

细胞用 siRNA 使用说明书

产品介绍

本公司生产的 siRNA 均为化学方法合成并经 HPLC 纯化的双链小分子 RNA，即用型，可直接用于细胞转染使用。

产品类型 (表 1)

产品类型	目标基因 siRNA	siRNA NC 阴性对照	FAM-siRNA 转染对照	阳性对照 siRNA	GA-RNA Transfection Kit 转染试剂	DEPC 水	目标基因 qPCR 引物
单条 siRNA	6nmol	X	X	X	X	√	X
三保一套装	6nmol * 3 条	6nmol	3nmol	3nmol	X	√	X
四保一套装	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	X	√	X
三保一套装 pro 版	6nmol*3 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	X
四保一套装 pro 版	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	X
三保一套装 max 版	6nmol*3 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	5nmol*1 对
四保一套装 max 版	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	5nmol*1 对

使用前须知

产品形式：冻干粉(由于影响结晶形态的因素很多，产品外观有些差异，甚至形态无法用肉眼可见，此为正常现象)

运输条件：常温运输

储存条件：请于 -20℃ ~ -80℃ 条件下存放，冻干粉可以稳定保存一年。

注意事项 1：siRNA 在操作过程中，需注意避免（核酸酶 RNAase，温度，极端 PH 等）可能导致的产品降解。请遵循 RNA 操作规范，戴手套操作，ep 管，移液枪和枪头等都要避免污染，实验过程中，产品最好于冰上放置。

注意事项 2：使用前请瞬时离心（在最大转速约为 4,000g 的低速条件下离心装有 siRNA 的 EP 管，让 siRNA 聚集在试管的底部）轻轻的打开管盖，用 DEPC 水或者 RNase free water 配制成 20μmol/L 的 siRNA 储存液，柔和地用移液枪吹打充分混匀 siRNA 储存液。分装保存于 -20℃ ~ -80℃，避免反复冻融（不超过 5 次）。

siRNA	3nmol	5nmol
DEPC 水	150ul	250ul

表 2 20μmol/L 的 siRNA 储存液的配置参考

注：若搭配 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂不得使用 PBS 或培养基稀释 siRNA

siRNA 的细胞转染步骤

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，

1、一般建议：

1. 接种细胞时的每个孔的细胞密度，数量保持尽可能一致，且细胞均匀分布。
2. 转染实验每个转染处理组建议设置至少 3 个复孔；
- 3: 基安生物推荐的 siRNA 转染终浓度为 40nmol/L, 该浓度对于多数情况可以达到较为理想的 siRNA 干扰效果, 不同类型的细胞以及研究目的的 siRNA 的最佳转染终浓度各不相同。最佳转染效率建议通过调整 siRNA 的用量（优化范围推荐 5~100nmol/L）来进行优化。
- 4: 转染时的细胞密度应根据细胞生长速度、大小、后续检测时间等条件进行调整。

转染步骤示例：

以基安生物的 GA-RNA Transfection 转染试剂（转染试剂组成见表 3）转染 siRNA（6 孔板，siRNA 转染终浓度为 40nmol/L）为例，其他规格容器的试剂用量请参考表 4，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

基安生物的 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂

GA-RNA Transfection Kit 转染试剂是一种专门用于小片段 RNA（siRNA /ASO / miRNA mimic/ miRNA inhibitor /piRNA / tRNA 等）的高效低毒转染试剂（不建议转染质粒），极具生物相容性，转染效率优异，细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便，快捷，高效。

GA-RNA Transfection Kit 组成	100ul	0.5ml	1ml
GA-RNA Reagent	100ul	0.5ml	1ml
GA-RNA Buffer	1ml	5ml	10ml

表 3 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂成分组成及规格

注) GA-RNA Transfection Kit 转染试剂为常温运输，长期储存为 2~8℃保存，可稳定保存一年，不可冷冻，冷冻后会破坏 Reagent 组分的结构和性状，会极大的影响细胞转染效果。推荐转染前细胞密度 50% ~80%为最佳。

1、细胞接种：

贴壁细胞：以 293T 细胞为例，接种~ 0.4×10^6 个细胞到含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中，使细胞转染时达到 50-80%细胞密度。

悬浮细胞：以 THP-1 细胞为例，接种~ 0.5×10^6 个细胞至含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中。

