

siRNA 转染使用说明书

产品介绍

本公司生产的 siRNA 均为化学方法合成双链小 RNA。经 HPLC 纯化，可直接用于细胞转染使用。

RNAi 实验所需试剂

试剂种类	试剂用途
siRNA oligo	与您所要敲除靶基因的转录本 (mRNA) 完全互补
转染试剂	如金拓思的转染试剂, lipofectamin3000(invitrogen),
实验对照	包括阴性和阳性及 Mocking control
基因表达的检测方法	如 mRNA 水平检测用 qRT-PCR; 蛋白表达水平检测用 western blot

siRNA 对照

1. 普通阴性对照

金拓思默认提供与目的基因序列无同源性的通用阴性对照。

1. siRNA 实验应该有阴性对照；
2. 通用阴性对照为与目的基因的序列无同源性的普通阴性对照；
3. Scrambled 阴性对照和选中的 siRNA 序列有相同的组成，但是和 mRNA 没有明显的同源性；
4. 阴性对照需要确定和目的靶细胞中其它基因没有同源性。

2. 荧光标记阴性对照

金拓思提供与目的基因序列无同源性的荧光标记（FAM）通用阴性对照

1. 通过标记荧光，可以方便地在荧光显微镜下观察转染情况；
2. 可用于优化转染条件和评价转染效率；
3. 荧光标记阴性对照与普通阴性对照的序列是相同的。

3. siRNA 阳性对照

阳性对照作为一个实验系统检查是很重要的。您可以利用阳性对照来确认 RNAi 实验中转染、RNA 提取和基因表达检测方法 是可靠的。

4. 转染试剂对照

对于一个完善的对照系统，转染试剂对照(Mock transfection)是不可缺的。转染试剂对照可以检测转染试剂对细胞的毒性、细胞的成活率等细胞转染的各个因素影响。

使用方法

oligo 稀释浓度

所有 siRNA 均为冻干粉形式出货，常温运输，请收到后转入-20℃保存（长期保存请放入-80℃冰箱）。

冻干粉容易在运输过程中由于摇动或 EP 管内静电影响分布在管壁，请使用前离心确保样品集中在管底。

因细胞和实验目的不同，siRNA 的工作浓度应根据您的实验进行调整。推荐实验起始工作浓度为 20uM。

10D siRNA \approx 2.5nM，加入 125ul RNase-free water，即可将 10D siRNA 配置成 20uM 工作浓度。（由于实验材料、条件及目的不同，此浓度仅供参考）

单链的 miRNA inhibitor 10D \approx 5nM，加入 250ul RNase-free water，即可将 10D inhibitor 配置成 20uM 工作浓度。

转染

转染前准备：

转染使用细胞生长密度应根据细胞生长速度、后续检测时间等条件进行调整，推荐转染前细胞密度为 70%-80%。

为降低由于实验细胞数量、转染试剂及 siRNA 加入量多少等条件引起误差，应同时设置多个孔进行平行实验，推荐至少进行 3 个孔细胞平行检测。尽量使用细胞密度一致、分布均匀的孔以减少误差、取得准确实验结果。

实验前 12h 在确保不会产生污染的前提下，更换细胞培养基为无抗生素培养基以减少转染过程中细胞的死亡率。

详细转染步骤:

以某公司转染试剂 L3000 为例:

	相应组分	96-well	24-well	6-well
1	待转染细胞	$1-4 \times 10^4$	$0.5-2 \times 10^5$	$0.25-1 \times 10^6$
2	预先准备			
3	Opti-MEM Medium	25 μ l	50 μ l	250 μ l
4	转染试剂	0.25 μ l	1 μ l	5 μ l
5	吹吸混匀, 室温静置 3min			
6	Opti-MEM® Medium	25 μ l	50 μ l	250 μ l
7	oligo	5 μ mol	20 μ mol	100 μ mol
8	吹吸混匀, 室温静置 3min			
9	将 5、7 准备好的混合液再次混匀, 室温放置 5min			
10	将 9 混合液均匀加入细胞培养孔内, 8-12h 换液			

