

siRNA产品使用说明

产品介绍

常规化学合成siRNA为21~23nt的双链小分子RNA，产品为冻干粉形式的即用型试剂。

运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收到产品后，请于-20℃~-80℃保存，冻干粉可以稳定保存一年。
荧光标记的RNA，如FAM等标记的Oligo因为对光敏感，必须避光保存。

使用须知

- 1) siRNA呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先高速离心，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量DEPC H₂O后盖上管盖，震荡溶解。
- 2) 为避免外界因素（包括酶，极端pH或者温度条件等）导致产品降解，所有操作请严格遵循RNA操作规则。实验过程中，产品最好于冰上放置，使用完毕后请于-20℃~-80℃小心保存。
- 3) 使用前瞬时离心，用DEPC H₂O配制成20 μM储存液，分装保存，避免反复冻融（建议不超过5次），实际配置请按照COA文件进行。

对照组的设立

表2 对照组说明

序号	分组	说明
*NC组	阴性对照	阴性对照（NC组）为与目的基因的序列无同源性的普通阴性对照，用于说明 siRNA 作用的特异性，作为分析目的基因 siRNA 作用的参照。
*FAM-NC组	FAM 阴性对照 (荧光标记阴性对照)	使用荧光标记的 siRNA 进行转染，通过标记荧光，可以方便地在荧光显微镜下观察转染情况，用于优化转染条件和评价当前转染条件下细胞的转染效率；一般转染后2~6h可以观察荧光。
Positive	阳性对照	使用已明确有效的 siRNA 进行转染并检测沉默效率，若抑制率高则可说明转染率高且检测方法正常。阳性对照可用于实验系统的检测，确认RNAi实验中转染、RNA提取和基因表达检测方法是否可靠。阳性对照包括GAPDH、Beta-Actin等。
Blank组	正常细胞对照组	未经任何转染处理的细胞，用于观测整个实验过程细胞的生长状态及分析的参考。可根据实验情况设立
Mock组	转染试剂对照组	使用转染试剂进行转染，但不加入 siRNA，用于排除转染试剂对细胞可能的影响及分析参考。

正式实验为实验组、NC组（*必做）和FAM-NC组（*必做），实验组的抑制效果均需与NC组比较。

在预实验中设置Blank组和Mock组，以确认转染试剂及阴性对照无毒副作用，且对基因沉默检测指标无显



著干扰影响。

在预实验中设置FAM-NC组进行转染效率检测，以确定适合的转染试剂及转染条件。

细胞实验建议

- 1) 为了降低细胞密度、试剂用量，转染效率等因素导致的孔间差异，保证实验的可靠性和可重复性，我们建议转染实验中每个转染样品至少设置3个复孔；接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。
- 2) 为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染siRNA的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系，推荐尝试使用几个Lipofectamine™ 2000的浓度，并在20-100 nM范围内改变siRNA的浓度，以确定最佳条件。
- 3) 在30~50%细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后24~72h进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间更长的间隙更长，从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性，高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。
- 4) 不要在转染时的培养基中加入抗生素，因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。
- 5) 为了获得更好的结果，可以使用Invitrogen的Opti-MEM低血清培养基在形成复合物前稀释Lipofectamine™ 2000和siRNA。可以使用荧光标记siRNA帮助优化细胞系的转染条件。一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验都转染荧光标记siRNA，作为转染效率的指示剂。

转染步骤

合适的siRNA : lipofetamin2000比例对核酸的高效转染有重要影响；我们推荐的siRNA :

lipofetamin2000为1 : 0.01-1 : 0.1 (pmol : ul) 。一般情况下，此范围内都可获得高的转染效率。以Lipofectamine™ 2000转染siRNA于24孔板，转染浓度为50 nM为例，其他规格容器转染请参考表2。

1) 接种细胞

贴壁细胞：转染前24h，接种 $1\sim5\times10^4$ 个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞汇合度能够达到30~50%。（注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长。）

悬浮细胞：转染前24h，接种 $1\sim5\times10^5$ 个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时细胞数量应在 $4\sim8\times10^5$ /孔。

注：

- A) 不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量，密度需要依据细胞类型，培养时间，实验目的而定；
- B) 每孔接种的细胞数量应尽量相同，使细胞均匀分布。
- C) 由于自身特性问题，悬浮细胞相对较难转染，需要优化转染条件以便提高转染效果，如果细胞特殊，可更换为电转方式。

2) 转染步骤（以24孔，siRNA终浓度50 nM为例，见表3 蓝色底纹*）

- A) 用50 μ L Opti-MEM稀释1.25 μ L siRNA储存液（20 μ M），轻轻吹吸3-5次混匀，此为V2。
- B) 用50 μ L Opti-MEM稀释1.0 μ L Lipofectamine™ 2000（使用前轻轻摇匀），轻轻吹吸3-5次混匀，室温下静置5min，此为V3。
- C) 混合转染试剂V3和siRNA稀释液V2，轻轻吹吸3~5次混匀，室温下静置20min。
- D) 转染复合物（V2+V3）加入到含有细胞及培养液（V1，约400 μ L）的24孔细胞板中，100 μ L/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。
- E) 细胞板置于37°C、5% CO₂培养箱中培养18~48h。转染4~6h后可将培养基换为含血清的完全培



