**siRNA 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。

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

荧光标记的RNA，如FAM等标记的Oligo因为对光敏感，必须避光保存。

使用须知

1)siRNA呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先**高速离心**，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量DEPC H2O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°C~-80°C小心保存。

3)使用前瞬时离心，用DEPC H2O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 20μM储存液的配置方法（1nmol定容到100uM的体积\*5，nmol数\*500）

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

**对照组的设立**

表2 对照组说明

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **序号** | **分组** | **说明** |
| **\*NC组** | 阴性对照 | 阴性对照（NC组）为与目的基因的序列无同源性的普通阴性对照，用于说明siRNA作用的特异性，作为分析目的基因siRNA作用的参照。 |
| **\*FAM-NC组** | FAM阴性对照（荧光标记阴性对照） | 使用荧光标记的siRNA进行转染，通过标记荧光，可以方便地在荧光显微镜下观察转染情况，用于优化转染条件和评价当前转染条件下细胞的转染效率；一般转染后2~6h可以观察荧光。 |
| **Positive** | 阳性对照 | 使用已明确有效的siRNA进行转染并检测沉默效率，若抑制率高则可说明转染率高且检测方法正常。阳性对照可用于实验系统的检测，确认RNAi实验中转染、RNA提取和基因表达检测方法是否可靠。阳性对照包括GAPDH、Beta-Actin等。 |
| **Blank组** | 正常细胞对照组 | 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及分析的参考。可根据实验情况设立。 |
| **Mock组** | 转染试剂对照组 | 使用转染试剂进行转染，但不加入siRNA，用于排除转染试剂对细胞可能的影响及分析参考。 |

**正式实验为实验组、NC组（\*必做）和FAM-NC组（\*必做），实验组的抑制效果均需与NC组比较。**

在预实验中设置Blank组和Mock组，以确认转染试剂及阴性对照无毒副作用，且对基因沉默检测指标无显著干扰影响。

在预实验中设置FAM-NC组进行转染效率检测，以确定适合的转染试剂及转染条件。

**细胞实验建议**

1) 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，我们建议转染实验中每个转染样品至少设置3个复孔；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。

2) 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Lipofectamine™2000的浓度，并在**20-100 nM**范围内改变siRNA的浓度，以确定最佳条件。

3) 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24~72h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。

4) 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。

5) 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Lipofectamine™2000和siRNA。可以使用荧光标记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转染荧光标记siRNA，作为转染效率的指示剂。

**转染步骤**

合适的siRNA:lipofetamin2000比例对核酸的高效转染有重要影响；我们推荐的siRNA:lipofectamin2000为1:0.01-1:0.1(pmol:ul)。

一般情况下，此范围内都可获得高的转染效率。以Lipofectamine™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24h，接种1~5×105个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞汇合度能够达到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24h，接种1~5×105个细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时细胞数量应在4~8×105/孔。

注：不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量，密度需要依据细胞类型，培养时间，实验目的而定；每孔接种的细胞数量应尽量相同，使细胞均匀分布。由于自身特性问题，悬浮细胞相对较难转染，需要优化转染条件以便提高转染效果，如果细胞特殊，可更换为电转方式。

1. 转染步骤（以24孔，siRNA终浓度50 nM为例，见表3蓝色底纹\*）
2. 用50μL Opti-MEM稀释1.25μL siRNA储存液（20μM），轻轻吹吸3-5次混匀，此为V2。
3. 用50μL Opti-MEM稀释1.0μL Lipofectamine™2000（使用前轻轻摇匀），轻轻吹吸3-5次混匀，室温下静置5min，此为V3。
4. 混合转染试剂V3和siRNA稀释液V2，轻轻吹吸3~5次混匀，室温下静置20min。
5. 转染复合物（V2+V3）加入到含有细胞及培养液（V1，约400μL）的24孔细胞板中，100μL/孔，前后轻揺细胞板混合均匀。
6. 细胞板置于37°C、5% CO2培养箱中培养18~48h。转染4~6h后可将培养基换为含血清的完全培养基。
7. 表3 使用Lipofectamine2000（lnvitrogen）转染siRNA产品用量参考

