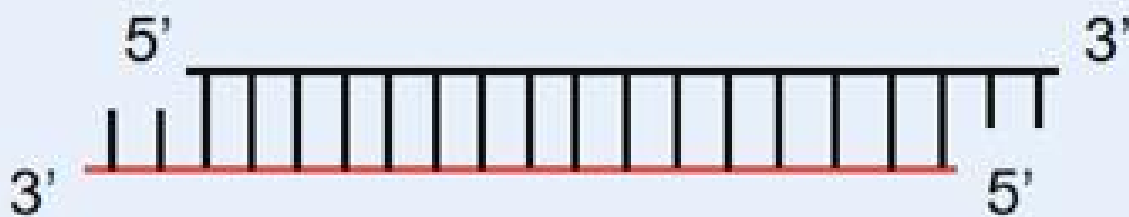




基恩科 | GENECARER

siRNA合成说明书



创新基因递送 服务人类健康

Innovative Gene Delivery Services For Human Health

产品使用说明书

1. 产品简介

化学合成siRNA为21-25 bp的即用型双链RNA。经过纯化、退火等处理，配置成工作浓度液体，即可直接用于转染细胞。产品为冻干粉，状态稳定。产品剂量经过严格测算标明摩尔数。本产品不保证靶基因蛋白水平的敲减。(oligo合成参数：rA分子量：329.21, rG分子量：345.21, rC分子量：305.18, rU分子量：306.17)

siRNA(nmol)	2.5	5	10	50	终浓度
加水量 (μL)	125	250	500	2500	20 μM
	50	100	200	1000	50 μM
	25	50	100	500	100μM

重悬siRNA缓冲液计算公式：siRNA(nmol) / 体积 (μL) = 103 μM(μmol/L)

2. 注意事项

- 产品以冻干粉的形式常温运输。建议在-20℃以下的环境中储存。注意避免反复冻融加速RNA降解，请分装保存。使用前瞬时离心，用RNase-free Water或灭菌ddH₂O配制成20 μM-100 μM储存液。siRNA平均分子量为13300。本产品干粉形式提供，干粉附在管壁上，打开时极易散失，所以开盖前请先离心，再小心打开管盖，溶解后盖上管盖振荡；
- 应当严格遵循RNA操作规则，使用RNase-free的实验耗材进行RNAi实验操作，以避免RNA降解。使用产品时最好于冰上放置；
- 带荧光标记的RNA，我公司会采用棕色离心管包装，因荧光标记对光敏感，必须避光保存，如FAM、CY3、CY5等。

3. 合成及对照说明

定制化合成			
产品名称	规格	纯化方式	周期(自然日)
普通siRNA	1-2500 OD	HPLC	4-20 天
化学修饰siRNA	咨询		

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)



对照siRNA			
产品名称	规格	纯化方式	周期(自然日)
阴性对照siRNA	1 OD	HPLC	现货
FAM标记阴性对照siRNA			
GAPDH阳性对照siRNA			
P53阳性对照siRNA			
Beta-actin阳性对照siRNA			

siRNA保障型套餐

siRNA套餐	套餐内容	规格	周期(自然日)
普通 siRNA 套餐 修饰 siRNA 套餐	目的基因siRNA oligos	3对(3×2 OD)或 4对(4×4 OD)	5天起
	阴性对照siRNA oligos	1对(1×1 OD)	
	FAM标记阴性对照siRNA oligos	1对(1×1 OD)	
	阳性对照siRNA oligos	1对(1×1 OD)	

套餐组成	交付内容介绍	
靶基因siRNA oligos	根据目的基因，设计合成3-4对siRNA。	
阴性对照 siRNA oligos	阴性对照为靶细胞无同源性的siRNA，一个严谨的RNAi实验，阴性对照是必不可少的。	
阳性对照 siRNA	一般为内参基因GAPDH的有效siRNA，用以检测实验过程中各操作步骤的可靠性。	
FAM荧光标记阴性对照 siRNA Oligos	带荧光基团的阴性对照，主要用于预实验检测目的细胞siRNA的转染效率。转染后6-12 通过荧光显微镜观察siRNA的转染效率。	
阴性对照	正义链	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
阳性对照	正义链	AGAAUGGGAAGCUUGUCAUCAATT

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)

(Mouse GAPDH)	反义链	UUGAUGACAAGCUUCCCAUUCUTT
阳性对照 (Human GAPDH)	正义链	GUAUGACAACAGCCUCAAGTT
	反义链	CUUGAGGCUGUUGUCAUACTT
阳性对照 (Rat β -actin)	正义链	GUAAAGACCUCUAUGCCAATT
	反义链	UUGGCAUAGAGGUCUUUACTT

