

服务手册

siRNA 产品使用手册

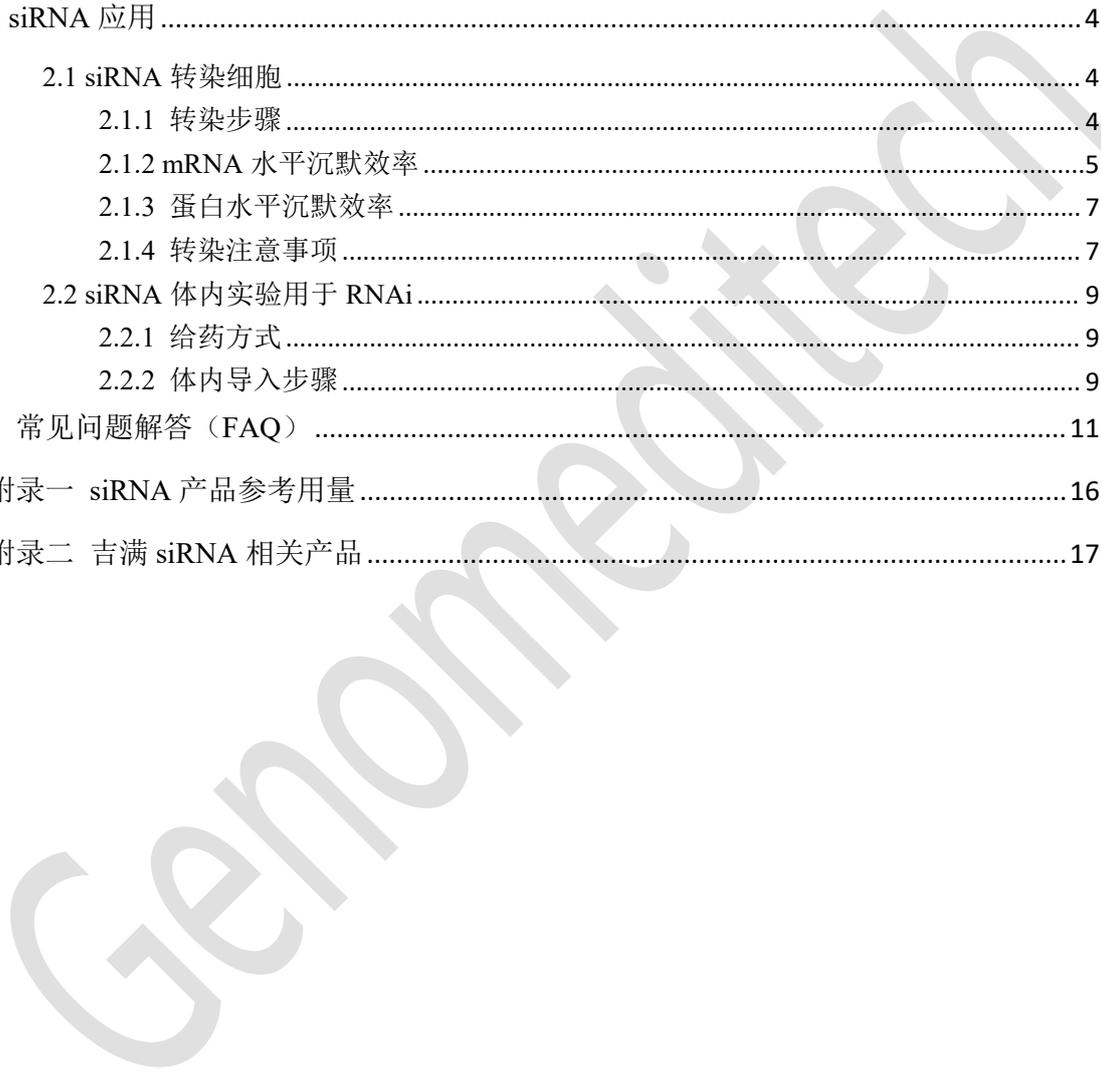
For research use only!

本公司产品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：v2.4

目 录

1 siRNA 简介	1
1.1 序列构成	1
1.2 siRNA 对照	2
1.3 运输保存及使用	3
2 siRNA 应用	4
2.1 siRNA 转染细胞	4
2.1.1 转染步骤	4
2.1.2 mRNA 水平沉默效率	5
2.1.3 蛋白水平沉默效率	7
2.1.4 转染注意事项	7
2.2 siRNA 体内实验用于 RNAi	9
2.2.1 给药方式	9
2.2.2 体内导入步骤	9
3 常见问题解答（FAQ）	11
附录一 siRNA 产品参考用量	16
附录二 吉满 siRNA 相关产品	17



1 siRNA 简介

小干扰 RNA（short interfering RNA, siRNA）是一类长度约 21~23nt 化学合成的双链的小分子 RNA，在基因沉默研究中被广泛应用。

