



# siRNA产品使用说明

## 产品简介

荣清畅生物科技有限公司拥有国际领先水平的生物合成小 RNA 的核心技术，合成的 siRNA、miRNA 及 RNA 适配体等为带发夹结构的单链RNA，带有天然的生物修饰，稳定性强，活性高，对细胞或者组织的毒副作用小。

### 小 RNA oligo 技术数据：

小 RNA 的平均分子量约为 59400；小 RNA 溶液的初始包装浓度为5或10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

## 运输保存

产品以 DEPC 水溶液形式低温运输，收到产品后，请于-20~-80  $^{\circ}\text{C}$  保存，使用前瞬时离心（由于小 RNA oligo 溶液附着在管壁上，打开时极易散失，因此开管前请务必离心），用 RNase/DNase free  $\text{H}_2\text{O}$  配制成1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 储备液，分装保存，避免反复冻融（不超过5次）。

**使用前须知：**为避免外界因素导致产品降解，使用过程中请严格遵循 RNA 操作规则，产品最好于冰上放置，使用完毕，产品请于-20~-80  $^{\circ}\text{C}$  保存。



（注：下文方法中以siRNA为例，miRNA/anti miRNA也同样适用）

## siRNA 细胞实验转染

### 1、siRNA 对照

普通阴性对照：阴性对照用于分析目的基因 siRNA 作用的特异性。荣清畅可提供与所选 siRNA 具有相同组成且与目的基因及靶细胞中其他基因均无明显同源性的阴性对照。

转染试剂对照：使用转染试剂做对照用于排除转染试剂对实验可能的影响。

### 2、转染前细胞培养

加入试剂前，在细胞板上培养细胞时应使细胞汇合在 70-90 %。

（不同细胞大小不同，请根据细胞种类自行调整细胞密度）。

细胞培养用品	表面积 (mm <sup>2</sup> /孔)	细胞密度	培养基 (μL/孔)
96 孔板	50	$1.5 \times 10^4$ - $5.0 \times 10^4$	100 μL
48 孔板	100	$3.0 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^5$	200 μL
24 孔板	200	$8.0 \times 10^4$ - $2.0 \times 10^5$	500 μL
12 孔板	401	$1.6 \times 10^5$ - $4.0 \times 10^5$	1.0 mL
6 孔板	962	$3.0 \times 10^5$ - $8.0 \times 10^5$	2.0 mL
35 mm	962	$3.0 \times 10^5$ - $8.0 \times 10^5$	2.0 mL
60 mm	2827	$1.0 \times 10^6$ - $2.5 \times 10^6$	6.0 mL

### 3、合适的 转染试剂用量（以Lipofectamine2000为例）

合适的siRNA：Lipofectamine2000 比例对核酸的高效转染有重要影响。我们推荐的 RNA：lipofectamine2000 为 1:0.5-1:2 (μg: μl)，一般情况下此范围内可获得高的转染效率。

#### siRNA 细胞转染条件的优化

细胞培养	siRNA 推荐量	siRNA 优化范围	培养基最终体积	Lipofectamine 推荐量	Lipofectamine 优化范围
96 孔板	0.1 μg	0.05-0.3 μg	100 μL	0.1 μL	0.05-0.3 μL
24 孔板	0.5 μg	0.25-1.5 μg	500 μL	0.5 μL	0.25-1.5 μL
12 孔板	1 μg	0.5-3 μg	1 mL	1 μL	0.5-3 μL
6 孔板	2 μg	1-6 μg	2 mL	2 μL	1-6 μL
35 mm	2 μg	1-6 μg	2 mL	2 μL	1-6 μL
60 mm	5 μg	2.5-15 μg	5 mL	5 μL	2.5-15 μL



#### 4、贴壁细胞转染程序（以24孔板为例）

选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。以siRNA转染实验为例，siRNA和lipofectamine的用量和两者的比例可在推荐范围内适当调整。

- (1) 转染前一天， $4-5 \times 10^4$  接种在24孔板上，0.5 mL 含FBS和抗生素的DMEM（或Opti-MEM，其他培养基）细胞培养基；
- (2) 选择用于初期接种的细胞数量，应能在24小时内使细胞汇合度达到70-80%；
- (3) 在50  $\mu$ L DMEM（或Opti-MEM，其他无血清培养基）无血清培养基加入0.5  $\mu$ g siRNA，轻柔混匀；
- (4) 混匀 lipofectamine 试剂，用50  $\mu$ L 无血清的 DMEM（或 Opti-MEM，或其他无血清培养基）稀释 0.5  $\mu$ L lipofectamine 试剂，轻轻混匀，室温放置 5 min；
- (5) 将稀释好的 siRNA 与稀释好的 lipofectamine 混合：轻柔混匀，室温放置 20 min，以便形成 siRNA/lipofectamine 复合物；
- (6) 将 100  $\mu$ L siRNA/lipofectamine 复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中，来回轻柔摇晃细胞培养板；
- (7) 细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 温育 24-72 h 后，进行转染后的其他检测步骤。如果细胞株比较敏感，孵育 4-6 h 后，更换培养基。

