

siRNA产品使用说明

——BioTNT 推荐产品

产品简介

生物提供的siRNA为化学合成双链小分子RNA，即用型。

说明书示例：

ID	primerName	senses (5'-3')	Antisense (5'-3')	PackageOD	Package number	Purification	nm/tube	To make 100uM stock, add buffer (ul)
240226M05	AAA	CCCACAGCAGAUGAGAUCACGUAA	UUACGUGGAUCUCAUCGUGUGGG	2	1	HPLC	3.34	33.4
Negative control				0.5	1	HPLC	1.25	12.5
Negative control FAM				0.5	1	HPLC	1.25	12.5
DEPC 水 1ML*1								

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，说明书上有配制100uM需要的加水量，先加入适量的RNase-free Water配制20uM的浓度(本浓度适用于分装和储存)，分装保存于-20℃~-80℃，避免反复冻融(不超过5次)。上面为20d siRNA的说明书示例，nmol 数量根据序列不同，说明提供了进行复溶的加水量。上例中，可以得到167ul的20uM 的siRNA储存液。

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。

表1 20μM 储存液的配置参考

siRNA	100uM	20uM
RNase-free Water	需加入说明书上的水的体积	加入5倍的体积
说明书示例:	加入33.4ul得到	加入167ul得到

推荐使用GoldenTran®-R或者GoldenTran®-DR进行siRNA在细胞中的转染;

产品A: GoldenTran®-R

运输:常温。保存:2-8℃保存一年。

产品说明: GoldenTran®-R是一款新型、性能稳定的siRNA专用转染试剂，它具有较强的压缩RNA的能力，能够把RNA高效率、迅速地转染到真核细胞之中，而不被核酸酶降解。与其他转染试剂相比，具有毒性低、稳定性好、耐血清能力强、转染简单易行、重复性好等优点

应用范围:GoldenTran®-R转染试剂可适用于众多原代培养和转化细胞株的siRNA转染。沉默效率高且性能稳定，在有血清存在的细胞培养基中均能获得非常理想的基因沉默效果。

SiRNA的转染

以24孔板为例，请参考表1的转染规模调整，步骤如下：

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GoldenTran®-R 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。15pmol的siRNA按照储存浓度为20uM，使用量为0.75uL。

1		细胞接种：每孔接种 $0.5\sim 1.0\times 10^5$ 个细胞，细胞培养12~24小时，使转染时细胞密度达到60~70%融合度
2		siRNA稀释：将15pmol的siRNA加入Opti-MEM培养基中，稀释后的终体积为10μL
3		转染试剂稀释：取1μL的GoldenTran®-R加入到9μL的Opti-MEM培养基中，稀释后的终体积为10μL
4		复合物制备：将上述siRNA稀释液和转染试剂稀释液混合，轻轻吹打均匀后，室温静置10分钟
5		将上述20μL复合物加入到24孔板中，轻轻吹打混匀，继续培养18~48小时后检测转染效率，无需更换培养基

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。

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，但不宜超过24h。

*：实验参考用量示例，对于部分细胞类型需要进一步优化。





表1. 不同培养板所需转染试剂和siRNA的用量

培养板	单孔面积	接种培养基	Opti-MEM培养基后终体积	siRNA转染	
				试剂用量	siRNA
96孔板	0.3cm ²	200μL	10μL	0.5μL	7.5pmol
24孔板	2.0cm ²	500μL	20μL	1.0μL	15pmol
12孔板	4.0cm ²	1mL	40μL	2.0μL	30pmol
6孔板	10.0cm ²	2mL	100μL	4.0μL	60pmol

产品B: 产品名称: GoldenTran®-DR

产品名称: GoldenTran®-DR	运输: 常温	保存: 2-8℃保存一年
<p>产品说明: GoldenTran®-DR是一款高性能、高品质的通用型基因转染试剂, 既可用于传递质粒DNA, 又具有较强的RNA转染能力。与其它转染试剂相比, 具有不受血清影响、毒性低、稳定性好、转染简单易行、重复性好等优点。</p>		
<p>应用范围: GoldenTran®-DR转染试剂可适用于众多较难转染细胞株的质粒DNA/siRNA的转染。适用于多种贴壁细胞, 特别适用于各种较难转染细胞如L929、NIH3T3、MCF-7和A549等, 均可得到较高的转染效率, 且重复性好。</p>		

以24孔板为例, 请参考表1的转染规模调整, 步骤如下:

1		细胞接种: 每孔接种0.5~1.0×10 ⁵ 个细胞, 细胞培养12~24小时, 使转染时细胞密度达到60~70%融合度
2		DNA/siRNA稀释: 将0.5μg质粒DNA (或15pmol siRNA) 加入Opti-MEM培养基中, 稀释后的终体积为10μL
3		转染试剂稀释: 取1μL的GoldenTran®-DR加入到9μL的Opti-MEM培养基中, 稀释后的终体积为10μL
4		复合物制备: 将上述质粒DNA (或siRNA) 稀释液和转染试剂稀释液混合, 轻轻吹打均匀后, 室温静置10分钟
5		将上述20μL复合物加入到24孔板中, 轻轻吹打混匀, 继续培养18~48小时后检测转染效率, 无需更换培养基

siRNA的转染:

转染步骤与DNA相同, 请参考表1的转染规模进行调整, 所有数量和体积均是按孔计算。转染高密度细胞可获得高转染效率、高表达水平和低细胞毒性。

质粒DNA和siRNA的转染优化:

