



西安荣清畅生物科技有限公司

XI' AN RQCON Biological Technology Co.LTD

---

# 产品使用手册

---

联系电话：029-88222728

E-mail: [rqc@rqcon.com](mailto:rqc@rqcon.com)

[support@rqcon.com](mailto:support@rqcon.com)

公司网站: <http://www.rqcon.com>





## 产品简介

荣清畅提供的小 RNA 均采用生物合成，经 FPLC 纯化，且带有与体内情况类似的生物修饰。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。

SiRNA 是生物合成的重组 RNA。

MiRNA 是生物合成的重组 miRNA。

Anti-miRNA 是 miRNA 抑制物，根据成熟 miRNA 的互补单链设计合成，为生物合成重组 RNA。

RNA 适配体是能与目标分子特异性高亲和力结合的小片段的重组 RNA。

## 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 °C 保存，使用前瞬时离心，用 RNase/DNase free H<sub>2</sub>O 配制成 20 μM 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 °C 保存。

## 荣清畅小 RNA 产品特点

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，包括普通 siRNA、lncRNA-siRNA、普通 miRNA 及 RNA 适配体合成等。小 RNA oligo 的合成依托先进的生物合成技术平台，具有完善的品质控制流程。生物合成的小 RNA oligo 得率高，稳定性强，且带有天然生物修饰。使用操作简便，转染效率高，对细胞或者组织的毒副作用小。

**小 RNA oligo 产品特性：**

小 RNA oligo 合成是在严格控制的流程和条件下完成的，经过分光光度计精确定量；

小 RNA oligo 经 FPLC 纯化，全长 oligo 含量 >95%；



重组小 RNA 为单链 RNA，长度约 180 nt/链，带有天然修饰；

在哺乳动物细胞内可由 Dicer 加工成熟获得目标小 RNA。

#### 小 RNA oligo 技术数据：

小 RNA 的平均分子量约为 59400；

小 RNA oligo 的 nmol 和质量有如下换算：对于一个 180 nt 的 siRNA oligo, 5 nmol $\approx$ 297  $\mu$ g；

5 nmol 的 siRNA 欲溶解为 20  $\mu$ M 的样品，可加 DEPC H<sub>2</sub>O 稀释至 250  $\mu$ L，振荡溶解；

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，然后再慢慢打开管盖；

小 RNA 溶液的初始包装体积为 50  $\mu$ L，浓度为 100  $\mu$ M。

## RNAi 简介

### RNAi 实验原理

RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(dsRNA)引发的、有特定酶参与的同源 mRNA 高效特异性降解（特异性基因沉默）的现象。dsRNA 特异性的核酸酶 Dicer 将 dsRNA 裂解成由 21-25 个核苷酸组成的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)，从而在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达。

### RNAi 实验所需试剂

试剂种类	试剂用途
siRNA oligo	与您所要敲除的靶基因的转录本 (mRNA) 完全互补
转染试剂	如：脂质体法, lipofectamin2000 (invitrogen), 电穿孔法
实验对照	包括阴性和阳性，以及 mocking control
基因表达的检测方法	如 mRNA 的检测方法用 qRT-PCR；蛋白表达水平的检测方法用 western-blot



RNAi 相关产品

siRNA oligo	普通 siRNA oligo	荣清畅 siRNA oligo 经反复优化和严格测试，并可按客户需求定制不同长度、不同形式的高度稳定 siRNA oligo，产品形式为 siRNA DEPC 水溶液。
	siRNA 阴性对照	荣清畅提供的 siRNA NC 与其靶细胞中其他基因均无明显的同源性，作为阴性对照，用于确认 siRNA oligo 的转染特异性，产品形式为 siRNA DEPC 水溶液。

miRNA 简介

miRNA 是一类长度约 19-23 nt 的非编码调控单链小分子 RNA，由一段具有发夹结构的长度约为 70-80 nt 的单链 RNA 前体 (pre-miRNA) 剪切后生成，它通过作用于目标 mRNA 的 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 参与目标 mRNA 的转录后调控。miRNA 以单拷贝、多拷贝或基因簇的形式存在于基因组中。

miRNA 相关产品

miRNA oligo	miRNA	荣清畅可为客户提供不同长度、不同形式、不同来源的 microRNA，模拟细胞中成熟 miRNA 的高水平表达，供客户对 miRNA 的生物进程及其对体内细胞的调控进行深入研究。
	anti-miRNAs	荣清畅 anti-miRNA 通过特异性地与成熟 miRNA 分子结合而抑制其作用，可以有效地抑制细胞内成熟 miRNA 的功能，从而进行 miRNA 功能缺失性研究。