#### 5、悬浮细胞转染程序

- (1) 转染的当天，收集细胞并离心，用含 FBS 的完全培养基重悬；
- (2) 在50  $\mu$ L DMEM（或Opti-MEM，或其他无血清培养基）无血清培养基中加入0.5  $\mu$ g siRNA，轻轻吹打混匀；
- (3) 混匀 lipofectamine 试剂，用50  $\mu$ L DMEM（或Opti-MEM，或其他无血清培养基）无血清培养基 0.5  $\mu$ L lipofectamine 试剂，轻轻混匀，室温放置 5 min；
- (4) 将稀释好的 siRNA 与稀释好的 lipofectamine 混合：轻柔混匀，室温放置 20 min，以便形成 siRNA/lipofectamine 复合物；
- (5) 再加入 400  $\mu$ L 细胞悬浮液（细胞数量决定于细胞类型和转染后分析测试的时间）；细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 温育 24-72 h 后，进行转染后的其他检测步骤，如果细胞株比较敏感孵育 4-6 h 后，更换培养基。



## 小 RNA 动物体内实验

适量的 siRNA 溶于 RNase/DNase free 的无菌水中，轻轻混匀，通常采用高浓度 siRNA，一般 siRNA 为  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ （siRNA 浓度根据递送系统的要求进行调整），取适量的 siRNA 与 *in vivo*-jetPEI<sup>®</sup> 混合，室温温育 30 min，以形成 siRNA/ *in vivo*-jetPEI<sup>®</sup> 混合物。给药方式有两种：

- 1、局部给药，体内直接导入该混合物。该法效率高用量少吸收快，适用于浅表器官和组织，包括眼、肌肉和皮下组织等。
- 2、系统性注射，一些无法通过局部给药方式到达的靶位，如内脏（包括心、肝、脾、肺、肾等）、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。

## 转染效果检测

转染后 24-72 h 内，均可进行 siRNA 沉默效果的检测，最佳检测时间与细胞类型、转染试剂和研究的 siRNA 有关。以下为几种常用的 RNAi 检测方法：

通过实时荧光定量 PCR、基因芯片等方法检测靶基因的 mRNA 水平变化；

通过 western-blot、蛋白芯片等方法检测靶基因的蛋白水平变化；

应用细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移等检测手段进行 siRNA 对细胞功能的筛选。



## 常见问题的问答

### 1、荣清畅公司提供的 siRNA 是双链还是单链的？

公司提供的 siRNA 为生物合成重组 siRNA，为单链 RNA。

### 2、我们需要提供什么信息用于 siRNA 的合成？

需要提供 siRNA 序列及基因名称、物种等信息等。其中以序列信息为最重要。

如果客户没有有效的 siRNA 序列，生产周期将会延长。

### 3、针对人体基因设计的 siRNA 对其他物种是否也有效？

一般 siRNA 都具有物种特异性，很少与其他物种有相同的靶位点，所以针对人体基因设计的 siRNA 通常不会沉默其他物种的同源序列。然而，也有研究表明 siRNA 经过特异性设计后能对两个或两个以上的物种有效，这需要仔细进行 siRNA 设计和生物信息学分析。

### 4、你们提供的 siRNA 是怎样装运的？如果在常温放置了一个星期还有效吗？

荣清畅公司为您提供的 siRNA 是 DEPC 水溶液包装的，在低温下运输。不可常温放置一个星期，建议 -20~-80 °C 长期保存。

### 5、在体外实验中，需要多少量的 siRNA？

我们建议您用于实验的 siRNA 的浓度为 1-5 µg/ml

### 6、用 1 µg/ml 的 siRNA 转染时只得到 50% 沉默效率，我可以将 siRNA 的终浓度增加到 2 µg/ml 甚至是 20 µg/ml 吗？

增加 siRNA 的浓度一般不能改进沉默效率。高浓度的 siRNA 将可能导致去靶作用和对细胞的毒性。siRNA 的高基因沉默效率来自于合理的设计，在 1 µg/ml 甚至更低的浓度都有可能 75% 的沉默效率。另外，低的转染效率会导致低的沉默效率，建议您进一步优化 siRNA 的导入条件。

### 7、定量 RNA 的公式是什么？

研究者可以用 Beer 法则定量 RNA：吸光度 (260 nm) = (摩尔消光系数) \* (浓度) \* (路径长度, cm)。为了便于理解，等式变为：浓度 = (吸光度, 260 nm) / [(摩尔消光系数) \* (路径长度, cm)]。当使用一个标准的 10 mm 比色皿时，在公式中路径长度这个变量等于 1。

