

siRNA 产品使用说明

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。

运输及保存：

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。使用前瞬时离心，用 RNase-freeH₂O 或灭菌 ddH₂O 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
溶解体积 (μL)	125	250	500

细胞实验方法：

1. 实验注意事项：

- 1) 如果您是首次转染您的细胞系，建议尝试使用多个 Lipofectamine™ 2000 的浓度，并在 20-100nM 范围内改变 siRNA 的浓度，以获得最佳实验条件；
- 2) 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；
- 3) 转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；
- 3) 建议在 30-50% 细胞汇合度时进行转染；
- 4) 转染时的培养基中不要加入抗生素，否则会降低细胞转染的效率以及导致细胞死亡；
- 5) 建议每次实验使用荧光标记的 siRNA 帮助优化转染条件。

2. 转染步骤：

以 Lipofectamine™ 2000 转染 siRNA 于 24 孔板，转染浓度为 50nM 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，在 400 μL 无抗培养基中接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞，转染时细胞融合度为 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 24 h，在 400 μL 无抗培养基中接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞，转染时细胞数量应在 $4-8 \times 10^5$ /孔。

2) 转染步骤

A. 用 50 μL Opti-MEM 稀释 siRNA（转染细胞的终浓度为 50 nM），轻轻吹吸 3 - 5 次混匀；

- B. 轻轻颠倒混匀转染试剂, 用50 μL Opti-MEM稀释1.0 μL Lipofectamine™ 2000, 轻轻吹吸3 - 5次混匀, 室温下静置5 min;
- C. 混合转染试剂和siRNA稀释液, 轻轻吹吸3 - 5次混匀, 室温下静置 20 min;
- D. 转染复合物加入到24孔细胞板中, 100 μL /孔, 前后轻摇细胞板混合均匀;
- E. 细胞板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养18 - 48 h, 转染4 - 6 h后可换新鲜培养基。

表2 转染siRNA产品用量参考

V1: 完全或不完全培养基; V2: Opti-MEM®I(无血清、抗生素, 转染专用)

	每孔中总体积 (V1+V2+V2)	终浓度	siRNA 产品	Lipo2000/孔
96-well	100 μL (50 μL +25 μL +25 μL)	100nM	0.5 μL	0.25 μL
	100 μL (50 μL +25 μL +25 μL)	50nM	0.25 μL	0.25 μL
	100 μL (50 μL +25 μL +25 μL)	30nM	0.15 μL	0.25 μL
	100 μL (50 μL +25 μL +25 μL)	20nM	0.1 μL	0.25 μL
	100 μL (50 μL +25 μL +25 μL)	10nM	0.05 μL	0.25 μL
24-well	500 μL (400 μL +50 μL +50 μL)	100nM	2.5 μL	1 μL
	500 μL (400 μL +50 μL +50 μL)	50nM	1.25 μL	1 μL
	500 μL (400 μL +50 μL +50 μL)	30nM	0.75 μL	1 μL
	500 μL (400 μL +50 μL +50 μL)	20nM	0.5 μL	1 μL
	500 μL (400 μL +50 μL +50 μL)	10nM	0.25 μL	1 μL
12-well	1mL (800 μL +100 μL +100 μL)	100nM	5 μL	2 μL
	1mL (800 μL +100 μL +100 μL)	50nM	2.5 μL	2 μL
	1mL (800 μL +100 μL +100 μL)	30nM	1.5 μL	2 μL
	1mL (800 μL +100 μL +100 μL)	20nM	1.0 μL	2 μL
	1mL (800 μL +100 μL +100 μL)	10nM	0.5 μL	2 μL
6-well	2mL (1500 μL +250 μL +250 μL)	100nM	10 μL	5 μL
	2mL (1500 μL +250 μL +250 μL)	50nM	5 μL	5 μL
	2mL (1500 μL +250 μL +250 μL)	30nM	3 μL	5 μL
	2mL (1500 μL +250 μL +250 μL)	20nM	2 μL	5 μL
	2mL (1500 μL +250 μL +250 μL)	10nM	1 μL	5 μL

注: 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。

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, 检测目的相关。

- 1) RNA 水平的检测: mRNA 是检测 siRNA 沉默效率的最佳指标, siRNA 转染后 24~72 h 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 48~96 h；
- 3) 功能筛选：应用 EdU 细胞增殖、EdUTP 细胞凋亡等方法进行细胞功能筛选。

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，则需要在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。