---

## siRNA 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、siRNA 转染的方法

哺乳动物转染的常见方法有：磷酸钙共沉淀、电穿孔法、DEAE 葡聚糖和 polybrene、机械法（例如，显微注射和基因枪）、阳离子脂质体试剂转染法是目前最常用的转染方法。应用脂质体型转染试剂进行转染需要注意的几个方面：

- (1) 转染试剂的用量
- (2) siRNA 的用量
- (3) 转染时的细胞密度
- (4) 转染时的操作顺序
- (5) 细胞与转染试剂/siRNA 复合物的温浴的时间

### 3、Lipofectamin2000 转染试剂

Lipofectamin2000 的应用领域：

选择最适合的转染试剂盒转染条件，往往取决于不同的哺乳动物细胞类型和不同的核酸分子。

Lipofectamin2000 适用于核酸的体内和体外操作，可应用于 DNA、RNA、反义寡核苷酸、siRNA 的转染，也可应用于 DNA/siRNA 的共转染操作：是一种新型的高效 siRNA 转染试剂。

Lipofectamin2000 的特点：

- (1) 不必更换培养基，操作简单易行，可在半小时内完成操作
- (2) 在含血清培养基中也能表现高转染效率
- (3) 细胞毒性低，适用细胞广泛
- (4) 即用型试剂，可在含抗生素的完全培养基中转染
- (5) 基于脂质的转染试剂，确保没有 RNase 活性
- (6) 可介导 siRNA 高转染细胞及体内 siRNA 的高效导入



#### 4、Lipofectamin2000 适用的细胞类型

Lipofectamin2000 转染试剂可广泛应用于多种细胞系的 DNA 和 siRNA 转染如: Hela(人宫颈癌细胞)、MCF7(人乳腺癌细胞)、Hep3B(人肝细胞癌细胞)、COS7(猴肾细胞)、Neuro2a(鼠神经母细胞瘤细胞)、NIKS(人角质化细胞)、B16(鼠黑色素瘤细胞)、DLD1(人结肠癌细胞)、NIH/3T3(鼠胚胎成纤维细胞)、HT29(人结肠腺癌细胞)、A549(人肺癌细胞)、CHO k1(仓鼠卵巢细胞)和 293(腺病毒 5 DNA 转化的人胚胎肾细胞)、SVRbag4 细胞等。

#### 5、转染前细胞培养

使用本转染试剂时, 在细胞板上培养细胞时应使细胞汇合在 70-90 %。

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	1.5×10 <sup>4</sup> -5.0×10 <sup>4</sup>	100 μL
48 孔板	100	3.0×10 <sup>4</sup> -1.0×10 <sup>5</sup>	200 μL
24 孔板	200	8.0×10 <sup>4</sup> -2.0×10 <sup>5</sup>	500 μL
12 孔板	401	1.6×10 <sup>5</sup> -4.0×10 <sup>5</sup>	1.0 mL
6 孔板	962	3.0×10 <sup>5</sup> -8.0×10 <sup>5</sup>	2.0 mL
35 mm	962	3.0×10 <sup>5</sup> -8.0×10 <sup>5</sup>	2.0 mL
60 mm	2827	1.0×10 <sup>6</sup> -2.5×10 <sup>6</sup>	6.0 mL

#### 6、合适的 Lipofectamin2000 用量

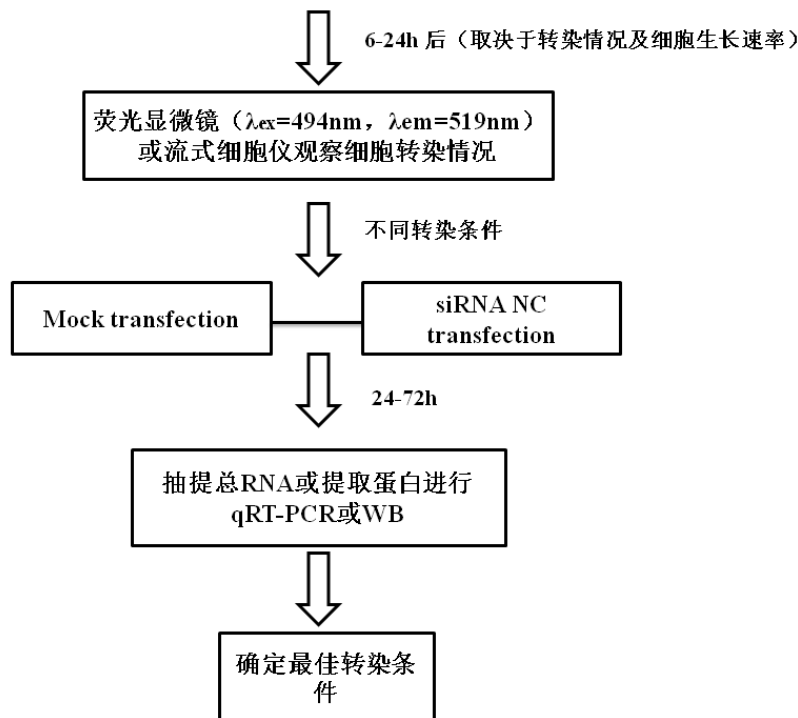
合适的 DNA (siRNA): Lipofectamin2000 比例对核酸的高效转染有重要影响: 我们推荐的 DNA: lipofectamin2000 为 1:0.5-1:5 (ug: uL), siRNA: lipofectamin2000 为 1:0.01-1:0.1 (pmol: uL) 一般情况下此范围内可获得高的转染效率。