基因沉默（或基因干扰）通过 RNA 干扰（RNA interfering, RNAi）、CRISPR/Cas9 敲除、转录抑制等技术实现。SiRNA 原理同 RNAi。RNAi 遵循设计与靶基因序列同源的双链 RNA（double-stranded RNA, dsRNA），胞质中核酸内切酶 Dicer 将 dsRNA 切割成多个具有特定长度和结构的小片段 RNA，即 siRNA。继而与细胞内的相关酶形成 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex, RISC）。RISC 通过与 mRNA 的同源区进行特异性结合并切割 mRNA，最终将其降解，从而实现转录后基因沉默机制。

RNAi 已经广泛应用于各种真核生物的基因功能研究，药靶发现及药物筛选。近年来，多种临床试验表明靶向致病基因的 RNAi 药物在治疗困扰人类多年疾病中具有巨大潜力。

siRNA 产品为冻干粉形式的即用型试剂。可设计特异性靶点，覆盖人、小鼠、大鼠全基因组的所有基因，其他物种亦可定制，适用于多种细胞 RNAi 实验。

此外，还可通过特殊化学修饰 siRNA，实现高效、特异、稳定的产品优势，适用于体内动物注射等实验，如 5'氨基、2'甲氧、5'磷酸化、5'胆固醇、5'生物素等。

1.1 序列构成

常规化学合成 siRNA 多为 19nt RNA + dTdT（3'悬垂）的 RNA 双链分子，无化学修饰（如图 1 所示）。

Sense: 正义链，RNA，序列与靶序列相同；

Antisense: 反义链，RNA，序列与靶序列互补；

dTdT: 两端悬垂，DNA，均在 3'端，有效提高 RNA 稳定性。

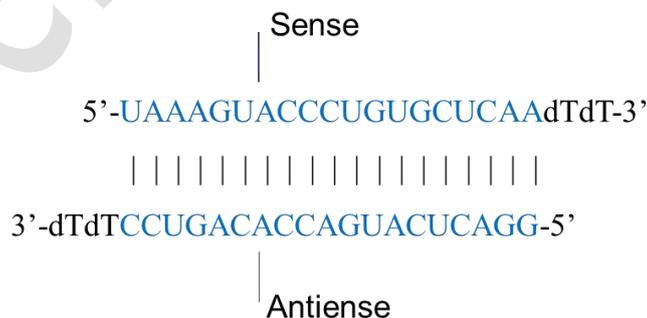


图 1. siRNA 结构示意图

1.2 siRNA 对照

siRNA 对照是 RNAi 完整实验的重要组成部分，主要包括：荧光转染对照、阳性对照、阴性对照、空白对照。对照产品有助于对 siRNA 转染条件的优化，验证基因沉默实验流程的准确性，同时可对 siRNA 诱导的基因沉默效果进行特异性分析，保证 RNAi 实验的顺利完成。

（1）普通阴性对照

阴性对照有 与目的基因序列无同源性的通用阴性对照 和 将选中的 siRNA 序列打乱 scrambled 阴性对照 两种。

阴性对照 siRNA 采用特殊设计，不靶向任何已知的人、小鼠、大鼠基因，无任何化学修饰，具有更低的脱靶效应。

- 1) siRNA 实验必须要包含阴性对照；
- 2) 通用阴性对照：与目的基因的序列无同源性的普通阴性对照；
- 3) Scrambled 阴性对照：和选中的 siRNA 序列有相同的组成，但是和 mRNA 没有明显的同源性；
- 4) 阴性对照需要确定和目的靶细胞中其它基因没有同源性。

（2）荧光标记转染对照

荧光标记的 siRNA 是检测细胞转染效率、优化转染体系最常用的一种方法。荧光标记的 siRNA 转染细胞后，可以直接使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等观察，也可以通过流式细胞仪检测，确定是否有效转染以及转染效率的高低。荧光标记的 siRNA 还可用作追踪 siRNA 在胞内的定位及分布的情况。

吉满生物使用与目的基因序列无同源性的荧光标记通用阴性对照（CY3：最大激发波长为 547nm，最大发射波长 563nm；FAM：最大激发波长为 495nm，最大发射波长 521nm）。

使用前须知：

- 1) 实验前需了解检测仪器的配置和参数，选择合适的荧光标记；
- 2) 熟悉转染操作说明，以快速准确的完成荧光标记 siRNA 的转染；
- 3) 在储存、使用及检测过程中严格遵守避光条件；
- 4) 检测前请先熟悉检测仪器的操作，若使用荧光显微镜或激光共聚焦检测，检测时不宜同一位置曝光时间过长，应对好焦后马上拍照，防止曝光时间过长而荧光淬灭。

