
siRNA 使用指导书

版本: V1.0
发布时间: 2024 年 9 月

目录

概述.....	2
siRNA 套餐说明.....	2
产品保存.....	3
配制方法说明	3
细胞转染操作流程.....	3
常见问题 (FAQ)	7

概述

siRNA 又被称为短干扰 RNA (short interfering RNA) 或沉默 RNA (silencing RNA), 是一个长 20 到 25 个核苷酸的双链 RNA, 可与目标 RNA 结合形成复合体进而被细胞内的 RISC 系统特异性的剪切, 来抑制目标 RNA 的表达。siRNA 是基因沉默实验最常用的工具之一, 在基因功能验证和药物靶向研究等领域中发挥着重要的作用。

生工生物工程(上海)股份有限公司(下称生工生物)提供适用于常规细胞实验的**常规 siRNA** 和**修饰 siRNA** 的设计和化学合成服务。本公司设计的常规化学合成 siRNA 为 21 nt 的 RNA 双链分子, 包含 19 nt RNA 序列和 2 nt 3'端 dTdT 悬垂, 无其它化学修饰。



图 1. siRNA 结构

注: 蓝色字体为设计序列, 根据靶标 RNA 进行更换; 黑色的 dTdT 为 3'端悬垂, 可显著提高 siRNA 的稳定性。Sense 链: 正义链, 序列与目标 RNA 靶标序列相同; Antisense 链: 反义链, 序列与目标 RNA 靶标序列互补。

siRNA 套餐说明

- siRNA 对照:** siRNA 对照是 RNAi 完整实验的重要组成部分, 主要包括: 阳性对照、阴性对照、空白对照、荧光转染对照等组分 (siRNA 套餐仅提供通用阴性对照, 如需订购 scrambled 对照可额外说明。**scrambled 阴性对照:** 与靶标基因 siRNA 序列具有相同的碱基组成, 但不可靶向目的基因或宿主其它基因, 对宿主基因无任何干扰作用)。
- 阳性对照:** 以宿主内源基因 (如 GAPDH)、报告基因或其它已经证明具有可靠抑制作用的基因 (转录水平抑制程度大于 70%) 为靶标的 siRNA, 用以确认 RNAi 实验中转染、RNA 提取和基因转录水平分析等系列操作无差错。生工生物 siRNA 套餐人源基因常用阳性对照基因为 GAPDH, 小鼠基因常用阳性对照为 GAPDH, 大鼠的阳性对照为 β -actin。
- 阴性通用对照:** 与目标宿主或目的基因序列无同源性的普通阴性对照, 对宿主基因无任何干扰作用。
- 荧光转染对照:** 用于指示细胞转染效率的常用方法。转染荧光标记 siRNA 后, 可直接用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等观察细胞, 也可通过流式细胞仪对荧光细胞和无荧光细胞进行分选, 来确认转染是否成功以及转染效率。此外, 荧光标记还可用作示踪剂, 展示 siRNA 在胞内的定位及分布情况。siRNA 套餐内荧光标记对照一般选用 FAM 荧光基团, 使用时注意选择合适的激发波长和发射波长 (采用显微镜直接观察时, 同一位置曝光时间不宜过长, 防止曝光时间过长导致荧光淬灭)。
- 转染试剂对照:** 用于指示转染试剂对细胞的毒性和转染效率等因素。有些转染试剂对细胞具有毒性作用, 可能会影响细胞生长状态和基因表达。
- siRNA 实验组:** siRNA 套餐针对单一基因设置了两组及以上靶向不同位点的 siRNA, 测试时需设置多个实验组同步测试。

注: 本公司合成的 siRNA 产品最终交付的是退火后的双链 RNA。

产品保存

生工生物化学合成的单链或双链 RNA 均为冻干粉形式, 以低温冰袋方式运输。使用前请注意, 切勿开盖, 以免干粉散失。

产品收到后如不立即使用, 请将产品放于 -80°C 干粉保存, 干粉可以稳定保存 6 个月~1 年。建议现用现配, 如配好的母液未一次性用完, 建议将母液分装后于 -80°C 冻存, 随用随取, 避免反复冻融 (不超过 5 次)。荧光标记 RNA, 如带有 FAM、VIC、ROX、Cy5 等基团对光敏感, 在保存和体系配制时注意避光。