细胞培养用品	siRNA/DNA	培养基最终体积	Lipofectamin2000 (siRNA/DNA)
96 孔板	1 pmol/0.2 μg	100 μL	0.05 μL/0.5 μL
24 孔板	5 pmol/0.8 μg	500 μL	0.25 μL/2 μL
12 孔板	10 pmol/1.6 μg	1 mL	0.5 μL/4 μL
6 孔板	20 pmol/4.0 μg	2 mL	1 μL/10 μL
35 mm	20 pmol/4.0 μg	2 mL	1 μL/20 μL
60 mm	50 pmol/8.0 μg	5 mL	2.5 μL/20 μL



### 7、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	Lipofectamin 推荐量	Lipofectamin 优化范围
96 孔板	1 pmol	0.5-2 pmol	100 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L	0.1-0.5 $\mu$ L
24 孔板	5 pmol	2-8 pmol	500 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.5-2 $\mu$ L
12 孔板	10 pmol	4-20 pmol	1 mL	2 $\mu$ L	1-4 $\mu$ L
6 孔板	20 pmol	10-40 pmol	2 mL	5 $\mu$ L	2.5-10 $\mu$ L
35 mm	20 pmol	10-40 pmol	2 mL	5 $\mu$ L	2.5-10 $\mu$ L
60 mm	50 pmol	20-80 pmol	5 mL	10 $\mu$ L	5-20 $\mu$ L



### 8、贴壁细胞转染程序

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(DNA) 和 lipofectamin 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%;



(3) 在 50  $\mu\text{L}$  DMEM (或 Opti-MEM, 其他无血清培养基) 无血清培养基加入 5 pmol siRNA (或 0.8  $\mu\text{g}$  DNA), 轻柔混匀;

(4) 混匀 lipofectamin 试剂, 用 50  $\mu\text{L}$  无血清的 DMEM (或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 稀释 1  $\mu\text{L}$  lipofectamin 试剂 (DNA 转染时, 则加入 2  $\mu\text{L}$  lipofectamin 试剂), 轻轻混匀, 室温放置 5 min;

(5) 将稀释好的 siRNA 与稀释好的 lipofectamin 混合: 轻柔混匀, 室温放置 20 min, 以便形成 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物;

(6) 将 100  $\mu\text{L}$  siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 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  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  温育 24-48 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。

## 9、悬浮细胞转染程序

以 siRNA 转染实验为例:

(1) 转染的当天, 收集细胞并离心, 用含 FBS 的培养基重悬;

(2) 在 50  $\mu\text{L}$  DMEM (或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 无血清培养基中加入 5 pmol siRNA (或 0.8  $\mu\text{g}$  DNA), 轻轻吹打混匀;

(3) 混匀 lipofectamin 试剂, 用 50  $\mu\text{L}$  DMEM (或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 无血清培养基 1  $\mu\text{L}$  lipofectamin 试剂 (DNA 转染时, 则加入 2  $\mu\text{L}$  lipofectamin 试剂), 轻轻混匀, 室温放置 5 min;

(4) 将稀释好的 siRNA 与稀释好的 lipofectamin 混合: 轻柔混匀, 室温放置 20 min, 以便形成 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物;

(5) 再加入 400  $\mu\text{L}$  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  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  温育 24-48 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。