（3）siRNA 阳性对照

以内源基因（如 GAPDH）或报告基因为靶标的 siRNA，用以确认 RNAi 实验中转染、RNA 提取和基因表达检测方法等系列操作无误。

阳性对照 siRNA 经特异性设计及实验验证，吉满生物针对人源基因常用 GAPDH 阳性对照，鼠源基因常用 MAPK1 做阳性对照。

（4）转染试剂对照

对于一个完善的对照系统，转染试剂对照是不可缺的。转染试剂对照可以检测转染试剂对细胞的毒性、细胞的成活率等细胞转染的各个因素影响。

1.3 运输保存及使用

产品以冻干粉的形式常温运输，收到产品后，请于-20℃~-80℃保存，冻干粉可以稳定保存2年。使用前瞬时离心，用 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O 配制成 20uM 储存液并分装保存，建议-20℃保存时尽量在1-2个月内用完，-80℃可保存半年，避免反复冻融（不超过5次）。

siRNA 使用注意：

1) siRNA 粉末呈轻干膜状附在管壁上，打开管子请务必先瞬时离心，溶解时请加足量 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O 后盖上管盖，震荡溶解。

2) 为避免外界因素（包括酶，极端 pH 或温度条件等）导致产品降解，所有操作请严格遵循 RNA 操作规范。实验过程中，产品尽量干冰上放置，使用完毕后于-20℃~-80℃保存。

3) siRNA 母液配置对应体积：

	20uM 储存液的配方			
siRNA (nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积 (ul)	125	250	500	2500

2 siRNA 应用

2.1 siRNA 转染细胞

哺乳动物细胞 siRNA 转染常见方法有：磷酸钙共沉淀、电穿孔法、DEAE 葡聚糖、机械法（例如显微注射和基因枪）、阳离子脂质体试剂，其中 阳离子脂质体试剂转染法 是目前最常用的转染方法，可实现高效率 siRNA 转染。

为了降低细胞密度，试剂使用量，转染效率等因素导致的空间差异，保证实验的可靠性和可重复性建议如下：

- 1) 转染实验中组内至少设置 3 个复孔；
- 2) 保证细胞接种量相同，且在空中呈平均分布；
- 3) siRNA 转染细胞实验所需试剂

试剂种类	试剂用途
siRNA	针对目的基因设计并合成
转染试剂	脂质体法有如 Lipofectamin 2000/3000、HG 转染试剂
siRNA 对照	包含阴性对照、阳性对照、荧光转染对照、转染试剂对照
基因表达检测方法	mRNA: RT-qPCR ; 蛋白表达: Western Blot

2.1.1 转染步骤

以 lipofectamine™2000 转染 siRNA 于 24 孔板为例，为实现较好的基因沉默效果，推荐最低 siRNA 使用终浓度为 50nM（不同细胞可以上下优化 2~4 倍浓度）；遵循如下操作方法可以高效地将 siRNA 转染贴壁和悬浮培养的多种真核细胞。对某些特殊的细胞系和培养条件，或特殊应用等需要进行特别优化。

2.1.1.1 接种细胞：

贴壁细胞：转染前一天，在 400ul 无抗生素培养基中接种 $0.5\sim 2\times 10^5$ 个细胞，细胞融合度约 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：转染前一天，在 400ul 无抗生素培养基中接种 $0.5\sim 2\times 10^5$ 个细胞，转染时细胞数量 $4\sim 8\times 10^5$ /孔。

2.1.1.2 转染复合物制备：

- 1) 用 50ul Opti-MEM 稀释 siRNA（转染细胞的终浓度为 50nM），轻轻吹 3~5 次混匀。
- 2) 轻轻混匀转染试剂，用 50ul Opti-MEM 稀释 1.0ul lipofectamine™2000，轻轻吹 3~5 次混匀，室温下静置 5min。
- 3) 混合转染试剂和 siRNA 稀释液，轻轻吹 3~5 次混匀，室温孵育 20min。

2.1.1.3 转染过程：

- 1) 转染复合物加入到 24 孔细胞板中，100ul/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。
- 2) 细胞板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养 18~48h。转染 4~6h 后可更换新鲜培养基。
转染完成后 24~72h 选取合适时间点检测 siRNA 沉默效果，最佳检测时间与细胞类型、转染试剂、检测目的等有关。

