

# 产品简介

**siRNA 产品使用说明**

常规化学合成 siRNA 为 21～23nt 的双链小分子 RNA，产品为冻干粉形式的即用型试剂。

# 运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收到产品后，请于-20℃～-80℃保存，冻干粉可以稳定保存一年。

使用前瞬时离心，用RNase-free H2O或灭菌ddH2O配制成 20μM储存液，分装保存，避免反复冻融（建议不超过 5 次）。

**表 1** 20 μM 储存液的配置方法

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| siRNA(nmol) | 2.5 | 5 | 10 | 50 |
| 溶解体积(μl) | 125 | 250 | 500 | 2500 |

注：1OD duplex=2.5nmols=40μg

### 使用须知：

1. siRNA呈很轻的干膜状附在管壁上，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 H2O或灭菌ddH2O后盖上管盖，震荡溶解。
2. 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℃～-80℃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,Biomics 建议：

1. 转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；
2. 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

### 转染浓度：

* 1. 为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染siRNA的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系， 推荐尝试使用几个LipofectamineTM 2000 的浓度，并在 20-100nM范围内改变siRNA的浓度，以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件。高浓度的siRNA可能具有细胞系依赖性。
	2. 在 30-50％细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72 小时进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间更长的间隙更长，从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性，高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。
	3. 不要在转染时的培养基中加入抗生素，因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。
	4. 为了获得更好的结果，可以使用Invitrogen 的Opti-MEM低血清培养基在形成复合物前稀释LipofectamineTM 2000 和siRNA。 可以使用荧光标记的siRNA帮助优化细胞系的转染条件。一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验都包括荧光标记siRNA，作为转染效率的指示剂

### 转染步骤

以LipofectamineTM 2000 转染siRNA于 24 孔板，转染浓度为 50nM为例，其他规格容器转染请参考表 2。

1. **接种细胞**

**贴壁细胞：**转染前 24 hrs，在 400 µL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×105 个细胞，转染时细胞融合度为 30 - 50%。(注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长。)

**悬浮细胞：**转染前 24 hrs，在 400 µL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×105 个细胞，转染时细胞数量应在 4 - 8×105/

孔。

## 转染步骤

* 1. 用 50 µL Opti-MEM 稀释 siRNA (转染细胞的终浓度为 50 nM) ，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀。
	2. 轻轻颠倒混匀转染试剂，用 50µL Opti-MEM稀释 1.0 µL LipofectamineTM 2000，轻轻吹吸 3 – 5 次混匀，室温下静置 5 min。
	3. 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 20 min。
	4. 转染复合物加入到 24 孔细胞板中，100 µL/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。
	5. 细胞板置于 37℃、5% CO2培养箱中培养 18 - 48 hrs。转染 4 - 6 hrs 后可换新鲜培养基表

**表 2** 使用 lipofectamine2000(invitrogen)转染 siRNA 产品用量参考

V1：完全或不完全培养基；v2: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素，转染专用)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 每孔中总体积(v1+v2+v2) | 终浓度 | siRNA 产品 | lipo2000/孔 |
| 96-well | 100µl (50µl+25µl+25µl) | 100nM | 0.5µl | 0.25µl |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 50nM | 0.25µl | 0.25µl |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 30nM | 0.15µl | 0.25µl |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 20nM | 0.1µl | 0.25µl |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 10nM | 0.05µl | 0.25µl |
| 24-well | 500µl (400µl+50µl+50µl) | 100nM | 2.5µl | 1µl |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 50nM | 1.25µl | 1µl |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 30nM | 0.75µl | 1µl |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 20nM | 0.5µl | 1µl |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 10nM | 0.25µl | 1µl |
| 12-well | 1mL (800µl+100µl+100µl) | 100nM | 5µl | 2µl |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 50nM | 2.5µl | 2µl |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 30nM | 1.5µl | 2µl |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 20nM | 1.0µl | 2µl |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 10nM | 0.5µl | 2µl |
| 6-well | 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 100nM | 10µl | 5µl |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 50nM | 5µl | 5µl |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 30nM | 3µl | 5µl |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 20nM | 2µl | 5µl |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 10nM | 1µl | 5µl |

注：表中数据仅供参考，对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化。

## 效果检测：

转染完成后 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，检测目的等相关。1） RNA 水平的检测：mRNA 是检测 siRNA 沉默效率的最佳指标，siRNA 转染后 24~72 h 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，需要确保检测引物有效性。

1. 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 48~96 h。
2. 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：

##  提供动物实验用的各种修饰 siRNA 产品及脂质体包载 RNA 制剂服务。

**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。