为避免外界因素导致产品降解或污染, 所有操作须严格遵循 RNA 操作要求。

配制方法说明

1) 收到样本后请按以下方法操作:



(1) 离心

开盖前请先离心, 4,000 rpm, 30-60 s;
目的: 由于干粉 Oligo RNA 呈很轻的干膜状附在管/孔壁上, 打开前离心可防止散失。



(2) 缓慢打开管盖

小心轻柔地打开管盖, 加入 RNase-free H₂O 水或其它缓冲溶液 (推荐加入量参见下方浓度配制建议);



(3) 混匀

重新盖上盖, 放置于漩涡震荡仪上充分混匀, 备用。

2) 浓度配制

加入 DEPC 处理水或其它缓冲液 (RNase free) 前, 请认真查看 EP 管上的标签, 确认 RNA 的 nmol 量, 根据您需要的母液进行浓度配比。配制成 20 μM 、50 μM 、100 μM 的母液, 不同 RNA 量所需要添加的 DEPC 处理水或缓冲液体积用量, 如下表:

母液浓度 \ RNA 的量	0.5 nmol	1 nmol	2 nmol	5 nmol	10 nmol
20 μM	25 μl	50 μl	100 μl	250 μl	500 μl
50 μM	10 μl	20 μl	40 μl	100 μl	200 μl
100 μM	5 μl	10 μl	20 μl	50 μl	100 μl

温馨提示:

- 使用前, siRNA 最好放置在冰上, 要求无 RNase 环境, 与产品接触的枪头、EP 管等试剂耗材均应无 RNase。
- 1 OD/管的 siRNA 相当于 2.5 nmol, 加 125 μl 的 DEPC 处理水溶解就可以配成 20 μM 浓度的母液; 2 OD/管的 siRNA 相当于 5 nmol, 加 250 μl 的 DEPC 处理水溶解就可以配成 20 μM 浓度的母液, 轻摇混匀, 备用。

细胞转染操作流程

1. 转染试剂

siRNA 抑制效率受细胞类型、转染方法和效率、检测时间等多方面因素影响, 开始实验前需要针对具体应用选择合适的实验方法。推荐使用生工生物 RNA 转染试剂 (产品编号: E607402)。该试剂是一种高效、低毒适合 RNA 专用的细胞 RNATransMate 转染试剂, 具有毒性低、稳定性好、转染效率高、RNA 有效转

染浓度低(最低 5 nM)等优势,可对 asoRNA、siRNA、miRNA (mimics/inhibitors) 等转染。RNATransMate 转染试剂的主要作用成分是由一种天然有机大分子经过人工修饰合成的衍生复合物,该试剂在悬浮细胞和贴壁细胞中均可实现高效率的转染,已成功地应用于多种代表和各种来源的细胞类型:包括 A549 (肺癌细胞),HAMSC (人大动脉平滑肌细胞),HEKa (人表皮角质细胞),HepG2 (肝癌细胞),MDA-MB-435 (乳腺癌细胞),HRE (人肾脏上皮细胞),HeLa (宫颈癌细胞),HT1080 (人纤维肉瘤细胞),HUVEC (人脐静脉内皮细胞),MCF7 (乳腺癌细胞),Mesenchymal stem cells (骨髓细胞),NTERA-2 (畸胎瘤细胞),SK-N-SH (神经母细胞瘤)等。

2. 实验前准备

- 1) 对实验操作台和空间进行消杀处理,保证体系不受 RNase 干扰;
- 2) 准备配制好的 siRNA、siRNA 对照(阴性对照、阳性对照、荧光转染对照)放于冰上;
- 3) 准备转染试剂、RNase free 的耗材(枪头、EP 管等)、无血清培养基;
- 4) 准备足够量的细胞,满足转染试剂对照组、阴性对照组、阳性对照组、荧光转染对照组、实验组设置需求。