注) 1: 不同细胞初始接种数量依据不同的细胞大小，细胞类型和细胞生长速度，培养时间，实验目的相应调整，每个孔接种的细胞数量尽可能相同，且细胞均匀分布。

2: 悬浮细胞、免疫细胞、原代细胞本身的特性普遍比较较难转染，可通过调整 siRNA 用量以及转染试剂的用量，不同的转染试剂及尽可能规范实验操作等来尝试提高转染效果，如无明显改善可更换为电转方式或其他方法。

2、siRNA 转染

siRNA 预混液制备：取无菌无酶 EP 管一支，加入 46ul 的 GA-RNA Buffer 和 4ul 的 20umol/L 的 siRNA 储存液，吹打混匀。

siRNA-GA 转染复合物制备：取 7.5uL 的 GA-RNA Reagent 加入到 siRNA 预混液的 EP 管中，移液枪充分吹打混匀 20 次以上，或者旋涡 2-3s。

注: a)转染复合物在室温下可稳定存放 8 小时，请勿将 siRNA-GA 转染复合物置于冷冻条件。

b) RNA/GA-RNA Reagent 的比例是 GA-RNA Transfection 转染试剂包封的关键因素，如需增减每孔 siRNA 用量，您可以按比例增加或减少加入细胞的 siRNA-GA 转染复合物的体积。

将 siRNA-GA 转染复合物加入到待转染的孔板的细胞培养基中，轻轻混匀。
 进行其他必要的特殊处理（可选，如加药处理等具体依据具体实验情况来确定）。

将培养板置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 24~96h（培养时间与实验目的相关，qPCR 一般为转染后 24-48h 收集细胞提取 RNA 检测 RT-qPCR；WB 一般为转染后 48-96h 收集细胞检测 WB）。

试剂	孔板			
	96 孔(ul)	24 孔(ul)	12 孔板	6 孔(ul)
GA-RNA Buffer	2.3	11.5	23	46
20umol/L siRNA 储存液	0.2	1	2	4
GA-RNA Reagent	0.38 或 0.75	1.9 或 3.8	3.8 或 7.5	7.5 或 15

表 4 终浓度 40nmol/L siRNA 不同培养皿的推荐转染用量

注)提供 2 种不同的 GA-RNA Reagent 转染浓度，具体浓度可根据不同的细胞摸索选择，对于多数细胞通常按照低剂量 GA-RNA Reagent 用量即可达到理想的转染效果。

3. siRNA 效果检测

RNA 水平检测：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干扰效率不佳甚至检测不到干扰效果。（注：检测的 qPCR 引物设计质量很重要，我司（基安生物）可提供优质的 qPCR 引物设计合成）

蛋白水平检测：对于编码蛋白的基因，如需进行蛋白水平检测，推荐转染后 48-96h 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，以确定 siRNA 是否起作用。（注：wb 检测的抗体质量很重要，我司（基安生物）可提供优质的 wb 抗体）

常见问题

1. 基安生物 siRNA 套餐售后说明：在细胞本身转染效率能够达到 80% 及以上转染效率，且目标基因本底的表达丰度和内参 GAPDH/ β -actin 的 Ct 值差值在 15 个 Ct 以内的情况下，siRNA 可达到 70% 以上的沉默效果。若经 qRT-PCR 鉴定，套餐中 3/4 条 siRNA 均未达到 70% 或以上的沉默效果，基安将根据您提供的实验结果进行分析。如核实为 siRNA 本身效果不佳，可免费重新设计并合成针对靶基因的 2 条新的 siRNA。特殊物种（除人，大鼠，小鼠以外）的基因，lncRNA/circRNA 不享受此售后条款。

2. siRNA 实验的组别设置：

- 目标基因 siRNA 处理组（用于检测针对目标基因设计合成的 3/4 条 siRNA 分别的有效性和效果，进而筛选出效果最佳的 siRNA 序列）
- siRNA NC 阴性对照组 使用阴性对照 siRNA NC 进行转染，用于说明目标基因 siRNA 作用的特异性，作为分析目的基因 siRNA 作用的参照。（若相比 e 组，细胞状态明显变差或数量显著降低，则说明 siRNA NC 对目标细胞可能存在明显毒性，建议更换阴性对照 siRNA）
- 阳性对照 siRNA 处理组：提供的 GAPDH siRNA 为已验证有效的 siRNA。如果 si-GAPDH 处理组相比 siRNA NC 对照组未出现 GAPDH 的有效敲低则说明细胞本身的转染效率/实验转染操作很可能存在问题，若敲低效果很好则可说明细胞转染率好且实验操作及方法正常。也可使用其他自己已验证明确有效的 siRNA 进行转染并检测沉默效率。（若阳性对照 siRNA 为 si-GAPDH，则 qPCR 的内参需变更为 ACTB 或者其他内参）