4. 实验细胞说明

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。以此降低孔间差异，保证实验的可靠性和可重复性。（以lipo2000转染试剂的操作参考如下，其他转染试剂参考转染试剂的说明为主）。获得细胞系转染siRNA的最佳用量。如使用几个lipo2000的浓度，或20~100 nM范围内改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可能具有细胞毒性；

1) 确定转染浓度

- (1)请进行梯度实验以获得细胞系转染siRNA的最佳用量。如使用几个lipo2000的浓度，或20~100 nM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可能具有细胞毒性；
- (2)分析的间隔更长，以使因细胞过度生长造成的细胞活性损害减少。高密度转染的细胞可能更适合优化转染条件；
- (3) 荧光标记siRNA可用以优化转染条件。还可以作为转染效率的指示剂，及时修正实验问题。

2) 转染细胞说明

贴壁细胞：转染前24 h，接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞于400 μ L无抗培养基中，细胞融合度为60-80%进行转染。铺板时要将细胞消化完全混匀，以避免堆积生长。

悬浮细胞：转染前24 h，接 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞于400 μ L无抗培养基中，细胞数量到 $4-8 \times 10^5$ /孔进行转染。

3) 转染步骤

以转染试剂转染siRNA于24孔板，稀释浓度为20 μ M，终浓度为50 nM为例，其他规格容器转染请参考下表。

- (1) 用50 μ L Opti-MEM稀释siRNA，轻轻吹吸3-5次混匀；
- (2) 颠倒混匀转染试剂，用50 μ L Opti-MEM稀释1.0 μ L转染试剂，轻轻吹吸3-5次混匀，室温下静置5 min；
- (3) 混合siRNA和转染试剂，轻轻吹吸3-5次混匀，室温下静置20 min；
- (4) 在24孔细胞板中加入转染复合物，100 μ L/孔，均匀；

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)

(5) 细胞板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养18-48 h。转染4-6 h后可换新鲜培养基。如siRNA有荧光标记，此时可用荧光显微镜观察荧光。

	每孔总体积	培养基	Opti-MEM (稀释siRNA)	Opti-MEM (稀释转染试剂)	终浓度	siRNA产品	转染试剂/ 孔
96-well	100 μL	50 μL	25 μL	25 μL	100 nM	0.5μL	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	30nM	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	10nM	0.05μL	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	1.25μL	1 μL
	500 μL	400 μL	50 μL	50 μL	30nM	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	10nM	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	30nM	1.5μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	20 nM	1μL	2 μL
	1 mL	800 μL	100 μL	100 μL	10nM	0.5 μL	2 μL
6-well	2 mL	1500 μL	250μL	250μL	100 nM	10 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250μL	250μL	50 nM	5 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250μL	250μL	30nM	3 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250μL	250μL	20 nM	2 μL	5 μL
	2 mL	1500 μL	250μL	250μL	10 nM	1μL	5 μL

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。

5. 效果检测

转染后24-72 h进行表达量检测，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：采用qPCR检测方法，siRNA转染后24-72 h即可检测到mRNA表达明显降低；
- (2) 蛋白水平的检测：主要为WesternBlot方法检测，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；
- (3) 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。建议使用Chol、OMe、PS等修饰的siRNA进行实验，以延长时效。

6. 动物实验

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)



建议使用Chol、OMe、PS等修饰的siRNA进行实验，以延长时效。

A.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。

B.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。

7.实验要点

(1) 保证无RNA酶环境进行实验

环境和空气中含有大量的RNA酶，痕量的RNA酶即可对RNA造成严重的降解。必须使用DEPC水或RNase-free水对RNA产品进行稀释。实验过程中，需避免RNA产品与人体皮肤或未经去RNA酶的实验耗材接触。因呼吸产生的气体和飞沫中均含大量的RNA酶，所以必须佩戴口罩于超净工作台内进行实验操作。

(2) 转染条件优化

优化转染条件极其重要，不同的细胞和实验中，建议都进行最佳siRNA浓度和转染试剂浓度优化。若转染试剂的转染效率不佳，可以尝试更换其他转染试剂，不同的转染试剂操作可能会有很大差异，必须严格按照说明书进行实验。有条件的话可以更换效率更高的转染方法，如电转或病毒转染。

(3) 使用多条siRNA验证表型

建议使用两条或以上的siRNA来验证表型，用于排除非靶向效应导致的假阳性结果。现在越来越多期刊也倾向于要求使用多条siRNA验证表型。

(4) 使用无抗培养基

转染6-8 h内，要使用无抗培养基。因为抗生素对细胞有毒性，会影响siRNA的递送效果。

(5) 保证健康的细胞状态

使用传代50代内的细胞进行实验，传代太多的细胞转染效率会下降。转染前必须保证细胞处于健康的状态，状态不佳的细胞其转染效率通常也很低，且对干扰效率的检测也有很大的影响。

