



西安荣清畅生物科技有限公司

XI' AN RQCON Biological Technology Co.LTD

常见问题解答

联系电话：029-88222728

E-mail: rqc@rqcon.com

support@rqcon.com

公司网站: <http://www.rqcon.com>





常见问题的解答

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、客户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。

3、用 RNA Oligo 转染细胞后，如何检测重组 RNA Oligo 是否被相应酶加工为成熟目标序列？

荣清畅设计的 RNA Oligo 为生物合成重组 RNA 制品，含有 tRNA 及 miRNA 前体。转染入细胞后，被细胞内相应酶加工为成熟目标小 RNA。建议使用 stem-loop RT-qPCR 法检测细胞内的成熟目标小 RNA。Stem loop primer 设计参考：Martha F, Kramer. Stem-loop RT-Qpcr for miRNA.2011,Curr Protoc Mol Biol, Chapter:15.10. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95

4、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。

5、荣清畅提供的 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。

6、在体外实验中，需要多少量的 siRNA？

荣清畅建议您用于实验的 siRNA 的浓度为 5-20 nM。

7、用 20 nM 的 siRNA 转染时只得到 50% 沉默效率，可以将 siRNA 的浓度增加到 40 nM 甚至是 400 nM 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 20 nM 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，建议进一步优化 siRNA 的导入条件。

8、定量 RNA 的公式是什么？

可以用 Beer 法则定量 RNA：吸光度（260 nm）=（摩尔消光系数）*（浓度）*（路径



氏度, cm)。为了便于理解, 等式变为: 浓度=(吸光度, 260 nm) / [(摩尔消光系数) * (路径氏度, cm)]。当使用一个标准的 10 mm 比色皿时, 在公式中路径氏度这个变量等于 1。

9、50 μL 浓度为 100 μM 的 siRNA 溶液中含有多少 μg ?

首先计算含有多少 μmol : $50 \mu\text{L} * 100 \mu\text{mol/L} * 10^{-3} = 5 * 10^{-3} \mu\text{mol}$; 然后利用 siRNA 的平均分子量计算含有多少 μg : $5 * 10^{-3} \mu\text{mol} * 59400 \text{ g/mol} = 297 \mu\text{g}$ 。

10、需要浓度为 20 μM 的样品, 如何计算重悬 siRNA 缓冲液的数量?

样品浓度的计算如下: (siRNA 的量, nmol) / (重悬体积, μL) = 样品浓度, $\mu\text{mol/L}$ 。
例如: 客户购买了 5 nmol 的 siRNA, 想溶解为 20 μM 的样品, 可按如下方法计算重悬体积: $5 \text{ nmol} / 20 \mu\text{M} = 250 \mu\text{L}$ 。因此, 应该使用 250 μL 缓冲液去重悬 5 nmol 的 siRNA, 溶解后为 20 μM 的样品。

11、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 200 nM 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。

12、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。

13、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。该结果表明所观察到的表型不是序列特异性 knock-down 产生的表型, 需要降低 siRNA 的工作浓度。

14、荣清畅能提供预先合成的 siRNA 对照吗?

可以。荣清畅能提供预先合成的用于 RNA 干扰实验的对照单链。



15、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。

16、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。

17、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：1. 贴壁的、易转染的细胞，荣清畅推荐使用 lipofectamin2000。2. 悬浮的或者原代细胞，荣清畅推荐使用电击转化方法。3. 电击转化效率仍然很低的细胞，需要选择载体系统。

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

荣清畅推荐 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。

19、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。

20、在体内研究中，最好的给药途径是什么？给药频率是多少？

寡核苷酸可以通过大剂量给药或使用 ALZET 微小泵持续给药。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。一般拿静脉注射来说，每天注射一到两次，连续注射一到两周。

21、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。

22、小鼠体内实验需要多少 siRNA？

迄今为止还没有明确的 siRNA 体内实验使用量的计算方式，在实验前最好先从文献中查询是否已经有相关的文章发表。对于常规实验，一般使用 100 μ L 的注射体积，浓度为 10 到 500 μ M。原先用 antisense 的研究表明，当剂量大于 20 mg/kg/day(416 mM)时，会观察到明显的毒性。最好针对您的实验绘制剂量反应曲线。常规情况下，给药剂量可以以~5 mg/kg/day(~7.7 nmol/day 或者 100 mM per day)作为优化起点。需要注意的是，这个剂量只是一个预实验的起点，最后的给药剂量取决于动物模型、靶基因、靶组织和给药方式等因素。

23、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。