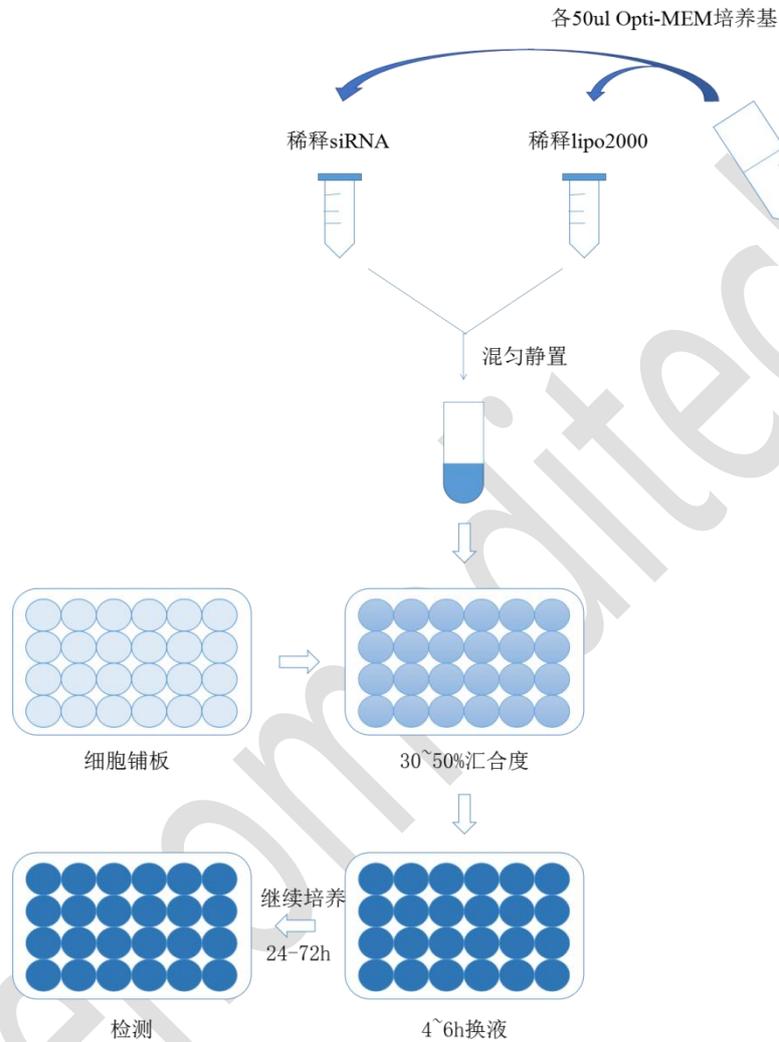


图 2. 转染过程示意图

2.1.2 mRNA 水平沉默效率

RNA 沉默效率验证（为 RNAi 沉默鉴定标准）：siRNA 直接作用的目标分子即目的基因 mRNA，在 RISC 系统作用下剪切靶 mRNA 进行降解，因而检测目的基因 mRNA 水平可直接反映 siRNA 的沉默效率，且通过 qRT-PCR 可计算得出具体抑制/干扰效率。一般 siRNA 转染后 24~72h 即可检测到目的基因 RNA 表达明显降低。

注：注意引物设计的特异性。

2.1.2.1 Real-TimePCR 检测

对于 RNAi 实验而言，我们通过导入 siRNA 前后细胞内某一特定基因的表达变化情况来判断 siRNA 是否具有基因沉默或敲低的作用，主要通过 Real-TimePCR 实验。

Real-TimePCR 实验设计时应包括实验组（导入 siRNA，多个靶点），阴性对照（Negative Control，即 siRNA NC）、Mock Transfection 组和荧光 siRNA 组共四组。每组至少三个重复。每组须同时检测目标基因和内参基因的 CT 值。（参考分组设计如图 2 所示）

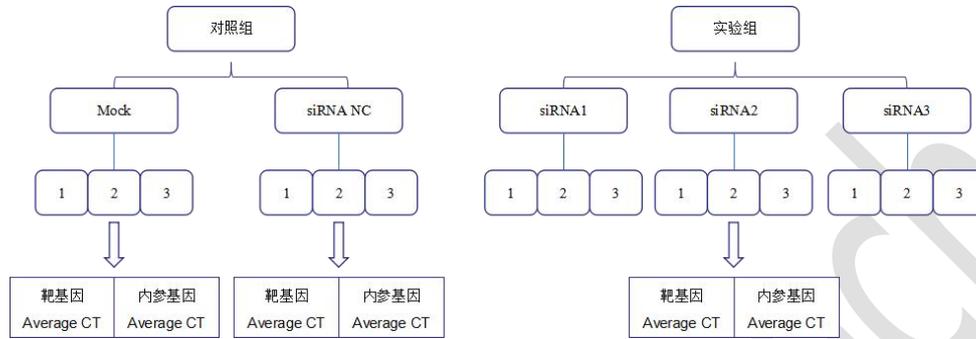


图 3. Real-TimePCR 实验设计

2.1.2.2 Real-TimePCR 检测结果参考

检测得到各组重复实验的 CT 值，一般 3 重复间 CT 值差异应小于 1，越小越好。

例：分组原始 CT 值如下表

	内参基因 (GAPDH)			靶基因		
Mock (CON)	15.62	15.75	15.76	26.17	26.22	26.00
阴性对照 (NC)	15.63	15.74	15.84	26.21	26.09	26.20
实验组 (siRNA1)	15.86	15.98	15.88	28.12	28.39	28.34
实验组 (siRNA2)	15.51	15.58	15.63	26.84	26.89	26.88
实验组 (siRNA3)	15.89	15.97	15.79	26.96	26.80	26.99

以 Mock 组为对照，通过实验组与对照组处理，计算 $\Delta \Delta CT = (CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$ ，最终相对表达量 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 计算结果如下表：

	Mock (CON)	阴性对照 (NC)	实验组 (siRNA1)	实验组 (siRNA2)	实验组 (siRNA3)
Average ΔC_t	10.42	10.43	12.38	11.30	11.03
ΔC_t SE	0.14	0.12	0.16	0.07	0.14
$\Delta \Delta C_t$	0.00	0.01	1.96	0.88	0.61
Fold Change	1	1	0.26	0.55	0.65
	(0.91~1.1)	(0.91~1.08)	(0.23~0.29)	(0.52~0.57)	(0.59~0.72)