(6) 阴性对照、阳性对照和荧光对照

使用乱序siRNA作为阴性对照，可以排除非靶向效应对实验数据的干扰。使用阳性对照（我司赠送GAPDH siRNA）可对实验流程进行质检，帮助快速分析实验中可能存在的问题。使用荧光对照可分析siRNA的转染效率，方便进行最佳实验条件摸索。

8.常见问题及解决方法

1) 细胞转染效率低？

- (1) siRNA 纯度太低，注意溶解时，避免RNA酶污染。使用经DEPC处理过的耗材和试剂。
- (2) siRNA转染试剂复合物浓度低，需优化转染效率，使用合适的转染试剂剂量。
- (3) 血清影响转染效率，配制混合物时，不能含有血清。培养时可以有血清，但是不要有抗生素。

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)



(4) 脂质体转染试剂保存不当，试剂失效，应置于4℃保存。

2) 细胞转染后出现大量死亡现象？

- (1) 细胞状态欠佳，需调整细胞生长状态：一般处于良好生长状态的细胞对转染试剂有更好的耐受性。
- (2) siRNA或者转染试剂浓度过高。
- (3) 转染试剂毒性较大，更换转染试剂。
- (4) siRNA纯度低，杂质影响细胞状态。
- (5) 转染时间过长，转染后未及时更换新鲜培养基。

3) 转染后，没有观察到荧光？

- (1) 通常情况下，FAM转染后显示绿色荧光，CY3转染后显示红色荧光。观察时，首先确认荧光激发波长是否正确，绿光波长为495 nm，红光为550 nm。
- (2) 转染后，需要立即清洗观察荧光，避免时间太久。
- (3) 产品保存不当，siRNA降解，FAM淬灭。FAM容易见光分解，所以请避光保存。
- (4) 转染时，要避光操作，避免FAM长时间暴露于白光下。

4) 目的基因干扰效果只有60%左右，是否判定为套餐无效？

通常套餐产品保证干扰效果能达到70%左右，如果干扰效果达到60%左右，我们也认为干扰是有意义的。如果细胞的表型及功能方面有明显变化，文献也是认可的。一般可通过提高转染效率，优化实验体系等方法，提高干扰效率。

5) 为什么要强调mRNA水平检测？可以直接检测蛋白和功能吗？

siRNA直接作用于mRNA，因此mRNA水平检测是最直接的检测指标。很多客户认为，mRNA的降解直接的结果应该是对应蛋白质含量的下降，因此蛋白水平的检测结果也可以作为有效性的检测指标。事实上，很多情况下往往出现mRNA下降水平与蛋白下降水平不对应的现象。其可能原因有：

- (1) 与选择的检测时间有关。可能因mRNA的下降尚未反映在蛋白量的变化上或者未达到足以检测的水平，所以一般建议蛋白和功能检测时间要稍微推后。
- (2) 与蛋白在细胞中的表达情况有关。mRNA的翻译过程非常复杂，细胞内基因的表达总要维持一个平衡，某些蛋白表达量到一定的程度之后，足以维持其细胞功能，将可能暂时“关闭”表达的功能，转录出来的部分mRNA可能不参与蛋白翻译的过程，因此，mRNA水平的下调与蛋白水平下调并非完全成正相关的关系。
- (3) 可能还会涉及到更加复杂的机制。

6) siRNA在细胞内可以作用多长时间？什么时候才是最好的检测时间？

siRNA介导的RNAi属于瞬时现象，不能稳定传代，一般其作用时间不可能维持很长时间，通常建议在转染后3~4 d内完成检测。最佳检测时间，因细胞、目的基因而异，多在转染后24~48 h之间检测。一般建议24~48 h检测mRNA水平，48~72 h检测蛋白水平。

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)



7) 细胞的转染效率是否与siRNA序列相关?

转染效率的高低取决于细胞自身及转染方法，与siRNA的序列并没有直接关系。因此，siRNA在不同的细胞转染效率可能有差异。

8) 同样的siRNA，为什么在细胞A很有效，在细胞B则没有效果?

不同细胞的转染效率不同，基因表达水平也不一样，这些都与siRNA的作用效率有关，所以不能保证不同细胞的干扰效果一致。

9. 售后说明

如您在收到基恩科生物的siRNA产品后一个月之内未提出异议，我们将视本制品为优良产品，不再受理投诉事宜。如确认质量问题,基恩科生物将安排免费重新合成或赔偿不超过siRNA产品本身的价值。



- 扫码关注基恩科公众号获取更多资讯
- Website www.genecarer.com
- Service hotline 029-84613682

[基因修饰细胞（敲除、敲入、点突变）](#) [基础实验服务（动物实验、载体构建）](#)

[病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、病毒样颗粒蛋白、脂质体纳米颗粒）](#)

[试剂（常规试剂、感受态、基因敲除敲入点突变试剂盒、滴度检测试剂盒）](#)