注: 本说明书 siRNA 使用量、转染试剂使用量、细胞数量及各种试剂均为推荐使用量。具体转染步骤及各试剂使用量, 请仔细阅读您使用的转染试剂使用说明书。

实验结果检测

请在转染 siRNA 后 24-48h 进行 RNA 水平检测。通过 qPCR 检测目的基因 RNA 水平的变化情况是 RNAi 实验结果的公认标准。由于细胞种类、作用基因表达情况的不同, 各实验最佳检测时间也不相同。检测时间过晚可能导致检测不到干扰效果。

对于编码蛋白的基因, 如需进行蛋白水平检测, 推荐转染后 48-72h 进行相应检测。由于蛋白表达受到影响因素较多, 如检测蛋白水平变化不明显请检测其 mRNA 水平变化情况, 已确定 siRNA 是否工作。

动物实验用 siRNA

动物体内 RNAi 药物(siRNA、miRNA、shRNA 等)的一般给药方法与途径

一般来说，给药方法可分为全身给药(systemic delivery)和局部给药(local delivery)。

一、局部给药：

迄今已有很多通过局部给药途径进行动物体内 RNAi 药物药效评价和国外 RNA 药物 I-III 期临床试验的报道。

1. 给药方式：局部给药是将 RNAi 药物分子 (siRNA、miRNA) 通过注射、滴入、涂抹或喷雾等方式直接导入到一个特定的组织或器官中。
2. 适用范围：局部给药的组织或器官包括眼部、耳部、鼻腔、呼吸道、肺部、皮肤 (表皮、真皮和皮下组织)、膀胱、子宫腔等。
3. 优势：局部给药可直接应用裸 RNA 药物分子作用于靶向器官或组织。另外，局部给药相对全身给药在用药量上要少一些。

二、全身给药

1. 给药方式：由于体内大部分器官组织并不能够通过局部给药的方法将 RNA 药物分子直接导入，因此一般往往采用静脉注射的方式进行全身给药。
2. 适用范围：静脉给药适合于心脏、肝、肾、肺、肿瘤组织等血流丰富的组织器官。
3. 全身给药可能遇到的问题及解决方式：

由于血液中存在大量的核酸酶(Rnases), 会直接导致 RNA 药物分子的迅速降解, 使得 RNA 干扰机制丧失或药效丢失。如何有效解决裸 RNA 药物分子在血液中的稳定性是十分关键的。

其解决方案包括:

- 1) 化学修饰 RNA 分子 (如, 常规 2'-OMe 或胆固醇修饰等)
- 2) 利用功能高分子或脂质体载体包裹裸 RNA 药物分子, 使其达到在血液中稳定循环。

这样不仅解决了 RNA 药物分子在血液中的稳定性, 同时, 所做的修饰分子或包裹载体如具有特定靶向性, 也可以解决 RNA 药物分子在全身传输中的组织器官靶向性难题, 使其能够到达指定的病症部位或肿瘤组织。

动物体内 RNAi 药物(siRNA、miRNA、shRNA 等)的一般给药用量参考

综合大多数报道的研究结果, 进行动物体内实验时可参考如下用量剂量:

1、局部给药

小鼠每次每个部位 RNA 给药量(小鼠一般体重约为 15-25g): 0.05-0.50mg

大鼠每次每个部位 RNA 给药量(大鼠一般体重约为 150-250g): 0.1-1.0mg

2、全身给药

小鼠每次 RNA 给药量(小鼠一般体重约为 15-25g): 0.5-5.0mg/kg

大鼠每次 RNA 给药量(大鼠一般体重约为 150-250g): 1.0-10mg/kg

不同种类实验动物一次给药能耐受的最大剂量可参考下表 (mL)