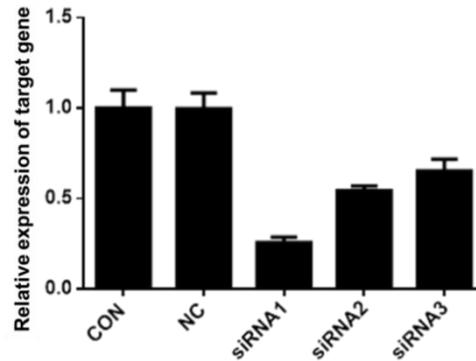


图 4. 靶基因相对表达量分析

2.1.3 蛋白水平沉默效率

蛋白水平表达检测：对于编码蛋白基因，需检测相应的蛋白表达水平变化。由于蛋白表达受多方面因素影响，如抗体、细胞代偿或操作等原因，有时会出现 mRNA 水平成功抑制而蛋白水平变化不明显的情况。若蛋白表达水平下降不明显，需重复检测其 mRNA 的表达水平，更好判断 RNAi 不理想的原因。

WB 验证结果包含 内参基因条带 和 目的基因条带，内参即为内部参照，用以校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，确保实验的准确性；通过样品与样品间的目的条带对比判断基因 RNAi 蛋白沉默效果。

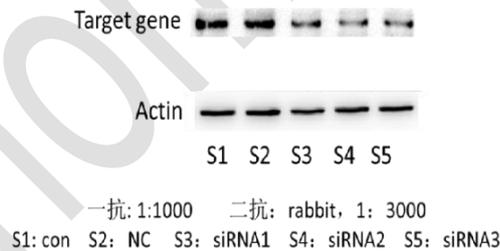


图 5. Western Blot 检测细胞中目的蛋白表达量

2.1.4 转染注意事项

1) siRNA 浓度：为获得最佳基因阻断效果，正式转染 siRNA 前需预实验确认最佳转染浓度。可设定不同 siRNA 浓度梯度，如 30nM, 50, 80nM, 100nM 甚至更高范围，判断最佳转染效率与阻断效果。提示高浓度 siRNA 可能具有细胞系依赖性。

2) siRNA 质量：高纯度 siRNA 亦是转染成功的关键。在转染前要保证 siRNA 的含量和纯度，实验过程中需要使用 DEPC 处理过的耗材和试剂，注意避免 RNase 污染引起降解。

3) 细胞状态: 转染时贴壁细胞的密度以 70%~80%为佳, 转染时使细胞处于生长旺盛的对数生长期。细胞密度过高和细胞传代数过高均会影响转染效果。一般情况下基因沉默分析在 24~72h 进行。低密度转染细胞可使细胞转染和分析间隔更长, 从而尽可能降低细胞过度生长造成的细胞活性损坏。

4) 转染前及转染过程中培养基不允许加抗生素, 否则将会降低细胞转染的效率甚至导致细胞死亡。

5) 血清影响: 在制备 siRNA 与转染试剂形成复合体过程中不能添加血清, 建议用 Opti-MEM 或其他无血清培养基 (如 DMEM、RPMI1640 等) 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, 血清的存在是否影响复合体的转染效果还要根据不同转染试剂说明查阅。

6) 荧光对照: 可以使用荧光标记的 siRNA 进行优化细胞转染条件。经确定的转染最佳条件, 可以在正式实验中添加荧光标记 siRNA 组, 作为转染效率的指示剂。

2.2 siRNA 体内实验用于 RNAi

动物体内生理环境颇为复杂，siRNA 使用必须要提高其在体内的稳定性、半衰期、靶向性、纯度、药活性以及降低毒性等才可以用于体内实验，尽管未修饰的 siRNA 也可以进行动物实验，但采用增强稳定性和透膜效率的化学修饰 siRNA 可达到更好的效果。常用 siRNA 化学修饰方式如下表所示。

修饰方式	主要功能
2' 甲氧修饰	增强抗核酸酶活性的能力，提高 siRNA 稳定性
5' 氨基修饰	增强抗核酸酶活性的能力，提高 siRNA 稳定性
5' 磷酸化修饰	增强抗核酸酶活性的能力，提高 siRNA 稳定性
5' 胆固醇修饰	促进细胞对 siRNA 的吸收，延长 siRNA 在血清中的半衰期
5' 生物素修饰	用于 RNAi 机理和生物学等研究
5' -FAM 修饰	优化各种细胞的转染条件，跟踪细胞或动物体内 siRNA 的吸收及分配
5' -CY3 修饰	优化各种细胞的转染条件，跟踪细胞或动物体内 siRNA 的吸收及分配

2.2.1 给药方式

首先，根据动物模型和实验方案，确定给药量和给药次数，计算出实验所需的总用量。要根据不同的器官选择给药方法，给药量因不同给药方法和实验目的有所差异。常用有系统给药和局部给药两种方式。