- d) FAM-siRNA NC转染对照处理组：使用荧光对照siRNA进行转染，检测当前转染条件下细胞的转染效率。
- e) 转染试剂处理组：使用转染试剂进行转染，但不加siRNA，用于排除转染试剂本身对细胞可能的影响。（若相比f组，细胞状态明显变差或数量显著降低，则说明转染试剂对目标细胞可能存在明显毒性，建议更换转染试剂）
- f) 空白细胞组：未经任何转染处理的细胞，用于观测整个实验过程细胞的生长状态。
- （注：其中c, d组可任选其一，两者主要目的都是为了检测细胞转染效率，所有的目标基因siRNA的抑制效果均需和siRNA NC阴性对照组对比计算得出。理想的结果是b.e.f 组的数据应该基本一致差别不大，且a组相比b组目标基因的mRNA降低70%及以上。C组相比b组阳性基因的mRNA降低70%及以上）

RNAi实验是直接作用于目标基因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。mRNA水平的变化并不一定和蛋白水平完全对应。siRNA因为受到细胞及培养基环境中的核酸酶以及细胞本身的有丝分裂及新陈代谢等因素的影响，siRNA转染后可以大约维持3-4天的沉默效果。

3. 基因沉默效果不佳改善建议：

1) 提高转染效率

良好的转染效果是RNAi实验成功的基本前提。若基因沉默效果不佳，需优先排查转染效率方面的问题，可通过阳性对照siRNA/FAM-siRNA 转染对照来评估确认细胞转染效率。确认转染效率之后，如果转染效率不理想，则依据转染试剂相关说明进行转染条件（细胞密度，转染试剂用量，转染时间，siRNA用量等）优化尝试，其次可尝试在其他类型细胞上进行转染。若由于实验细胞本身的特性很难转染，可考虑更换转染试剂或转染方法（如电转），或者在实验本身允许的情况下更换易于转染的其他细胞。

2) 检测目的基因初始的表达水平

若目的基因在实验细胞中的原本的表达丰度很低，是难以得到有效的沉默的。一般目的基因与管家基因GAPDH或ACTB的 Δ Ct值差值为10以内，比较适合做RNAi，若 Δ Ct值差值大于15则很难得到有效的沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况，若实验本身允许的情况下建议更换实验细胞。

3) 优化siRNA浓度

siRNA在一定的丰度下才能达到理想的作用效果，可根据基安生物推荐浓度（40nmol/L的转染终浓度）进行预实验测试，再结合实验细胞系类型及目的基因的表达水平设置siRNA浓度梯度来优化siRNA最适浓度。

4) 检测分析方法有误

qPCR引物的特异性不佳或使用有误，检测时间点设置不合理，对照组别设置错误，对照样本异常，实验样本检测数据不稳定等因素都会对后期实验数据分析造成影响，此类问题需根据具体的问题有针对性地进行分析调整。

5) 更换其他siRNA

若确定转染效果良好，目标基因表达水平符合要求，RNAi的qPCR检测实验的引物特异性良好，及其他因素分析都没有问题的情况下，却没有达到理想的基因沉默效果，则可以尝试重新设计合成新的siRNA尝试。

（注：由于RNA本身序列特性，目标基因靶位点的二级结构复杂等因素，目前，没有任何公司或者个人能够保证设计合成的每条siRNA都可以对目标基因达到很好的敲低效果）

6) 其它原因

部分基因因其本身表达调控特性导致其难以沉默，在排除转染效率，基因表达水平、siRNA 浓度，实验操作等方面的问题，且尝试过5条以上siRNA，均无法有效敲低的情况下，则应考虑更换细胞进行尝试，或者更换其他方法如Crisp等来进行尝试。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源，GeneAdv Co. Ltd, Suzhou, China, 基安生物技术(苏州)有限公司。对于引用注释本公司产品发表的SCI paper, 联系销售或者本公司，可获取对应的科研奖励金。