可通过改变细胞密度、DNA/siRNA浓度以及GoldenTran®-DR浓度对转染进行优化。保证细胞融合度在60%以上, GoldenTran®-DR(μL): DNA (μg)可以在1:1和5:1之间调整; GoldenTran®-DR(μL): siRNA(pmol)可以在0.02:1和0.15:1之间调整。

表1. 不同培养板所需转染试剂和DNA/siRNA的用量

培养板	单孔面积	接种培养基	Opti-MEM稀释后终体积	DNA转染		siRNA转染	
				试剂用量	DNA	试剂用量	siRNA
96孔板	0.3cm ²	200μL	10μL	0.4μL	0.2μg	0.5μL	7.5pmol
24孔板	2.0cm ²	500μL	20μL	1.0μL	0.5μg	1.0μL	15pmol
12孔板	4.0cm ²	1mL	40μL	2.0μL	1.0μg	2.0μL	30pmol
6孔板	10.0cm ²	2mL	100μL	4.0μL	2.0μg	4.0μL	60pmol
60mm	20.0cm ²	5mL	0.2mL	8.0μL	4.0μg	8.0μL	120pmol
10cm	60.0cm ²	15mL	0.6mL	24.0μL	12.0μg	24.0μL	360pmol

3. 效果检测:

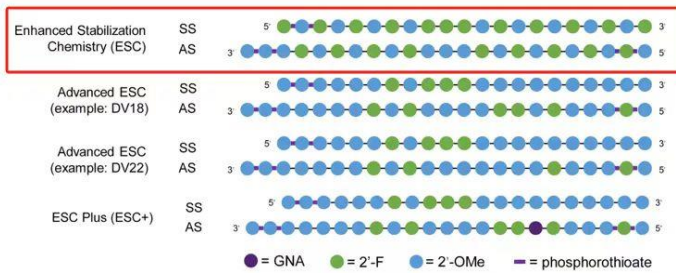
转染完成后24~72小时均可进行siRNA沉默效果检测,最佳检测时间与细胞类型,转染试剂,检测目的等相关。

- a. 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。Biotnt提供mRNA的引物试剂盒和相关的PCRmix体系。
- b. 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。
- c. 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2）。

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ESC 修饰的Chol, GNA, OMe, PS修饰的siRNA较多采用。ESC修饰有标准型,增强DV18, DV22, ESC Plus 等,用户可以先细胞实验,再动物实验进行验证。



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。

产品名称:GoldenTran-vivo 体内DNA和siRNA，尾静脉注射

产品名称:GoldenTran [®] -vivo	运输: 常温	保存: 2-8℃保存一年
<p>产品说明:GoldenTran[®]-vivo是一款体内专用型基因转染试剂，可通过尾静脉注射的方式将基因传送到肿瘤部位。与其它体内转染试剂相比，具有操作简便、体内毒性低、稳定性好、体内循环时间长、靶向性好等优点。</p>		
<p>应用范围:GoldenTran[®]-vivo转染试剂可适用于众多动物肿瘤模型。可携带荧光标记基因、治疗基因等到达肿瘤部位，并在肿瘤部位蓄积和表达。特别适用于各种常规肿瘤模型如HeLa、B16F10、MCF-7、MDA-MB-231和A549等，均可得到较高的转染效率，且重复性好。</p>		

体内转染方法:

以体重为20g的荷鼠为例，请参考表1的转染规模调整，步骤如下:

1		试剂准备: 按照表1用量首先取20μL GoldenTran [®] -vivo放置于样品管中
2		复合物制备: 取40μL的质粒DNA(DNA浓度为0.5μg/μL)或siRNA(1.5nmol)与上述转染试剂进行复合
3	20 min	室温静置20分钟
4		补加葡萄糖注射液: 取140μL的葡萄糖注射液加入到上述复合物溶液中
5		通过尾静脉注射的方式，注射于鼠体内，24~48小时后检测基因在肿瘤部位的蓄积或表达

体内转染条件的优化:

可通过改变肿瘤体积的大小、基因的用量和浓度以及 GoldenTran[®]-vivo 浓度对体内转染进行优化。保证肿瘤体积在 50mm³~200mm³最佳，GoldenTran[®]-vivo (μL): DNA(μg)可以在 2:1 和 0.5:1 之间调整；GoldenTran[®]-vivo(μL): siRNA(nmol)可以在 10:1 和 20:1 之间调整。根据小鼠体重的不同，葡萄糖注射液的补加体积可以在推荐量±30μL 之间调节。瘤内基因蓄积建议在注射后 24 小时检测，瘤内基因表达建议在注射后 48 小时检测。

表1. 不同体重鼠的体内转染用量

鼠体重	建议瘤体积	葡萄糖注射液 稀释后终体积	DNA推荐用量		siRNA推荐用量	
			试剂用量	DNA	试剂用量	siRNA
15g	100mm ³	150μL	15μL	15μg	15μL	1.2nmol
20g	100mm ³	200μL	20μL	20μg	20μL	1.5nmol
25g	100mm ³	250μL	25μL	25μg	25μL	2.0nmol
30g	100mm ³	300μL	30μL	30μg	30μL	2.4nmol

表2 动物siRNA实验使用方法参考

Reference	Animal	Tissue	Modification	Doses	DosingFrequency
Höbel S, <i>et al. J Gene Med.</i> 2010	Mice	Tumor	-F,-OMe,-PS	1.3μg	Day0
Jin Hou, <i>et al. Cancer Cell.</i> 2011	Mice		-Chol,-OMe,-PS	10nmol	Twice/week, 4weeks
M. DiFiglia, <i>et al. PNAS.</i> 2007	Mice	Brain	-Chol,-OMe,-PS	0.5nmol	Day0
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阴性对照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BioTNT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。