培养基。

表3 使用 Lipofectamine2000 (Invitrogen) 转染siRNA产品用量参考

	总体积	V1 (Medium)	V2 (含 siRNA)	V3 (含 lipo)	SiRNA 终浓度	siRNA 产品	lipo2000/孔
96-well	100 μ L	50 μ L	25 μ L	25 μ L	100 nM	0.5 μ L	0.25 μ L
	100 μ L	50 μ L	25 μ L	25 μ L	50 nM	0.25 μ L	0.25 μ L
	100 μ L	50 μ L	25 μ L	25 μ L	30 nM	0.15 μ L	0.25 μ L
	100 μ L	50 μ L	25 μ L	25 μ L	20 nM	0.1 μ L	0.25 μ L
	100 μ L	50 μ L	25 μ L	25 μ L	10 nM	0.05 μ L	0.25 μ L
24-well	500 μ L	400 μ L	50 μ L	50 μ L	100 nM	2.5 μ L	1 μ L
	*500 μ L	400 μ L	50 μ L	50 μ L	50 nM	1.25 μ L	1 μ L
	500 μ L	400 μ L	50 μ L	50 μ L	30 nM	0.75 μ L	1 μ L
	500 μ L	400 μ L	50 μ L	50 μ L	20 nM	0.5 μ L	1 μ L
	500 μ L	400 μ L	50 μ L	50 μ L	10 nM	0.25 μ L	1 μ L
12-well	1 mL	800 μ L	100 μ L	100 μ L	100 nM	5 μ L	2 μ L
	1 mL	800 μ L	100 μ L	100 μ L	50 nM	2.5 μ L	2 μ L
	1 mL	800 μ L	100 μ L	100 μ L	30 nM	1.5 μ L	2 μ L
	1 mL	800 μ L	100 μ L	100 μ L	20 nM	1.0 μ L	2 μ L
	1 mL	800 μ L	100 μ L	100 μ L	10 nM	0.5 μ L	2 μ L
6-well	2 mL	1500 μ L	250 μ L	250 μ L	100 nM	10 μ L	5 μ L
	2 mL	1500 μ L	250 μ L	250 μ L	50 nM	5 μ L	5 μ L
	2 mL	1500 μ L	250 μ L	250 μ L	30 nM	3 μ L	5 μ L
	2 mL	1500 μ L	250 μ L	250 μ L	20 nM	2 μ L	5 μ L
	2 mL	1500 μ L	250 μ L	250 μ L	10 nM	1 μ L	5 μ L

注: V1: 完全或不完全培养基;

V2: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素, 转染专用) 含 siRNA储存液;

V3: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素, 转染专用) 含 lipo2000

表中数据仅供参考, 对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化。

siRNA 效果检测

转染完成后24~72h可进行siRNA沉默效果检测, 最佳检测时间与细胞类型, 转染试剂, 检测目的等相关。

- 1) RNA水平的检测: mRNA检测siRNA沉默效率的最佳指标, siRNA转染后24~72h即可检测到靶基因mRNA表达明显降低, 检测方法宜采用QPCR检测方法。注:引物设计质量很重要, 需要确保检测引物有效性。
- 2) 蛋白水平的检测: 蛋白是RNAi沉默效率的重要指标, 其检测手段主要为Western Blot等。检测时间受细胞内蛋白质表达量、半衰期等因素的影响, 一般为48~96h。
- 3) 功能筛选: 可使用EdU细胞增殖、EdUTP细胞凋亡等方法进行细胞功能筛选。



基因沉默效果不好，该如何改善？

改善方法	说明
提高转染效率	成功的转染是 RNAi 实验的前提。若基因沉默效果不佳，则需先排查转染效率方面的问题，可通过检测转染效率或者采用阳性对照 siRNA 验证 RNAi 实验体系。首先可依据转染试剂说明书进行转染条件（细胞密度，转染试剂用量，转染时间 等）优化尝试，其次可尝试在其他细胞类型上进行转染。若由于实验模型限制无法使用其他细胞，可考虑更换转染试剂或转染方法（如电转）。
检测目的基因表达水平	若目的基因在实验细胞中的表达丰度很低，是难以得到有效的沉默的。一般目的基因与 GAPDH 或 ACTB 的 ΔCt 值为 10 以内，比较适合做 RNAi，若 ΔCt 值达到 15 以上则无法得到有效的沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况，建议更换实验细胞。
优化 siRNA 浓度	siRNA 在一定的丰度下才能达到理想的作用效果，故可根据推荐浓度（50 nmol）进行预实验测试，再结合实验细胞系类型及目的基因的表达水平设置 siRNA 浓度梯度来优化 siRNA 最适浓度。
检测分析方法有误	引物使用有误，检测时间点设置不合理，对照样本异常，实验样本检测数据不稳定等因素都会对后期实验数据分析造成影响，此类问题需根据具体的问题有针对性地进行分析调整。
更换其他 siRNA	若确定转染效果尚佳，其他因素也分析没有问题的情况下，却没有达到理想的基因沉默效果，则可以尝试更换其他 siRNA 来测试。由于 RNA 本身序列特性，或者靶位点的二级结构复杂等因素，有些 siRNA 的基因沉默效果可能没有那么显著，这种情况下可以尝试更换 siRNA。
其它原因	如目的基因的表达调控特性导致其难以沉默，并已排除转染方法，转染效率，基因表达水平及 siRNA 浓度等方面的问题，并尝试过 5 对以上 siRNA，则应考虑更换细胞进行尝试。如无法更换细胞和感兴趣的基因，可以考虑更换为基因敲除的方式进行。

