

# siRNA 产品使用说明

## 产品简介

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。

使用前瞬时离心，用RNase-free H<sub>2</sub>O或灭菌ddH<sub>2</sub>O配制成 20μM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：1OD duplex=2.5nmols=40μg

## 使用须知：

- 1) siRNA呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先离心，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量RNase-free H<sub>2</sub>O或灭菌ddH<sub>2</sub>O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。

## 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，Biomics 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，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

### 1. 转染浓度：

- 1) 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 20-100nM范围内改变siRNA的浓度，以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件。高浓度的siRNA可能具有细胞系依赖性。
- 2) 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 24-72 小时进行。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。
- 3) 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。
- 4) 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。 可以使用荧光标记的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包括荧光标记siRNA，作为转染效率的指示剂

### 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 24 hrs，在 400 μL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×10<sup>5</sup> 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 hrs，在 400 μL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×10<sup>5</sup> 个细胞，转染时细胞数量应在 4 - 8×10<sup>5</sup>/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 $\mu$ L Opti-MEM 稀释 1.0  $\mu$ L 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  $\mu$ L/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。
- E. 细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18–48 hrs。转染 4–6 hrs 后可换新鲜培养基

**表 2** 使用 lipofectamine2000(invitrogen)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、无抗生素, 转染专用)

	每孔中总体积 (v1+v2+v3)	终浓度	siRNA 产品	lipo2000/孔
96-well	100 $\mu$ l (50 $\mu$ l+25 $\mu$ l+25 $\mu$ l)	100nM	0.5 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
	100 $\mu$ l (50 $\mu$ l+25 $\mu$ l+25 $\mu$ l)	50nM	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
	100 $\mu$ l (50 $\mu$ l+25 $\mu$ l+25 $\mu$ l)	30nM	0.15 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
	100 $\mu$ l (50 $\mu$ l+25 $\mu$ l+25 $\mu$ l)	20nM	0.1 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
	100 $\mu$ l (50 $\mu$ l+25 $\mu$ l+25 $\mu$ l)	10nM	0.05 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
24-well	500 $\mu$ l (400 $\mu$ l+50 $\mu$ l+50 $\mu$ l)	100nM	2.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	500 $\mu$ l (400 $\mu$ l+50 $\mu$ l+50 $\mu$ l)	50nM	1.25 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	500 $\mu$ l (400 $\mu$ l+50 $\mu$ l+50 $\mu$ l)	30nM	0.75 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	500 $\mu$ l (400 $\mu$ l+50 $\mu$ l+50 $\mu$ l)	20nM	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	500 $\mu$ l (400 $\mu$ l+50 $\mu$ l+50 $\mu$ l)	10nM	0.25 $\mu$ l	1 $\mu$ l
12-well	1mL (800 $\mu$ l+100 $\mu$ l+100 $\mu$ l)	100nM	5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
	1mL (800 $\mu$ l+100 $\mu$ l+100 $\mu$ l)	50nM	2.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
	1mL (800 $\mu$ l+100 $\mu$ l+100 $\mu$ l)	30nM	1.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
	1mL (800 $\mu$ l+100 $\mu$ l+100 $\mu$ l)	20nM	1.0 $\mu$ l	2 $\mu$ l
	1mL (800 $\mu$ l+100 $\mu$ l+100 $\mu$ l)	10nM	0.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
6-well	2mL (1500 $\mu$ l+250 $\mu$ l+250 $\mu$ l)	100nM	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	2mL (1500 $\mu$ l+250 $\mu$ l+250 $\mu$ l)	50nM	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	2mL (1500 $\mu$ l+250 $\mu$ l+250 $\mu$ l)	30nM	3 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	2mL (1500 $\mu$ l+250 $\mu$ l+250 $\mu$ l)	20nM	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	2mL (1500 $\mu$ l+250 $\mu$ l+250 $\mu$ l)	10nM	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l

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，检测目的等相关。

- 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。

## 动物实验:

**Biomics 提供动物实验用的各种修饰 siRNA 产品及脂质体包载 RNA 制剂服务。**

**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 效果较好。

**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，具有广泛的组织分布，包括心、肝、脾、肺、肾等。