动物名称	灌胃	皮下注射	肌肉注射	腹腔注射	静脉注射
小鼠	0.9	1.5	0.2	1	0.8
大鼠	5.0	5.0	0.5	2	4.0
兔	200	10	2.0	5	10
猴	300	50	3.0	10	20
犬	500	100	4.0	—	100

常见问题

1. 订购金拓思 siRNA 套餐，独家专利技术设计 siRNA，在保证细胞转染效率（ $\geq 70\%$ ）的前提下，siRNA 可达到 70%或以上的沉默效果。若经 qRT-PCR 鉴定，套餐中 3 对 siRNA 均未达到 70%或以上的沉默效果，金拓思将根据您提供的实验结果进行分析。如核实为 siRNA 设计问题，则重新设计并免费合成针对靶基因的另外 3 对 siRNA。如果再无效，全额退款。特殊物种（除人，大鼠，小鼠以外、）及 lncRNA 除外，不退款。
2. 金拓思的 siRNA 套餐里面含有针对目的基因设计的 3 条 siRNA，赠送普通 NC，NC-FAM，阳性对照。
 - a) NC-FAM：实验开始前，请先用 NC-FAM 进行预实验，根据您用的转染试剂说明书转染 NC-FAM，换液后可通过荧光直接观察明确最佳转染效率后再进行后续实验安排。一般情况 FAM 在转染后 48 小时内就会淬灭。
 - b) 阳性对照用途：提供的 GAPDH siRNA 均为验证过有效的 siRNA。如果实验组和 GAPDH 组都未出现有效下调则有可能实验转染步骤存在问题，请优化实验条件后再进行相应实验。
 - c) NC：用于确保实验过程中其它因素导致了目的基因的 RNA 水平变化。NC 组实验结果应与空白组实验结果一致。
3. 无论您用什么转染试剂，转染时尽量不要加血清，血清里面的小分子会与 siRNA 竞争性进入细胞，会影响转染效率。
4. 转染后一般推荐 8-12h 换液，这时可以加血清。与正常培养细胞一样。
5. 转染前应根据细胞种类、省长速度等因素决定转染时的细胞密度。推荐细胞密度在 60%-80%时进行转染实验。细胞密度过低将影响检测结果。siRNA 会随着细胞增殖降低在细胞内的浓度。例如：转染时细胞密度 50%，转染效率达到 100%，siRNA 的有效率也 100%，36h 后细胞长满平皿进行检测。最后提的是总 RNA 沉默效率可能只有 50-60%。细胞密度过大，如超过 90%，也会影响转染效率且后期细胞会由于密度过大生长情况受到影响无法得到理想实验结果。
6. siRNA 进入细胞后还要进行解链，反义链寻找结合位点，经过酶剪切再将目的 RNA 降解。建议转染完换液后 24-36h 提总 RNA，做 qRT-PCR 检测，48-72h 提蛋白做 WB 检测。
7. 因为 RNAi 实验是直接作用与 mRNA 的，所以我们只能保证 mRNA 水平有效，不能保证蛋白水平有效。我们遇到过 mRNA 水平下调，蛋白水平没有变化的例子。
8. 普通的 siRNA 进入细胞后能维持沉默效果大概 1-3 天。加化学修饰的 siRNA 能维持 2-5 天。
9. 目的基因 ΔCt 与管家基因如 GAPDH ΔCt 值相差在 15 以内才适合做 RNAi 实验。如基因本身表达量很低，效果往往不会太理想。
10. 正常实验组应该有 1.空白组（什么都不加的）；2.只加转染试剂的组；3.NC 组；4.siRNA 组；5.阳性对照组。理想的结果是 1.2.3 组的数据应该相同，或者差别不大。
 - 1) 如果 NC 组与空白组比下调超过 50%说明 NC 起作用了，说明 NC 毒性大。这时应该降低 siRNA 和 NC 的用量。降低用量后，下调还是明显，就要换一个 NC 试一试。
 - 2) 如果 2 与 1 比下调明显，说明转染试剂毒性太大，需要更换转染试剂。