温馨提示: 建议各组内至少设置 3 个复孔,保证实验的可靠性和可重复性。

3. 操作步骤(以 24 孔板、30 nM siRNA 终浓度为例)

1) 准备细胞

贴壁细胞: 在转染实验开始前,将细胞培养在细胞板上,加入合适的培养基,应能在 12~24 小时内使细胞汇合度达到 60-70% (细胞生长快,前期铺板的细胞数量可以少点;细胞生长慢则相应多点)。

悬浮细胞: 在转染实验开始前,在 350 μ l 无抗生素培养基中接种 $0.5\sim 2\times 10^5$ 个细胞,加入合适的培养基,转染时细胞数量 $4\sim 8\times 10^5$ /孔。

2) 准备转染工作液

a) 将 2 μ l (20 μ M siRNA 母液) 稀释于 200 μ l 不含血清的无血清培养基中(此时 siRNA 浓度为 200 nM)。轻轻混匀,室温孵育 5 分钟。

b) 使用前轻轻混匀 RNA TransMate, 然后取 3 μ l 稀释于 195 μ l 无血清培养基中。轻轻吹打混匀,室温孵育 5 分钟。

c) 将步骤 b) 中溶液轻轻混合均匀,加入到步骤 a) 的溶液中。轻轻吹打混匀,室温静置 10 分钟(溶液可能呈浑浊状),以便形成 siRNA/RNA TransMate 复合物(此时 siRNA 终浓度 100 nM)。

温馨提示:

1. 如果不确认 siRNA 浓度是否合适,推荐使用 5 个梯度进行测试,分别为 2.5 nM、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM,需要根据不同细胞筛选不同的转染浓度。
2. 表 1 中给出了不同孔板和不同 siRNA 浓度的配制体系,按表中体系直接配制可满足最大 30 nM siRNA 单组三个重复孔的用量,如需多个孔可等比例放大,或按孔数 n+1 配制。

3) 细胞转染

a) 吸弃孔板中的细胞培养液,在每孔细胞中加入 350 μ l 新鲜的无血清培养基;

(**温馨提示:** 吸取培养液时要尽可能轻柔,不要破坏贴壁细胞状态,悬浮细胞需要离心并小心吸弃上清。)

b) 吸取上述转染混合液,按每孔 150 μ l 逐滴滴入步骤 a) 的细胞中,轻轻摇动孔板混匀,置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;

- c) 4-8 小时后, 吸弃转染培养液, 更换 500 μl 新鲜有血清培养基后继续培养;
d) 转染 24-48 小时后, 观察或收取细胞。

温馨提示: 最佳检测时间与细胞类型、转染试剂、RNA 浓度、检测项目等相关, 可根据具体项目进行实验调整。

表 1. RNA TransMate/siRNA 复合物用量配比表

培养板	转染复合物配制		复合物添加		每孔体积	siRNA 终浓度	总量
	RNA TransMate	siRNA (20 μM)	复合物	培养基 ^a			
96-well	48.5 μl DMEM 1 μl RNA TransMate 混合均匀	50 μl DMEM 0.5 μl siRNA (10 pmol) 混合均匀	30 μl	70 μl	100 μl	30 nM	3 pmol
			20 μl	80 μl	100 μl	20 nM	2 pmol
			10 μl	90 μl	100 μl	10 nM	1 pmol
			5 μl	95 μl	100 μl	5 nM	0.5 pmol
	两管再混合均匀形成转染复合物		2.5 μl	92.5 μl	100 μl	2.5 nM	0.25 pmol
24-well	195 μl DMEM 3 μl RNATransMate 混合均匀	200 μl DMEM 2 μl siRNA (40 pmol) 混合均匀	150 μl	350 μl	500 μl	30 nM	15 pmol
			100 μl	400 μl	500 μl	20 nM	10 pmol
			50 μl	450 μl	500 μl	10 nM	5 pmol
			25 μl	475 μl	500 μl	5 nM	2.5 pmol
	两管再混合均匀形成转染复合物		10 μl	490 μl	500 μl	2 nM	1 pmol
12-well	390 μl DMEM 6 μl RNATransMate 混合均匀	400 μl DMEM 4 μl siRNA (80 pmol) 混合均匀	300 μl	700 μl	1000 μl	30 nM	30 pmol
			200 μl	800 μl	1000 μl	20 nM	20 pmol
			100 μl	900 μl	1000 μl	10 nM	10 pmol
			50 μl	950 μl	1000 μl	5 nM	5 pmol
	两管再混合均匀形成转染复合物		25 μl	975 μl	1000 μl	2.5 nM	2.5 pmol
6-well	685 μl DMEM 10 μl RNATransMate 混合均匀	698 μl DMEM 7 μl siRNA (140 pmol) 混合均匀	600 μl	1400 μl	2000 μl	30 nM	60 pmol
			400 μl	1600 μl	2000 μl	20 nM	40 pmol
			200 μl	1800 μl	2000 μl	10 nM	20 pmol
			100 μl	1900 μl	2000 μl	5 nM	10 pmol
	两管再混合均匀形成转染复合物		50 μl	1950 μl	2000 μl	2.5 nM	5 pmol

