1.3 G-104675-E2 OPT Human Druggable Subset Lot 11167 (10 Plates)
 - 1.4 G-014655-E2 Mouse Drug Target Lot 11104 (26 Plates)
 - 1.5 G-014675-E2 Mouse Druggable Subset Lot 11105 (11 Plates)
 - 1.6 G-015005-E2 Mouse Genome Lot 11106 (33 Plates)
2. 384 孔存储板 (ABgene, catalog number: AB-0781)
3. Biomek AP384 P30 Tips, Sterile (BECKMAN, catalog number: 719223)

4. Biomek AP384 P30 XL Tips, Sterile (BECKMAN, catalog number: A22287)
5. 加样槽 (Nunc, catalog number: 370906)
6. 条形码标签 (BDY, catalog number: PTL-81-488)
7. 条形码标签打印色带 (BDY, catalog number: R4310)
8. 一次性试剂瓶 (Corning, catalog number: 430518)
9. 可撕铝膜 (安捷伦 PlateLoc, catalog number: 24210-001)
10. 胶膜 (典奥 Tekon, catalog number: NEXUS XPeel)
11. 5× siRNA Buffer (Thermo, catalog number: B-002000-UB)
12. RNase free water (Qiagen, catalog number: 129117)
13. 去除 RNA 酶的清洁剂 (Invitrogen, catalog number: AM9780)
14. 高纯氮气
15. 1× siRNA buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 大型液体工作站 (Beckman, model: Biomek FX)
2. -80 °C 冰箱 (Thermo, model: 995)
3. 打标机 (Brady BMP61)
4. 离心机 (Agilent Centrifuge)
5. 储板机 (Thermo Fisher, model: Cytomat24 Hotel System)
6. 撕膜机 (Nexus, model: XPeel)
7. 封膜机 (Agilent, model: PlateLoc)

软件

1. Biomek software

实验步骤

所购买 siRNA 文库规格为每孔 0.25 nmol，以干粉形式存储于 PP 材质的 384 孔存储板内。为制备成最终可以直接分装至细胞实验板内开展 RNAi 筛选的 siRNA 溶液，我们利用 Beckman 公司的 Biomek FX 自动化液体工作站，按照图 1 所示步骤，首先使用 1× siRNA 缓冲液充分溶解 siRNA 粉末制备成母板 (5 μM)，然后依次按照 1:5 和 1:10

的稀释比例分别制备成子板 (1 μM) 和工作板 (0.1 μM)，稀释步骤均使用 1 $\times$ siRNA 缓冲液。在开展筛选实验前，将工作板内的 siRNA 整板转移至筛选项目所用的指定实验板内用于整板转染和筛选。

图 1. 粉末态 siRNA 文库溶解、稀释及分装流程示意图

注:本文在文库制备过程中涉及到子板制备和工作板制备两步稀释的步骤，优点在于可尽量减少板内试剂反复冻融的次数。按照此流程，1 套工作板仅用于两轮筛选（每轮筛选按 3 个重复计算）。但此制备流程成本偏高，考虑到降低成本，本单位还采用过一步稀释的制备步骤，即将粉末态文库溶解至 5 μM 的母板后，直接 1:25 稀释制备成 0.2 μM 的工作板，最终每孔 5 μl 加至细胞实验板用于筛选。按一步稀释的流程，1 套工作板可用于 4 轮筛选。从多个 siRNA 筛选项目的结果来看，两种文库制备流程均可得到质量合格的 siRNA 筛选文库 (Mao et al., 2016; Li et al., 2017; Lu et al., 2019; Wang et al., 2019; Tang et al., 2020)。

下文将详细介绍利用 Biomek FX 液体工作站实现从粉末板经两步稀释步骤获得工作板的具体实验流程 (注意以下操作均在无菌环境下进行)。

一、准备工作

1. 打标及贴标

将实验所需多孔板贴上条形码标签；

2. 放置程序所需耗材

2.1 将储板机的存储架取下来，放入程序运行所需枪头盒，注意放置位置与程序设置完全一致；

2.2 放入程序运行所需的新板子，注意多孔板的 A1 孔按照存储架标注的方向放入，

避免方向颠倒；

2.3 开紫外灯，照射 1 h，风机吹 20 min 后关风机；

2.4 将母板（干粉，0.25 nmol）放至室温平衡，2000 × g 离心 1 min，放置到存储架中对应的位置上。

3. 准备 1×siRNA buffer（根据当天所需用量配制，使用试剂槽作为容器有一定死体积，最好比实际需要量多配 100 ml），一块粉末板从溶解到制备 2 块子板，再到制备 3 块工作板实际所需 1×siRNA 缓冲液的用量为 123 ml（见表 1）：

