

siRNA 产品使用说明

产品信息

产品名称	siRNA
存储及运输条件	常温运输；-20℃保存。
有效期	冻干粉-20℃保存，可以稳定保存一年。

产品简介

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

产品以冻干粉形式常温运输。收货后请于-20℃条件下保存，冻干粉在该条件下可稳定保存一年。使用前请瞬时低速离心（建议转速 1000 rpm），加入适量 RNase-free 水或灭菌 ddH₂O 配制成 20 μM 储存液，分装后保存，并避免反复冻融（建议不超过 5 次）。

表 1. 20μM 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：10D duplex=2.5nmols=40μg

使用须知

▲siRNA 呈很轻的干膜状附在管壁上，开盖前先离心，然后再缓慢打开管盖，溶解时请加足量 RNasefreeH₂O 或灭菌 ddH₂O 后盖上管盖，震荡溶解。

▲为确保产品活性，避免核酸酶、极端 pH 或温度等因素引起的降解，所有操作须严格遵循 RNA 实验规范。实验过程中，建议将产品始终置于冰上操作，用毕立即转移至-20℃环境下密封保存。

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，质因生物建议：

▲转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；

▲转染实验分组设置：空白对照组（必需，不含转染试剂和 siRNA

）；阴性对照 siRNA 组（必需），转染试剂对照组（必需）；实验 siRNA 组（必需）；阳性对照 siRNA 组（可选）；荧光对照 siRNA 组（可选）；

▲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

▲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，推荐尝试使用不同浓度的 RNA 转染试剂，并在 10-100nM 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。

▲建议在细胞汇合度达到 30%~50%时进行转染。基因沉默效果的检测通常在转染后 24 至 72 小时进行。采用较低的细胞密度进行转染，可延长转染与检测之间的时间窗口，从而降低细胞过度生长对细胞活性的负面影响。然而，针对某些特定的靶基因，高密度转染条件下的细胞状态可能更适于实验条件的优化，具体需根据靶基因的特性而定。

▲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。

▲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 RNA 转染试剂和 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的 siRNA，作为转染效率的指示剂。

转染(以质因生物 ZY FectEasy RNA 转染试剂为例)

1. 接种细胞

转染前一天将细胞接种到相应的培养板中，以转染时细胞汇合度达到 30-50%为宜，见表 2。为了使用 RNA 转染试剂转染悬浮细胞取得最佳的转染效果，与常规培养条件相比，应在转染当天减少培养基体积接种细胞，可以使用半液转染法。对于不同规格的培养板，建议接种的细胞数量及完全培养基体积见表 3。

表 2. 转染前一天推荐接种细胞数（贴壁细胞）

	接种细胞数量	每孔表面积	培养基体积
96-well	5 000 ± 2 500	0.3 cm ²	0.2 mL
24-well	25 000 ± 10000	0.9 cm ²	0.5 mL
12-well	50000 ± 20 000	3.8 cm ²	1 mL
6-well	150 000 ± 50 000	9.4 cm ²	2 mL
6 cm 培养皿 / 25cm ² 培养瓶	400 000 ± 100 000	25-28 cm ²	5 mL
10 cm 培养皿 / 75cm ² 培养瓶	1 × 10 ⁵ ± 250 000	75-78.5 cm ²	10 mL
14 cm 培养皿 / 175 cm ² 培养瓶	2 × 10 ⁶ – 5 × 10 ⁶	153-175 cm ²	20 mL

表 3. 在转染当天接种的悬浮细胞数量

	接种细胞数量	培养基体积
96-well	1 000 - 20 000	50 μ l
24-well	100 000 - 200 000	150 μ l
12-well	50 000 - 400 000	300 μ l
6-well / 3.5 cm	500 000 - 2×10^5	800 μ l

2. 转染步骤

① 贴壁细胞

为了提高转染效率，建议 siRNA 浓度范围为 10 nM 至 100 nM，RNA 转染试剂用量与 siRNA 浓度和培养皿规格进行匹配。以 RNA 转染试剂转染 siRNA 于 24 孔板，转染浓度为 10 nM 为例，其他规格容器转染请参考表 4。

- 将 0.25 μ l 20 μ M 的 siRNA 双链体稀释到 100 μ l 无血清培养基中或 Opti-MEM 中，用移液枪轻轻吹打 3-5 次混匀。
- 向上述 100 μ l 含 siRNA 的培养基中加入 0.75 μ l RNA 转染试剂。加入后立即涡旋振荡 10 秒钟，进行混匀。
- 在室温下孵育 10 分钟，使 siRNA 双链体和 RNA 形成转染复合物，孵育时间不要超过 30 分钟。
- 在转染复合物形成期间，吸弃培养皿中原有的培养基，并从每孔中重新加入 0.4 mL 预热的新鲜含血清的完全培养基。
- 将步骤 C 中孵育好的 100 μ l 转染复合物加入到换液后的待转染孔中，一字法轻摇细胞板混合均匀每孔中培养基的最终体积为 500 μ l，siRNA 终浓度为 10 nM。
- 转染后细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。
- 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot（针对靶基因）进行 siRNA 效果检测。