1) 系统给药（如静脉给药、腹腔给药等）

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，包括心、肝、脾、肺、肾、肌肉等。

2) 局部给药（如皮下注射，玻璃体给药，鞘内给药，瘤内注射等）

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。

注：如果需要维持长期效果，可以采用多次注射的方法。注射频度一般为一周一次，也可以根据实验要求缩短或适当延长。

2.2.2 体内导入步骤

siRNA 用于体内导入推荐系统给药每次注射 5~20nmol/20g 体重，局部给药则需每次注射 1~5nmol/20g 体重，给药频率往往是一周 2~3 次，可以根据实验研究目的灵活调整给药方案。一般给药剂量越高，效果越好，以不造成动物炎症和死亡为标准。

以 20g 裸鼠尾静脉注射 5nmol siRNA 为例，具体步骤参考如下：

1) siRNA 稀释: 取两管 (2.5nmol/管) siRNA 分别进行离心, 轻轻打开管盖, 各加入 125 μ l 无菌生理盐水, 震荡溶解;

2) 注射: 裸鼠尾部碘酒或酒精消毒, 远端 1/3 处静脉注射。如感觉到阻力和轻微隆起, 应停止注射, 重新寻找静脉进行操作, 不要强力推注, 否则容易将药液注射在尾部, 导致尾部溃烂。注射完成后移去针头, 按压针孔 10 秒以上, 防止药液流出;

3) 检测: 根据注射方法和靶器官的差异, 注射约 48~72 小时后, 转染效率可达到高峰期, 取样检测相关基因、蛋白的表达, 或进行其他检测。

不同种类实验动物一次给药能耐受的最大剂量参考表 (ml)

动物名称	灌胃	皮下注射	肌肉注射	腹腔注射	静脉注射
小鼠	0.9	1.5	0.2	1	0.8
大鼠	5.0	5.0	0.5	2	4.0
猴	300	50	3.0	10	20
犬	500	100	4.0	-	100

3 常见问题解答 (FAQ)

1) 吉满公司提供的 siRNA 是双链的还是单链的？

吉满公司提供的 siRNA 是双链的，也是按照双链来定价的。

2) 我们需要提供什么信息用于 siRNA 的合成？

如需定制合成，需要准确地提供 siRNA 的核苷酸靶序列，或者提供相应地基因的 Gene ID 等信息，由我们公司技术人员设计合成三靶点套餐。

3) siRNA 合成的序列都是带有 dTdT 吗？

悬垂的序列组成是由客户自行选择的。最近研究表明悬垂的组成在 mRNA 靶识别和酶解中不是很重要。悬垂可能在形成 RISC 的过程中起结构的作用。很多研究人员选择 dTdT 是因为研究表明脱氧核糖核苷酸能保护 siRNA 免受酶解。合成序列最重要的是确定靶 mRNA 的 siRNA 核心结构。

4) 针对人源基因设计的 siRNA，对其他物种是否也有效？

一般 siRNA 都具有物种特异性，很少与其他物种有相同的靶位点，所以针对人源基因设计的 siRNA 不会沉默其他物种的同源序列。然而，也有研究表明 siRNA 经过特异性设计后能对两个或两个以上的物种有效，这需要仔细进行 siRNA 设计和生物信息学分析。

5) 你们提供的 siRNA 是怎样运输的？在常温下放置了一个星期，还有效吗？

siRNA 是冻干粉包装的，可于常温下运输。这些冻干的样品在室温下能稳定保存 2~4 个星期，所以放置一个星期不会影响其沉默效果。但我们建议您收到样品后保存于 -20℃ 或 -80℃，如溶解使用，在离心后加入 DEPC 水，可进行分装保存，建议 -20℃ 保存时尽量在 1-2 个月内用完，-80℃ 可保存半年，避免反复冻融。

6) 用 100nM 的 siRNA 转染时只得到 50% 沉默效率，可以将 siRNA 的浓度增加到 200nM 甚至 400nM 吗？

增加 siRNA 的浓度一般不能改进沉默效率。高浓度的 siRNA 将可能导致去靶作用和对细胞的毒性。siRNA 的高基因沉默效率来自于合理的设计，在 100nM 甚至更低的浓度都可能有 75% 的沉默效率。另外，低的转染效率会导致低的沉默效率，建议更进一步优化 siRNA 的转染条件。

7) 实验对照该如何设置？

正式实验为实验组和阴性对照组（1-2），实验组的抑制效果均需与 NC 组比较。在预实验中设置对照组（3-4），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。

如果对实验细胞转染效率不了解，则需要在预实验中设置对照组（5）进行转染效率检测，以确定适合的转染试剂及转染条件。

常用对照组列表：

（1）实验组：使用目的基因 siRNA 进行转染。

(2) 阴性对照组 (NC 组): 使用阴性对照 siRNA 进行转染, 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。

(3) 正常细胞对照组 (Blank 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。

(4) 转染试剂对照组 (Mock 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。

(5) 荧光标记转染对照组: 使用荧光对照 siRNA 或转染指示剂进行转染, 用于检测当前转染条件下细胞的转染效率。

(6) 阳性对照组: 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。

8) 一定需要阴性对照吗?