### 8、一定需要阴性对照吗？

是。阴性对照是 RNA 干扰实验中不可或缺的。由于在超过 10 µg/ml 的浓度下，siRNA



有可能会产生非特异性的压力反应，在实验体系中必需设置阴性对照。它能够帮助我们确认基因表达水平的降低是否是序列特异性的 RNAi 结果。由于 siRNA 的合成方法和工艺以及转染试剂等因素可能导致广泛的基因沉默现象。如果没有阴性对照，研究人员很可能错误地将广泛的、非特异性基因沉默当作由 RNAi 引起的基因特异性沉默。

## 9、常用的阴性对照有哪些类型？

常用的阴性对照大体分为两种，一种是使用通用阴性对照序列，该序列已经被上千篇文章使用；另一类是使用靶基因 siRNA 打乱序列作为阴性对照，这样的阴性对照和通用序列相比较，一方面是按照定制产品价格合成的，另一方面，由于打乱序列是没有经过验证的序列，有可能会产生 off-target 现象。因此，除非有非常特殊的要求，最好使用通用序列作为阴性对照。

## 10、在阴性对照体系中和实验体系中观察到同样的实验结果，这是什么原因？

这个结果充分说明了设置阴性对照的必要性。该结果表明您所观察到的表型不是序列特异性 knock-down 产生的表型，您需要调整 siRNA 的工作浓度。

## 11、你们能提供预先合成的 siRNA 对照吗？

可以。荣清畅能提供预先合成的用于 RNA 干扰实验的单链对照。

## 12、用于对照的 siRNA 的最佳浓度是多少？

阳性对照和阴性对照的 siRNA 的浓度都应该与基因特异性的 siRNA 的浓度相同。

## 13、如何筛选转染试剂？

好的转染试剂有以下特点：1.对 siRNA 有较高的转染率；2.对细胞的毒性小。在 mRNA 水平检测 siRNA 导入的效果比用管家基因的 siRNA 阳性对照检测更为准确。

## 14、转染过程发现细胞大量死亡，我应该如何处理？

如果出现细胞大量死亡，意味着您的转染条件仍然需要优化：转染条件的优化一般包括以下几个方面：

- (1) 调整转染试剂的浓度；
- (2) 在转染后适当的时间内更换无转染试剂的培养液；
- (3) 调整细胞的生长状态，一般处于良好生长状态的细胞对转染试剂有更好的耐药性；

(4) 调整转染试剂和 siRNA 的比例，如果同一管转染试剂在不同实验中对细胞的毒性有差异，一般说来应该是实验过程本身带来的差异：如果已经做了以上几项工作，转染效率仍





然得不到提高，建议您更换一种转染试剂。如何将 siRNA 导入到细胞内，使用什么样的转染方法，很大程度上取决于您使用的细胞系。

#### 15、我计划使用 RT-PCR 检测基因 knock-down 结果，之前应该注意哪些问题？

我们推荐 RT-PCR 的引物应该设计在 target 位置的两侧，而不是同侧。目前已经知道的 siRNA 介导的基因 knockdown 机制是 RISC 先介导靶 mRNA 的切割，切割导致靶 mRNA 的降解，由于切割和降解可能具有不同的时间点，因此，设计同侧的 PCR 引物可能导致假阴性结果或 knockdown 效率的低估。

另外，RT-PCR 结果会因为靶基因 mRNA 降解时间不同、细胞内靶基因 mRNA 丰度不同而导致假阴性结果，特别对于丰度较高的基因，推荐使用的检测方式包括量 PCR、northern 检测、western 检测等。这些方法会更加真实的反映 RNAi 的结果。

#### 16、开始体内实验需要注意什么问题？

体内实验设计包含动物模型的选择、给药途径、剂量和给药次数等。siRNA 的使用量及浓度主要取决于给药靶点的性质，诸如肿瘤的类型，组织的类型，靶基因表达水平，动物模型个体大小等，针对不同的研究模型，最好先查阅相关资料。

#### 17、在体内研究中，最好的给药途径是什么？给药频率是多少？

大剂量给药时要慎重，因为已有研究表明：一些毒性与寡核苷酸浓度有关，快速给药时可能会导致动物下肢瘫痪或致死，所以给药时要注意观察。很多已发表的论文实验是通过尾静脉注射给药的。任何给药方式都需要优化，以确保最佳的导入方式和动物的健康。

#### 18、荣清畅公司合成的 siRNA 是否可以用于动物水平的实验？

荣清畅公司的 siRNA 经过严格的 FPLC 纯化，已经被用户通过局部注射/静脉注射用于小鼠的体内实验，并且得到满意的实验结果。

#### 19、沉默效果不理想，应该如何处理？

最常见的影响沉默效果的两个原因是：转染效率低和 siRNA 序列设计的效果不理想。如果您初次使用 siRNA 或采用了新的细胞系，并发现沉默效果不佳，我们建议您对转染效率进行检测，并选择换用另一种转染试剂或是采用其他技术，这也许能提高转染效率。如果已经提高了转染效率但是沉默效果仍然未达到要求，可能是因为 siRNA 序列设计的效果不理想。