a: 如果选择不换液, 则在培养细胞时就添加好相应体积的培养基。本试剂在不换液时也可转染细胞。为保证转染效果和成功率, 推荐您进行换液操作, 并在转染时选用无血清培养基。

4. 细胞转染注意事项

- 1) **siRNA 质量:** 为获得最佳基因抑制效果, 转染 siRNA 前需确认最佳转染浓度。可按表 1 设定不同 siRNA 浓度梯度, 判断最佳转染效率与抑制效果。此外, 高纯度是 siRNA 转染成功的关键指标之一。siRNA 合成最好选择 HPLC、2X HPLC 级以上纯化方法, 保证高质量 siRNA 合成。在转染前要保证 siRNA 的含量和纯度, 所有实验操作均需按照要求进行操作, 避免 RNase 污染。

- 2) **细胞状态:** 转染时贴壁细胞的密度以 60%~70%为佳, 转染时使细胞处于对数生长期。细胞密度过高或细胞传代数过高均会影响转染效果。
- 3) 转染前及转染过程中的细胞培养基不允许加抗生素, 否则将会降低细胞转染效率甚至导致细胞死亡。
- 4) 在制备 siRNA 与转染试剂的复合体过程中不能添加或选用带血清培养基, 一定要用无血清培养基稀释 siRNA 和转染试剂, 以达到复合物形成的最佳效果。在随后的转染过程中, 也要尽可能避免血清的存在。
- 5) 预先优化转染条件, 可使用荧光标记的 siRNA 进行指示。选用转染最佳条件进行 siRNA 实验, 且在正式实验中要添加荧光标记 siRNA 组, 以指示细胞转染效率。

5. 转录水平分析

siRNA 与目的基因 mRNA 结合形成复合体, 并在 RISC 系统作用下剪切靶标 mRNA, 从而降解靶标基因, 达到抑制基因表达的目的。因此, 目的基因的转录水平与 siRNA 的基因沉默效率紧密相关。通过 qRT-PCR 检测靶标基因 mRNA 水平即可得到 siRNA 的抑制效率。mRNA 转录水平分析优选 qPCR 的 SYBR Green 染料法, 也可选用探针法(引物和探针均需提前进行特异性分析或实验验证。RNA 抽提、RT-PCR 按试剂盒说明书进行操作)。