阴性对照是 RNA 干扰实验中不可缺少的。由于在超过 200nM 的浓度下, siRNA 有可能会非特异性的压力反应, 在实验体系中必需设置阴性对照。它能够帮助我们确认基因表达水平的降低是否是序列特异性的 RNAi 的结果。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。如果没有阴性对照, 研究人员很可能错误地将广泛的、非特异性基因沉默当作由 RNAi 引起的基因特异性沉默。

9) 常用的阴性对照有哪些类型?

常用的阴性对照大体分为两种, 一种是使用通用阴性对照序列, 该序列已经很多文章使用; 另一类是使用和靶基因 siRNA 打乱序列的 siRNA 作为阴性对照, 这样的阴性对照和通用序列相比较, 一方面合成是按照定制产品价格合成的, 另一方面, 由于打乱序列是没有经过验证的序列, 有可能会产生脱靶现象。

10) 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?

这个结果充分说明了设置阴性对照的必要性。该结果表明所观察到的表型不是序列特异性敲低产生的表型, 需要降低 siRNA 的工作浓度排除原因。

11) 为什么说阳性对照在 RNAi 实验中很重要?

阳性对照作为一个实验系统检查是很重要的。也就是说, 当看到 siRNA 阳性对照的预期实验结果时, 能确保在实验方法中转染、RNA 提取和检测方法是可靠的。通常最好的阳性对照是内在的对照。

12) 用于对照的 siRNA 的最佳浓度是多少?

阳性对照和阴性对照的 siRNA 的浓度都应该与基因特异性的 siRNA 的浓度相同。

13) 如何检测荧光标记的 siRNA?

已经为数不少的实验室研究过荧光标记的 siRNA 的荧光检测结果和敲低效率效率之间的正相关关系。荧光标记双链是最常用的优化转染条件的方法。可以用流式细胞仪或者激光共聚焦显微镜检测标记的 siRNA。

转染效率的高低主要与细胞自身及所选择的转染试剂和转染方法相关，同等实验条件下，siRNA 的转染效率应该是相近的，如果荧光对照能成功进入细胞，可以间接代表目的 siRNA 也成功进入细胞。在具体的实验中，荧光对照不一定要每次实验都做。但如果每次实验都做一个荧光对照组，将会更加便于排除一些实验问题。

14) 在 siRNA 上进行标记的最佳位点在哪里？

反义链的 5'端标记会影响 siRNA 的沉默活性，不推荐标记这个位点。其他三个末端进行标记对沉默活性几乎没有影响。有研究表明正义链的 5'端标记是最有效的化学合成位点。

如使用荧光标记确定转染效率，一般细胞水平检测转染效率偏向推荐 FAM/Cy3 标记，动物活体成像偏向推荐 Cy5/Cy7 标记；如果实验目的仅为检测转染效率，建议标记在非作用链 5' 端；如果实验目的为示踪，则建议标记在作用链 3' 端。

15) 是否推荐目的 siRNA 标记荧光，同时检测转染效率和作用效果？

为尽量避免对目的 siRNA 作用效率的影响，通常选择用转染对照来检测转染效率，用无荧光标记的目的 siRNA 来检测作用效果。当然也可以尝试对目的基因 siRNA 标记荧光，同时检测转染效率和作用效果，但可能会有标记后 siRNA 失效的风险。

16) 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：

- (1) 调整转染试剂的浓度；
- (2) 在转染后适当的时间内更换无转染试剂的培养液；
- (3) 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就有更好的耐受性；
- (4) 调整转染试剂和 siRNA 的比例：如果同一管转染试剂在不同实验中对细胞的毒性有差异，一般说来应该是实验过程本身带来的差异；

如果已经做了以上几项工作，转染效率仍然得不到提高，可更换一种转染试剂。

17) 反义核酸和 RNAi 有何差异？

反义核酸和 RNAi 从作用原理到使用的范围都有很大差异。从原理上说，反义核酸是一段与靶基因配对的单链 DNA 或类似 DNA 的片段与靶基因结合，结果阻止靶基因的转录或是翻译，以往的研究表明在反义核酸的研究中，序列的有效性和有效序列的非特异性往往有比较高的正相关性，这就在一定程度上限制了反义核酸的应用。RNAi 的作用机理是双链的 RNA 进入细胞内，导致靶基因的切割和降解。siRNA 的序列可以选择在高度特异针对靶基因的位置，也就为 RNAi 作为药物研究提供了高效、低副作用的空间。

18) 开始体内实验前需要注意什么问题？

体内实验设计包含动物模型的选择、给药途径、剂量和给药次数等等。siRNA 使用的数量及浓度主要取决于给药靶点的性质，诸如肿瘤的类型，组织的类型，靶基因表达水平，动物模型个体大小等等，针对不同的研究模型，最好先查阅相关资料。

19) 小鼠体内实验需要多少 siRNA?

