

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）。

表1 20 μM储存液的配置方法

siRNA (nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积 (μL)	125	250	500	2500

注: 1 OD=2.5 nmol=40 μg，此配置体系仅作为参考，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 $1\sim5\times10^5$ 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 μL	50 μL	25 μL	25 μL	100 nM	0.5 μL	0.25 μL
	100 μL	50 μL	25 μL	25 μL	50 nM	0.25 μL	0.25 μL
	100 μL	50 μL	25 μL	25 μL	30 nM	0.15 μL	0.25 μL
	100 μL	50 μL	25 μL	25 μL	20 nM	0.1 μL	0.25 μL
	100 μL	50 μL	25 μL	25 μL	10 nM	0.05 μL	0.25 μL
24-well	500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	100 nM	2.5 μL	1 μL
	*500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	50 nM	1.25 μL	1 μL
	500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	30 nM	0.75 μL	1 μL
	500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	20 nM	0.5 μL	1 μL
	500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	10 nM	0.25 μL	1 μL
12-well	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	100 nM	5 μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	50 nM	2.5 μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	30 nM	1.5 μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	20 nM	1.0 μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	10 nM	0.5 μL	2 μL
6-well	2 mL	1500 μL	250 μL	250 μL	100 nM	10 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250 μL	250 μL	50 nM	5 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250 μL	250 μL	30 nM	3 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250 μL	250 μL	20 nM	2 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250 μL	250 μL	10 nM	1 μL	5 μL

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。