注：针对比较敏感的细胞，建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 4. 贴壁细胞的推荐转染条件

培养板规格	siRNA 终浓度	siRNA 物质的量/质量	完全培养基体积	无血清培养基体积	培养基总体积	20 μ M 母液使用量	RNA 转染试剂体积
96-well	10-100 nM	2-20 pmol/0.032-0.32 μ g	150 μ l	50 μ l	200 μ l	0.1-1 μ l	0.2-3 μ l
24-well	10-100 nM	5-50 pmol/0.08-0.8 μ g	400 μ l	100 μ l	500 μ l	0.25-2.5 μ l	0.5-7.5 μ l
12-well	10-100 nM	10-100 pmol/0.16-1.6 μ g	800 μ l	200 μ l	1 mL	0.5-5 μ l	1-15 μ l
6-well	10-100 nM	20-100 pmol/0.32-3.2 μ g	1.8 mL	200 μ l	2 mL	1-10 μ l	2-30 μ l
6 cm	10-100 nM	50-500 pmol/0.8-8 μ g	4.6 mL	400 μ l	5 mL	2.5-25 μ l	5-75 μ l
10 cm	10-100 nM	100-1000 pmol/1.6-16 μ g	9.5 mL	500 μ l	10 mL	5-50 μ l	10-150 μ l

② 悬浮细胞

针对悬浮细胞，为了达到较高的转染效率，建议使用 20 nM-100 nM 的高 siRNA 浓度范围进行转染摸

索，同时适当提高 RNA 转染试剂的使用量：各指标参考数据见表 5。以下步骤用于在 24 孔板转染 100nM siRNA 双链体。

- A. 将 1.25 μ l 20 μ M 的 siRNA 双链体加入到 100 μ l 无血清培养基中或 Opti-MEM 中，移液枪轻轻吹打 3~5 次混匀。
- B. 向上述 100 μ l 含 siRNA 的培养基中加入 3.75 μ l RNA 转染试剂。立即涡旋振荡 10 秒钟，进行混匀。
- C. 在室温下孵育 10 分钟，使 siRNA 双链体和 RNA 转染试剂形成转染复合物，孵育时间不要超过 30 分钟。
- D. 将步骤 C 中的 100 μ l 转染复合物加入到 150 μ l 含血清完全培养基的细胞悬液待转染孔中，一字法轻摇细胞板混匀，前后轻摇细胞板混合均匀。每孔中培养基的最终体积为 250 μ l，siRNA 终浓度为 100 nM，6h 后补 250 μ l。
- E. 转染后细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。
- F. 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot（针对靶基因）进行 siRNA 沉默效果检测。

注:针对比较敏感的细胞，建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 5. 根据 siRNA 浓度和培养板规格推荐使用的 RNA 转染试剂体积

培养板规格	siRNA 终浓度	siRNA 物质的量/质量	细胞悬液 体积	无血清 培养基体积	培养基 总体积	20 μ M 母液使用量	RNA 转染 试剂体积	6h 后补 液体积
96-well	20-100 nM	2-10pmol/0.032-0.16 μ g	50 μ l	50 μ l	100 μ l	0.1-0.5 μ l	0.2-1.5 μ l	100 μ l
24-well	20-100 nM	5-25 pmol/0.08-0.4 μ g	150 μ l	100 μ l	250 μ l	0.25-1.25 μ l	0.5-3.75 μ l	250 μ l
12-well	20-100 nM	10-50pmol/0.16-0.8 μ g	300 μ l	200 μ l	500 μ l	0.5-2.5 μ l	1-7.5 μ l	500 μ l
6-well	20-100 nM	20-100 pmol/0.32-1.6 μ g	800 μ l	200 μ l	1mL	1-5 μ l	2-15 μ l	1mL
6 cm	20-100 nM	50-250 pmol/0.8-4 μ g	2mL	500 μ l	2.5mL	2.5-12.5 μ l	5-37.5 μ l	2.5mL

3. 疑难解答

问题	解决建议
较低的沉默效率	· 增加每孔中 siRNA 浓度
	· 增加每孔中 RNA 转染试剂的量
	· 检测转染 24h~96h 的不同时间点的沉默效率
	· 用 Opti-MEM 稀释 siRNA
	· 确保贴壁细胞在转染当天汇合度达到 30-50%:对于小细胞和生长缓慢的细胞类型，每孔中接种约 2mL
	· 确认所有试剂是否不含 RNase
	· 确保 siRNA 是高质量的(PAGE 纯化和脱盐)
	· 确认 siRNA 双链体的浓度和退火条件
	· 将转染期间的培养基体积减少一半并低速离心培养板(180g, 5min)。4h 后，加入 0.5 mL 培养基

细胞毒性	· 通过在转染后 4 至 6 小时更换培养基或简单地向培养基中添加新鲜培养基，减少 RNA 转染试剂/siRNA 复合物与细胞的孵育时间
	· 减少转染试验中使用 RNA 转染试剂的体积
	· 核实沉默靶基因后是否影响细胞活力