表 1. 处理 1 块母板所需 1×siRNA 缓冲液的用量

板子类型	1×siRNA buffer 用量 (μl/孔)	一个板=1 个孔× 384
1 块母板	50	123 ml
2 块子板	40 × 2	
3 块工作班	63 × 3	

二、溶解粉末板（视频 1，软件程序设置见图 2）

1. 手动将盛有 1× siRNA 缓冲液的试剂槽放在 Biomek FX 操作台面上；
2. 从储板机出枪头盒放至台面指定板位；
3. 从储板机出母板：送至撕膜机撕膜后放到台面指定位置；
4. 加入 1× siRNA buffer:从缓冲液试剂槽吸取 50 μl/well 溶液加至粉末板制备成浓度 5 μM 的母板。
5. 收回母板：母板至封膜机封膜，离心机离心后送回储板机；
6. 枪头盒回储板机；
7. 母板在储板机中室温静止 2 h，使其充分溶解并扩散均匀。

视频 1. 溶解粉末板

图 2. 粉末板溶解程序及操作台面排布图。

三、制备子板、工作板(视频 2, 软件程序设置见图 3)

1. 手动将 1× siRNA 缓冲液试剂槽放在操作台面指定板位;
2. 从储板机送出加缓冲液所需用到的枪头盒摆放至操作台面指定位置;
3. 从储板机出 2 块子板及 3 块工作板, 共计 5 块空白多孔板;
4. 给子板及工作板分别加入 1× siRNA 缓冲液 (子板: 40 μ l, 工作板 63 μ l)
5. 从储板机出第一个程序中溶解对应粉末板时所用的枪头盒;
6. 从储板机出母板:将母板先送至撕膜机撕膜后放到台面指定板位;

7. 母板 20 μ l 吸打 3 次，混匀后封膜离心 $1000 \times g$ 1 min，此步离心是为了去除吸打混匀过程中产生的气泡，避免后续液体操作体积不准；
8. 母板撕膜后取 10 μ l 加至子板，此操作共循环 2 次，制备 2 块子板；
9. 两块子板各吸打 3 次混匀，封膜，离心 $1000 \times g$ 1 min；
10. 子板 1 撕膜后取 7 μ l 加至工作板，此操作共循环 3 次，制备 3 块工作板，吸打混匀；
11. 枪头盒送回储板机；
12. 所有板子送至封膜机封膜后送回储板机。

视频 2. 制作子板工作板

图 3. 稀释分装程序及操作台面排布图

四、收板

1. 从储板机 (cytomat24) 上取下所有板子；

2. 离心 1000 × *g*, 1 min;
3. 将制备好的母板、子板及工作板放入-80 °C 冰箱保存。

溶液配方

1. 1× siRNA buffer:
 5× siRNA Buffer (Thermo, catalog number: B-002000-UB) 0.2 L
 RNase free water (Qiagen, catalog number: 129117) 0.8 L
 混匀

致谢

感谢化学生物学技术平台的各位老师和各位研究生同学对实验方法的帮助和改进。已有多个实验室使用由此方法制备的 siRNA 文库开展筛选并发表文章 (Mao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2020)。

参考文献

1. Mao, L., Liu, C. , Wang, Z., Niu, X., Xue, L. and Zhou, Z. (2016). [A genome-wide loss-of-function screening method for minimizing false-negatives caused by functional redundancy](#). *Cell Research* 26 (9): 1067-1070.
2. Li, X., Liu, C. X., Xue, W., Zhang, Y. and Chen, L. L. (2017). [Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection](#). *Molecular Cell* 67(2): 214-227 e7.
3. Lu, Y., Qiu, Y., Chen, P., Chang, H. and Wang, H. (2019). [ER-localized Hrd1 ubiquitinates and inactivates Usp15 to promote TLR4-induced inflammation during bacterial infection](#). *Nature Microbiology* 4(12): 2331-2346.
4. Wang, X., Liu, R., Zhu, W., Chu, H., Yu, H., Wei, P., Wu, X., Zhu, H., Gao, H., Liang, J., Li, G. and Yang, W. (2019). [UDP-glucose accelerates SNAI1 mRNA decay and impairs lung cancer metastasis](#). *Nature* 571(7763): 127-131.
5. Tang, Y., Fang, G., Guo, F., Zhang, H. and Zhou, Z. (2020). [Selective Inhibition of STRN3-Containing PP2A Phosphatase Restores Hippo Tumor-Suppressor Activity in Gastric Cancer](#). *Cancer Cell* 38(1): 115-128 e9.