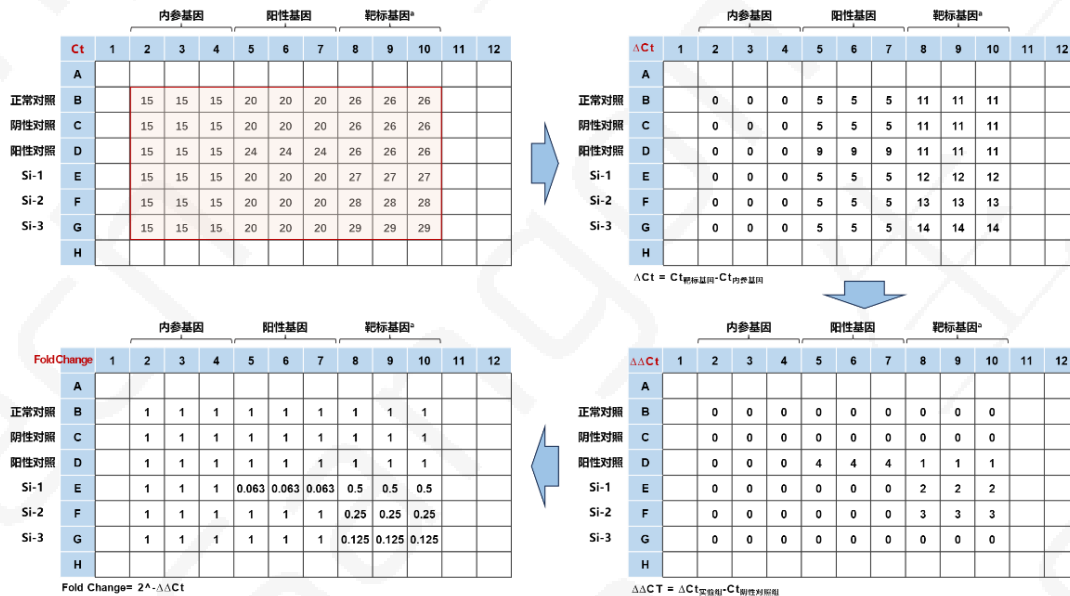


图 2. RT-PCR 96 孔板设置和表达倍数计算方式

温馨提示:

- (1) 内参基因选择在各组间均稳定表达基因, 如 actin、tubulin 等, 组内和组间最大 Ct 值误差不应超过 1;
- (2) 阳性基因可选 GADPH、MAPK1 或其它已被报道的可以实现高效抑制 (>70%) 的基因和序列;
- (3) 靶标基因抑制率>70%即可判定合格。为避免设备读取的边缘效应, 不推荐使用 96 孔板外圈孔位。

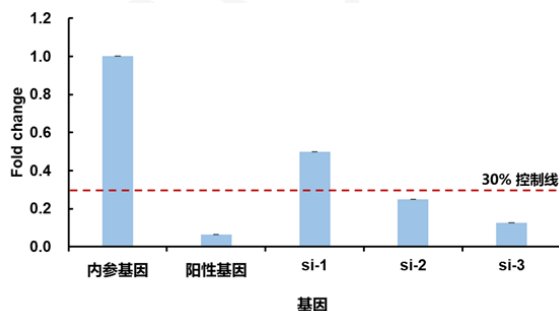


图 3. siRNA 转录水平分析

常见问题 (FAQ)

Q1 生工生物提供的 siRNA 是双链的还是单链?

生工生物交付的 siRNA 均为退火后的双链 RNA。

Q2 siRNA 合成需要提供的信息或资料?

如需定制合成, 需要准确提供 siRNA 的靶标基因的宿主、Gene ID、Accession Number、核苷酸序列等, 不建议提供基因简称, 尤其是针对非常用的模式生物。如不需设计, 客户可直接在线填写 RNA 合成订购表。

Q3 siRNA 合成的序列都是带有 dTdT 吗?

生工生物设计的 siRNA 序列 3'端均带有 dTdT 悬垂。如需其它修饰, 您可在订单备注中说明。已有研究表明, dTdT 悬垂可显著增加 siRNA 稳定性, 提高 siRNA 的抑制效率。

Q4 siRNA 运输和保存方式?

生工生物化学合成的单链或双链 RNA 均为冻干粉形式, 以低温干冰方式运输。产品收到后如不是立即使用, 请将产品放于 -80°C 干粉保存, 干粉可以稳定保存 6 个月-1 年。建议现用现配, 如配好的母液未用完, 建议将母液分装后于 -80°C 冻存, 随用随取, 避免反复冻融 (不超过 5 次)。未开封 siRNA 可于常温下短期保存, 开封后室温会快速降解。

Q5 用 50 nM siRNA 抑制效率仅有 40%, 提高 siRNA 浓度是否会提高抑制效率?

