

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，即用型试剂。

运输与保存

产品以冻干粉的形式，常温运输。收到产品后，请于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 保存，冻干粉可以稳定保存一年。使用前瞬时离心，用 RNase-free H_2O 或灭菌 dd H_2O 配制成 20 μM 储存液，分装保存，避免反复冻融（建议不超过 4 次）。

表 1 20 μM 储存液的配置方法

siRNA(nmol)	0.25	0.5	1	2.5	5	10	50
溶解体积(μL)	12.5	25	50	125	250	500	2500

注：1OD = 2.5 nmol $\approx$ 33 μg

使用前须知

siRNA 呈很轻的干膜状附在管壁上，形态上可能无法用肉眼可见，此为正常现象，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_2O 或灭菌 dd H_2O 后盖上管盖，震荡溶解。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 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 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,我们建议：

- 1) 转染实验每组至少 3 个复孔；
- 2) 每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽可能使细胞在各孔的表面平均分布。

1. 转染浓度：

- 1) 为了获得最佳基因沉默效果，不同细胞系转染 siRNA 的用量都需要通过预实验来确认。首次转染的细胞系，请参考购买使用的转染试剂推荐配比进行预实验（表 2 为 siRNA 专用转染试剂 Ms-R 的配比使用表），在 5-100nM 范围内改变 siRNA 的浓度，以确定达到最佳基因沉默效率所需要的条件，如果目的细胞以前摸索过 siRNA 与转染试剂的最佳配比可按之前配比条件进行实验。
- 2) 一般情况细胞融合度在 40%-50% 时进行转染。基因沉默检测时间点一般要在 siRNA 转染后的 24-72 h 进行。
- 3) 转染时不要在培养基中加入抗生素，可能会降低细胞的转染效率。
- 4) 为达到更好的结果，推荐使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释转染试剂和 siRNA。
- 5) 未进行过 siRNA 转染的细胞可以首先通过 FAM 荧光标记 siRNA 做预实验来优化转染条件，正式实验参考预实验结果进行。

2. 转染步骤：以转染试剂 Ms-R Transfection Reagent 转染 24 孔板为例，参考表 1 配置 20 μM 储存液。

1) 接种细胞

A、贴壁细胞：转染前 24h，在 400 μ L 无抗生素无血清培养基中接种 $0.5-1 \times 10^5$ 个细胞。（注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长。）

B、悬浮细胞：转染前 24 h，在 400 μ L 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. siRNA 稀释：用 10 μ L Opti-MEM 稀释 0.75 μ L 20 μ M 存储液得 siRNA 稀释液，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置 5 min。

B. 转染试剂稀释：轻轻颠倒混匀转染试剂，用 10 μ L Opti-MEM 稀释 1.0 μ L Ms-R 转染试剂，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 15-20 min。

D. 转染复合物加入到 24 孔细胞板中，前后轻摇细胞板混合均匀。

E. 细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 18 - 48 h，无需更换培养基（对于不易转染的细胞，或者状态没问题的细胞换液时间可以增加至正常细胞换液时间进行）。

表 2 Ms-R Transfection Reagent siRNA 转染用量参考

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

孔板	20uM Si 用量 ul /孔 (Ms-R)	siRNA 稀释液体 积 (opti-MEM)	转染试剂量 ul/孔 (Ms-R)	转染试剂稀释体积 (opti-MEM)
24 well	0.5/ 0.75 /1.25	10 μ L	0.75/ 1 /1.25	10 μ L
12 well	1/ 1.5 /2.5	20 μ L	1/ 2 /3	20 μ L
6 well	3/ 5 /8	50 μ L	3/ 4 /5	50 μ L

注：表中数据仅供参考，中间条件为推荐条件，对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化

*不同品牌转染试剂需要参考使用说明书 *推荐使用 Opti-MEM 稀释（非必须）

3) 效果检测

转染后 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，转染试剂等有关。

1) RNA 水平的检测：mRNA 水平是检测 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，需要确保检测引物的特异性以及是否可以覆盖目的基因的所有转录本。

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 siRNA 转染后 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：动物体内实验相对复杂一些，公司可提供动物实验专用的修饰 siRNA 产品。

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。

转染试剂、CAS9 敲除细胞株、siRNA 定制靶点合成、siRNA 三保一、mimics、inhibitors、agomir、antagomir、过表达质粒、沉默 shRNA 质粒、过表达慢病毒、沉默慢病毒、过表达 AAV、沉默 AAV、过表达腺病毒、沉默腺病毒、双荧光素酶报告质粒、cas9 基因敲除、cas9 转录激活、抗体、Elisa 试剂盒、血清、培养基、细胞