

siRNA 产品使用说明

产品简介

生物提供的 siRNA 为化学合成双链小分子 RNA，即用型。

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。使用前请瞬时离心，用 RNase-free Water 配制成 20μM 储存液，分装保存于-20℃~-80℃，避免反复冻融（不超过 5 次）。

表 1 20μM 储存液的配置参考

siRNA	5 nmol	20 nmol
RNase-free Water	250 μl	1000 μl

使用前须知

产品以冻干粉的形式提供，由于影响结晶形态的因素很多，产品外观有些差异，甚至形态无法用肉眼可见，此为正常现象。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。

细胞实验方法

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，一般建议：

- 1) 转染实验中每个转染样品至少设置3个复孔；
- 2) 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，且细胞在各孔的表面平均分布。

1. 转染浓度：

siRNA 产品最佳工作浓度因不同的细胞类型及研究目的而异。

siRNA 初始转染浓度为 50nM，转染后检测

时间为 24~72h。最佳转染效率一般通过设置时间梯度和浓度梯度进行优化，优化的范围建议为 5~100nM。

2. 转染步骤：

以riboFECT™ CP Reagent 转染 siRNA于24孔板，转染浓度为50nM为例，其他规格容器的试剂用量请参考表2，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

1) 接种细胞

a. 贴壁细胞：以Hela细胞为例，接种 1×10^5 ~ 5×10^5 个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%。

b. 悬浮细胞：以THP-1细胞为例，接种 1×10^5 ~ 5×10^5 个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中。

注：①不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量，细胞密度需要依据细胞类型，培养时间，实验目的而定；②每孔接种的细胞数量应尽量相同，使细胞均匀分布。③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

对于每个转染样品，请按以下步骤准备：

- a. 稀释 siRNA：用 30μl 1X riboFECT™ CP Buffer (v2) 稀释 1.25μl 20μM siRNA 储存液 (v3)，轻轻混匀。
- b. 混合液制备：加入 3μl riboFECT™ CP Reagent (v4)，轻轻吹打混匀，室温孵育 0~15min，制备成转染复合物。

注：①请勿振荡，溶液可能会有浑浊，但不会影响转染；②混合液可室温放置一段时间，但不应超过 24h。

c. 将 *riboFECT*TM CP 转染复合物加入到适量无双抗完全培养基 (v1) 中, 轻轻混匀。

注: *riboFECT*TM CP 转染复合物加入至原细胞培养基中一般无需移除或更换, 但亦可依据具体实验情况进行优化。

d. (可选) 进行其他必要的特殊处理 (如加药处理)。

e. 将培养板置于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 24~96h (培养时间与实验目的相关)。

表 2 使用 *riboFECT*TM CP 转染 siRNA 用量参考

v1: 细胞培养基; v2: 1X *riboFECT*TM CP Buffer; v3: 20μM siRNA; v4: *riboFECT*TM CP Reagent

	siRNA 终浓度	每孔体积	培养基 (v1)	Buffer (v2)	siRNA (v3)	Reagent (v4)	
96-well	100nM	100μl	92.90μl	6μl	0.5μl	0.6μl	
	50nM	100μl	93.15μl	6μl	0.25μl	0.6μl	
	30nM	100μl	93.25μl	6μl	0.15μl	0.6μl	
	20nM	100μl	93.30μl	6μl	0.1μl	0.6μl	
	10nM	100μl	93.35μl	6μl	0.05μl	0.6μl	
24-well	100nM	500μl	464.50μl	30μl	2.5μl	3μl	
	*	50nM	500μl	465.75μl	30μl	1.25μl	3μl
	30nM	500μl	466.25μl	30μl	0.75μl	3μl	
	20nM	500μl	466.50μl	30μl	0.5μl	3μl	
	10nM	500μl	466.75μl	30μl	0.25μl	3μl	
12-well	100nM	1ml	929.00μl	60μl	5μl	6μl	
	50nM	1ml	931.50μl	60μl	2.5μl	6μl	
	30nM	1ml	932.50μl	60μl	1.5μl	6μl	
	20nM	1ml	933.00μl	60μl	1μl	6μl	
	10nM	1ml	933.50μl	60μl	0.5μl	6μl	
6-well	100nM	2ml	1858.00μl	120μl	10μl	12μl	
	50nM	2ml	1863.00μl	120μl	5μl	12μl	
	30nM	2ml	1865.00μl	120μl	3μl	12μl	
	20nM	2ml	1866.00μl	120μl	2μl	12μl	
	10nM	2ml	1867.00μl	120μl	1μl	12μl	

*: 实验参考用量示例, 对于部分细胞类型需要进一步优化。

3. 效果检测:

转染完成后 24~72 小时均可进行 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。

- RNA 水平的检测(RNAi 沉默鉴定标准): siRNA 作用的目标分子是目的基因的 RNA, 在 RISC 系统的作用下剪切目标 RNA, 故检测目的基因的 RNA 水平可直接反应 siRNA 是否发挥了相应的作用, 且通过 qRT-PCR 可计算具体的抑制效率。一般 siRNA 转染后 24~72h 即可检测到目的基因 RNA 表达明显降低。注: 引物设计质量很重要。
- 蛋白水平的检测: 对于蛋白编码基因, 还需检测相应的蛋白表达水平, 以确定是否目的蛋白也成功下调。由于蛋白表达水平的变化受多个因素影响, 有时候会出现 RNA 水平成功抑制了而蛋白水平变化不明显的情况。若蛋白表达水平下降不明显, 需认真检测其 mRNA 的表达水平, 用于判断 RNAi 不理想的原因。
- 功能筛选: 应用 EdU 细胞增殖、EdUTP 细胞凋亡等检测方法进行 siRNA 对细胞功能的直接筛选。

动物实验方法

动物模型：根据实验需要选择合适的动物模型（表3）。

修饰方式：由于动物实验对 siRNA 稳定性的要求较高，尽管未修饰的 siRNA 也可以进行动物实验，但是以 Chol, OMe, PS 修饰的 siRNA 较多采用。锐博生物经过多年研发，开发出了 5'Chol + 2'OMe 修饰方案修饰的 siRNA，适用于动物实验。

给药方式：局部给药，最直接的导入方式，siRNA 的导入效率较高，用量少，siRNA 能很快被吸收。适用于浅表器官和组织，包括眼、肌肉、皮下组织等。

系统给药，一些无法通过局部给药方式到达的靶位，如内脏，器官以及一些散列分布的靶位（如淋巴细胞，转移性肿瘤细胞等），可使用系统性注射方式，包括心、肝、脾、肺、肾等。

表3 动物 siRNA 实验使用方法参考

Reference	Animal	Tissue	Modification	Doses	Dosing Frequency
Höbel S, <i>et al. J Gene Med.</i> 2010	Mice	Tumor	-F,-OMe,-PS	1.3 µg	Day 0
Jin Hou, <i>et al. Cancer Cell.</i> 2011	Mice		-Chol,-OMe,-PS	10nmol	Twice/week, 4 weeks
M. DiFiglia, <i>et al. PNAS.</i> 2007	Mice	Brain	-Chol,-OMe,-PS	0.5 nmol	Day 0
Zhu J, <i>et al. BMC Neurosci.</i> 2013	Rat		-	0.1nmol	Once every 12 h, 2 days
Kleinman ME, <i>et al. Nature.</i> 2008	Mice	Eye	-Chol,-OMe	1 µg	Day 0
Soutschek J, <i>et al. Nature.</i> 2004	Mice	Liver	-Chol,-OMe,-PS	1.25 mg	Continuous 3 days
Tompkins SM, <i>et al. PNAS.</i> 2004	Mice	Breath	None	20 µg	Day 0
Yuan H, <i>et al. Am J Physiol Renal Physiol.</i> 2008	Mice	Kidney	-Chol,-OMe,-PS	400 µg	Continuous 7 weeks
Gonzalez-Gonzalez E, <i>et al. Gene Ther.</i> 2009	Mice	Skin	None	60 µg	Continuous 12 days
Yichao Wu, <i>et al. Cell Host Microbe.</i> 2009	Mice		-Chol, -PS	2 nmol	Day 0

实验指南

1. 实验对照该如何设置？

正式实验为实验组和阴性对照组（a-b），实验组的抑制效果均需与 NC 组比较。

在预实验中设置对照组（c-d），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。

如果对实验细胞转染效率不甚了解，则需要预实验中设置对照组（d）进行转染效率检测，以确定适合的转染试剂及转染条件。

常用对照组列表：

- a) 实验组：使用目的基因 siRNA 进行转染。
- b) 阴性对照组（NC 组）：使用阴性对照 siRNA 进行转染，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。
- c) 正常细胞对照组（Blank 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。
- d) 转染试剂对照组（Mock 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。
- e) 荧光标记转染对照组：使用荧光对照 siRNA 或转染指示剂进行转染，用于检测当前转染条件下细胞的转染效率。
- f) 阳性对照组：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。

2. 基因沉默效果不好，该如何改善？

1) 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）。

2) 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。

3) 优化 siRNA 浓度

siRNA 在一定的丰度下才能达到理想的作用效果，故可根据锐博生物的推荐浓度（50nmol）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。

4) 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。

5) 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。

6) 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。