## 10、DNA 和 siRNA 共转染细胞

(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密度，应能在 24 小时内使细胞汇合度达到 70-90 %。  
在 100  $\mu\text{L}$  的无血清培养基中稀释 5 pmol siRNA 和 0.2  $\mu\text{g}$  DNA, 加入 2  $\mu\text{L}$  lipofectamin 试剂, 充分混合, 室温放置 20 min, 以便形成 siRNA/DNA/lipofectamin 复合物;
- (3) 将 siRNA/DNA/lipofectamin 复合物加入到培养基中, 轻轻混匀;
- (4) 细胞在  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  温育 24-48 h 后, 进行转染后的其他检测步骤。

## 11、小 RNA 表达的测定

### 1) 小 RNA 的提取 (Direct-zolZMRNA 提取试剂盒)

- (1) 收集细胞, 用 Trizol 裂解 5 min 后, 加等体积的无水乙醇, 涡旋混匀。
- (2) 将混匀后的液体加入柱中, 13000 rpm 离心 1 min, 去除滤液, 加入 400  $\mu\text{L}$  预洗缓冲液, 13000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 并重复洗涤一次。
- (3) 加入 700  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液, 13000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 再 13000 rpm 离心 1 min, 以去除残留液体。
- (4) 在柱子中央加入 RNase/DNase free 水, 室温放置 1 min 后 13000 rpm 离心 1 min, 所得滤液为 RNA, 测定浓度, 放于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

### 2) 小 RNA 的逆转录

反应体系如下:

100 mM dNTPs	2 $\mu\text{L}$
M-MulV Reverse Transcriptase	1 $\mu\text{L}$
10 $\times$ RT buffer	2 $\mu\text{L}$
RNA	500 ng
Stem loop primer <sup>#</sup> (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
DEPC H <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu\text{L}$

<sup>#</sup>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



配好后按如下条件进行反应：

16 °C	30 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	hold

### 3) 荧光定量 PCR (q-PCR)

反应体系如下：

20×SYBR green	0.5 μL
2×master mix	5 μL
Fow primer (10 μM)	0.5 μL
Reverse primer (10 μM)	0.5 μL
Template (1:10 dilution)	2 μL
H <sub>2</sub> O	Up to 10 μL

反应条件如下：

95 °C	3 min
95 °C	15 sec
60 °C	1 min
第二步到第三步	循环 40 次

反应中所用引物序列如下图所示（以 miR-124 为例）：

Primer	Sequence (5'-3')
Universal reverse	GCGCTAAGGCACGCGGTG
U74	RT-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAATTGT Fow-CCTGTGGAGTTGATCCTAGTCTGGGTG
miR-124	RT-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCATT Fow-GCGCTAAGGCACGCGGTG

## miRNA 转染

参考 siRNA 转染说明。



## 小 RNA 动物体内导入方法

适量的 siRNA 或 DNA 溶于 RNase/DNase free 的无菌水中，轻轻混匀，通常采用高浓度 siRNA 或 DNA，一般 siRNA 为 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，DNA 为 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，取适量的 siRNA、DNA、或 siRNA/DNA 混合物与 lipofectamin/*in vivo*-jetPEI<sup>®</sup> 混合，室温温育 30 min，以形成 siRNA/DNA-lipofectamin/*in vivo*-jetPEI<sup>®</sup> 混合物，采用局部给药，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。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，包括心、肝、脾、肺、肾等。

miRNA 动物实验主要分为两类：细胞移植和直接给药。荣清畅推荐采用稳定性强，可靠性高的 miRNA 和 anti-miRNA 进行动物实验，具体实验方案依靠实验目的及条件而定。

## 转染效果检测

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

通过 qRT-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/miRNA 对细胞功能的筛选。

## 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、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。

### 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 5-20 nM。

**6、用 20 nM 的 siRNA 转染时只得到 50% 沉默效率，我可以将 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达到 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、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 μL\*100 μmol/L\*10<sup>-3</sup>=5\*10<sup>-3</sup> μmol；然后利用 siRNA 的平均分子量计算含有多少 μg：5\*10<sup>-3</sup> μmol\*59400 g/mol=297 μg。

**9、我需要浓度为 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，μmol/L。  
例如：您购买了 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 nmol/20 μM=250 μL。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。

**10、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。

### 11、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。

### 12、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，您需要降低 siRNA 的工作浓度。

### 13、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 干扰实验的对照单链。

### 14、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。

### 15、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。

### 16、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，我们推荐使用 lipofectamin2000。2. 悬浮的或者原代细胞，我们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。

#### 17、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。

#### 18、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。

#### 19、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。

#### 20、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。



## 21、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  $\mu$ L 的注射体积，浓度为 10 到 500  $\mu$ 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。

## 22、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。