迄今为止还没有明确的 siRNA 体内实验使用量的计算方式，在实验前最好先从文献中查询是否已经有相关的文章发表。最好针对实验绘制剂量反应曲线。常规情况下，给药剂量可以以~5mg/kg/day[~7.7nmol/day or 100mM per day]作为优化起点。需要注意的是，这个剂量只是一个预实验的起点，最后的给药剂量取决于动物模型、靶基因、靶组织和给药方式等因素。

20) 基因沉默效果不理想，应该如何处理？

(1) 确定转染效率

成功的转染是 RNAi 实验的前提。如果初次使用 siRNA 或采用新的细胞系，建议预实验或转染同时设置荧光 siRNA 转染分组进行转染效率检测，并选择优化转染条件。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）。

(2) 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。

(3) 检测分析方法有误

检测目的基因 mRNA 水平可直接反应 siRNA 是否发挥了相应作用，且通过 qRT-PCR 可计算具体的抑制效率。对于蛋白表达水平的变化受多个因素影响，有时候会出现 mRNA 水平成功抑制了而蛋白水平变化不明显的情况。若蛋白表达水平下降不明显，需认真检测其 mRNA 的表达水平。同时还可能存在引物使用有误，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进行分析调整。

(4) 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。

(5) 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。

21) siRNA 转染常见问题

原因	建议
----	----

转染效率低	siRNA/转染试剂复合物浓度低	可适当提高 siRNA/转染试剂复合物的浓度
	细胞生长状态不好	非最佳状态的细胞会降低转染效率, 建议调整细胞接种量保证转染时最佳细胞汇合度
	原因	建议
实验重复性差	细胞汇合情况不一致	使用相同数量的接种细胞, 接种后的培养时间、培养条件一致
	细胞传代次数太多	使用传代次数较低的细胞
	原因	建议
细胞出现明显死亡	与细胞生存相关的关键基因被沉默	重新设计实验
	细胞状态欠佳	使用传代次数较低的细胞: 细胞接种后在 24h 内达到 30-50%, 并在 24h 内完成转染
	复合物浓度过高	浓度过高也会产生毒性, 调整最佳浓度
	原因	建议
基因表达或沉默效果差	siRNA 靶点设计局限	重新设计
	转染后的培养时间过短	基因需要一定时间表达, 适当延长培养时间

附录一 siRNA 产品参考用量

使用 lipofectamine™2000 转染 siRNA 产品参考用量

细胞培养容器	表面积(cm ²)	终浓度	lipo2000/孔	siRNA 产品	培养基总体积（每孔）
96-well	0.3	100nM	0.25μl	0.5μl	100μl
		50nM	0.25μl	0.25μl	100μl
		30nM	0.25μl	0.15μl	100μl
		20nM	0.25μl	0.1μl	100μl
		10nM	0.25μl	0.05μl	100μl
24-well	2	100nM	1μl	2.5μl	500μl
		50nM	1μl	1.25μl	500μl
		30nM	1μl	0.75μl	500μl
		20nM	1μl	0.5μl	500μl
		10nM	1μl	0.25μl	500μl
12-well	4	100nM	2μl	5μl	1ml
		50nM	2μl	2.5μl	1ml
		30nM	2μl	1.5μl	1ml
		20nM	2μl	1μl	1ml
		10nM	2μl	0.5μl	1ml
6-well	10	100nM	5μl	10μl	2ml
		50nM	5μl	5μl	2ml
		30nM	5μl	3μl	2ml
		20nM	5μl	2μl	2ml
		10nM	5μl	1μl	2ml

注：在验证靶点时，除设置常规空细胞/NC/siRNA1/ siRNA2/ siRNA3 等分组，还可增加 siRNA1/2/3 mix 组。

附录二 吉满 siRNA 相关产品

吉满生物 RNAi 相关产品		
siRNA 合成	普通 siRNA	产品质量高度稳定，冻干粉形式提供
	化学修饰 siRNA	5'氨基、2'甲氧、5'磷酸化、5'胆固醇、5'生物素
	荧光标记 siRNA	5'-CY3（红光）、5'-FAM（绿光）
	siRNA 阴性对照	阴性对照靶点与哺乳动物基因无同源性
	siRNA 阳性对照	人源 GAPDH、鼠源 MAPK1
siRNA 转染试剂	核酸转染试剂	HG-TransGene™transfection reagent
	293 细胞核酸转染试剂	HG-Trans293™transfection reagent
shRNA 构建	shRNA 质粒	不同抗性筛选标记及荧光选择
	shRNA 慢病毒	细胞高效感染工具
	shRNA 腺相关病毒	动物实验首选
siRNA 套餐		
内容	单基因 siRNA 套餐针对每个靶基因（仅人、小鼠、大鼠编码基因）设计 3 条 siRNA（各 5nmol），套餐产品还附赠阳性对照和阴性对照各 2.5nmol、转染荧光对照 1nmol。	
套餐优势	通常标准使用条件下即细胞转染效率 90%以上，至少 1 条 siRNA 的 mRNA 水平沉默效率可达 70%。	