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **总体积** | **V1** | **V2** | **V3** | **SiRNA终浓度** | **siRNA** | **lipo2000/孔** |
| **（Medium）** | **（含siRNA）** | **（含lipo）** |
| **96-well** | 100 μL | 50 μL | 25 μL | 25 μL | 100 nM | 0.5 μL | 0.25 μL |
| 100 μL | 50 μL | 25 μL | 25 μL | 50 nM | 0.25 μL | 0.25 μL |
| 100 μL | 50 μL | 25 μL | 25 μL | 30 nM | 0.15 μL | 0.25 μL |
| 100 μL | 50 μL | 25 μL | 25 μL | 20 nM | 0.1 μL | 0.25 μL |
| 100 μL | 50 μL | 25 μL | 25 μL | 10 nM | 0.05 μL | 0.25 μL |
| **24-well** | 500 μL | 400 μL | 50 μL | 50 μL | 100 nM | 2.5 μL | 1 μL |
| \*500 μL | 400 μL | 50 μL | 50 μL | 50 nM | 1.25 μL | 1 μL |
| 500 μL | 400 μL | 50 μL | 50 μL | 30 nM | 0.75 μL | 1 μL |
| 500 μL | 400 μL | 50 μL | 50 μL | 20 nM | 0.5 μL | 1 μL |
| 500 μL | 400 μL | 50 μL | 50 μL | 10 nM | 0.25 μL | 1 μL |
| **12-well** | 1 mL | 800 μL | 100 μL | 100 μL | 100 nM | 5 μL | 2 μL |
| 1 mL | 800 μL | 100 μL | 100 μL | 50 nM | 2.5 μL | 2 μL |
| 1 mL | 800 μL | 100 μL | 100 μL | 30 nM | 1.5 μL | 2 μL |
| 1 mL | 800 μL | 100 μL | 100 μL | 20 nM | 1.0 μL | 2 μL |
| 1 mL | 800 μL | 100 μL | 100 μL | 10 nM | 0.5 μL | 2 μL |
| **6-well** | 2 mL | 1500 μL | 250 μL | 250 μL | 100 nM | 10 μL | 5 μL |
| **2 mL** | **1500 μL** | **250 μL** | **250 μL** | **50 nM** | **5 μL** | **5 μL** |
| 2 mL | 1500 μL | 250 μL | 250 μL | 30 nM | 3 μL | 5 μL |
| 2 mL | 1500 μL | 250 μL | 250 μL | 20 nM | 2 μL | 5 μL |
| 2 mL | 1500 μL | 250 μL | 250 μL | 10 nM | 1 μL | 5 μL |

注:V1:完全或不完全培养基；

V2: Opti-MEM（无血清、无抗生素，转染专用）含siRNA储存液；

V3: Opti-MEM（无血清、无抗生素，转染专用）含lipo2000

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。

**siRNA效果检测**

转染完成后24~72h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：mRNAB检测siRNA沉默效率的最佳指标，siRNA转染后24~72h即可检测到靶基因mRNA表达明显降低，检测方法宜釆用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。

2) 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48~96h。

3) 功能筛选：可使用EdU细胞增殖、EdUTP细胞凋亡等方法进行细胞功能筛选。

**基因沉默效果不好，该如何改善？**

|  |  |
| --- | --- |
| **改善方法** | **说明** |
| 提高转染效率 | 成功的转染是RNAi实验的前提。若基因沉默效果不佳，则需先排查转染效率方面的问题，可通过检测转染效率或者采用阳性对照siRNA验证RNAi实验体系。首先可依据转染试剂说明书进行转染条件（细胞密度，转染试剂用量，转染时间等）优化尝试，其次可尝试在其他细胞类型上进行转染。若由于实验模型限制无法使用其他细胞，可考虑更换转染试剂或转染方法（如电转）。 |
| 检测目的基因表达水平 | 若目的基因在实验细胞中的表达丰度很低，是难以得到有效的沉默的。一般目的基因与GAPDH或ACTB的ΔCt值为10以内，比较适合做RNAi，若ΔCt值达到15以上则无法得到有效的沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况，建议更换实验细胞。 |
| 优化siRNA浓度 | siRNA 在一定的丰度下才能达到理想的作用效果，故可根据推荐浓度（50 nmol）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。 |
| 检测分析方法有误 | 引物使用有误，检测时间点设置不合理，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。 |
| 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，或者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。 |
| 其它原因 | 如目的基因的表达调控特性导致其难以沉默，并已排除转染方法，转染效率，基因表达水平及siRNA浓度等方面的问题，并尝试过5对以上siRNA，则应考虑更换细胞进行尝试。如无法更换细胞和感兴趣的基因，可以考虑更换为基因敲除的方式进行。 |