在一定浓度范围内, 增加 siRNA 浓度可提高抑制效率, 但达到一定浓度 (一般 100 nM) 后效率将不会再提升。不建议使用过高浓度 siRNA, 其可能加重脱靶效果或产生其它细胞毒性。在这种情况下, 我们推荐更改 siRNA 序列, 可获得更好的抑制效率。此外, 出现抑制效率低时还应考虑转染效率的问题, 高转染效率是高抑制效率的保证因素之一。

Q6 常用实验设置组别?

标准 siRNA 实验应至少包含六个测试组:

阳性对照、阴性通用对照、荧光转染对照、转染试剂对照、正常细胞组和 siRNA 实验组。阳性对照和阴性对照是整个 siRNA 实验组必备测试组, 不可减少。此外, 阴性对照还可辅助我们判断基因表达水平的降低是否是序列特异性的基因抑制。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。

温馨提示: 为保证售后流程顺畅, 不耽误您过多时间, 请至少设置阳性对照、阴性通用对照、荧光转染

对照、转染试剂对照和 siRNA 实验组五个测试组,并及时对荧光转染对照组进行拍照以指示转染效率。售后时,上述数据均需要提供。

Q7 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?

如果在实验组和对照组中靶标基因表达水平没有降低,在对照和转染效率也正常的情况下,可能是设计的 siRNA 抑制效率不足,需要重新设计。如果实验组和对照组基因均出现抑制,则考虑是 siRNA 或细胞污染问题,建议降低 siRNA 浓度、重新合成 siRNA 或更换新的细胞。

Q8 siRNA 标记位点选择

正义链的 5'端标记是最有效的化学合成位点,可进行荧光标记等。反义链的 5'端标记会影响 siRNA 的抑制效果,不建议您选择该位点进行标记。如需要对反义链进行标记,可选择标记在 3'端。

Q9 转染过程中发现大量细胞死亡,应该如何处理?

如果出现细胞大量死亡,意味着转染条件仍然需要优化,转染条件优化一般包括以下几个方面:更换转染试剂或调整转染试剂的浓度;调整转染后的培养基更换时间;调整转染前细胞生长状态:处于对数生长期和传代次数少的细胞对转染具有更好耐受性;调整转染试剂和 siRNA 的比例。

Q10 ASORNA 和 siRNA 的差异?

反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotide, ASO)是指 15~25 个核苷酸的化学修饰单链短核酸,能够特异性对应于其靶标 RNA。ASO 两端各 3-5 个碱基为特殊修饰碱基(2-OME、2-MOE、LNA),其余则为 DNA 碱基。siRNA 为双链 RNA,仅在 3'端具有两个 dTdT 悬垂。

Q11 基因抑制效果不理想,应该如何处理?

- 1) 基因需要一定时间表达,适当延长培养时间,检测时间一般设定为 24 小时、48 小时、72 小时。
另外,生工生物设计合成的 siRNA 只承诺对人源、大小鼠源的细胞 mRNA 水平达到 70%的沉默效率(转染效率大于 80%)。一般情况下 mRNA 水平表达下降蛋白水平也会有随之下降。但由于蛋白翻译水平调控的复杂性,不承诺蛋白水平的干扰效果,也不以蛋白水平的检测结果界定 siRNA 的抑制效率。
- 2) 更换其他 siRNA
若确定转染效果尚佳,其他因素也分析没有问题的情况下,却没有达到理想的基因沉默效果,则可以尝试更换其他 siRNA 来测试。由于 RNA 本身序列特性,或靶位点的二级结构复杂等因素,有些 siRNA 的基因沉默效果可能没有那么显著,这种情况下可以尝试更换 siRNA。
- 3) 其它原因
如目的基因的表达水平难以抑制,且已排除转染方法、转染效率、基因表达水平及 siRNA 浓度等方面的问题,并尝试过 6 对以上 siRNA,则应考虑更换细胞。