



siRNA 使用说明

产品简介:

常规化学合成 siRNA 为 21-25nt 的双链小分子 RNA。即用型的 siRNA，已经经过纯化、退火等处理，只要用灭菌的 ddH₂O 或 RNase-free water 溶解并配制成 20μM 液体即可直接转染细胞。

产品剂型为冻干粉，产品剂量经过严格测算，以摩尔数标明。

保存和使用:

保存：产品以冻干粉的形式，常温运输，常温下一两周内稳定。收到产品后，请于-20℃至-80℃保存。

液体剂型：siRNA 的贮存浓度一般为 20μM，应避免反复冻融(尽量不要超过 5 次)，建议溶解后的产品分装保存，-20℃~-80℃保存半年以上。如果近期不做实验，产品需长期放置，最好以冻干粉形式保存。

冻干粉剂型：-20℃~-80℃保存一年以上。开盖前，请先稍稍离心，将粉末收集于管底，再用灭菌的 ddH₂O 或者 RNase-free water，配制成 20μM 的液体剂型。

表 1: 20μM 储存液的配置

产品含量(nmol)	0.5	1	2	5	10	20
溶解体积(μL)	25	50	100	250	500	1000

使用：产品使用时，siRNA 最好冰上放置，使用完毕后，请于-20℃或-70℃小心保存;整个实验过程，要求无 RNA 酶环境，与产品接触的枪头、EP 管等都应该经过无酶处理；特别提示：荧光标记 siRNA 要求避光。

使用方法:

1. siRNA 的转染浓度：推荐的转染浓度是 50nM，可具体情况优化转染浓度，最佳转染浓度一般设置浓度梯度和时间曲线进行测试，建议优化的转染梯度为 100nM, 50nM, 20nM, 10nM, 5nM, 1nM。

2. 使用 lipofectamine 2000(Invitrogen)转染 siRNA 的步骤(仅供参考):

转染方法请参考转染试剂的使用说明，以下是使用 lipofectamine 2000(以下称 lipo2000)转染的参考方法。

(1) 转染前一天，接种适当数量的细胞至细胞培养板中，使转染时的细胞密度能够达到 30~50%(不同细胞生长速度不一样，因此，接种细胞的数量需要根据细胞培养的经验)，请使用无抗生素的培养基。

注意：转染时，细胞密度是影响转染效率的关键因素之一，细胞生长过度会削弱细胞活力，从而降低细胞的转染效率。而细胞密度过低则可能达不到生长的要求，也会因此影响转染效率。

(2) 对于每个转染样品，按如下步骤准备 siRNA-lipo2000 混合液(试剂的用量和体积，请参照“转染 siRNA 用量参考”)：

a. 稀释转染试剂 lipo2000：使用前，将 lipo2000 转染试剂轻轻摇匀，然后取适量，用不含血清的优化培养基(Opti-MEM I Reduced Serum Medium)稀释，轻轻混和，室温孵育 5min；

b. 稀释 siRNA：用 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释 siRNA，轻轻混和；

c. 稀释好的 lipo2000 经过 5min 的孵育后，与上述(b)稀释好的 siRNA 轻轻混和，室温培养 20min 以形成 siRNA-lipo2000 混和物，溶液可能会有浑浊，不过不会影响转染。

注意：稀释好的 lipo2000，如果长时间放置可能导致转染试剂活性的降低，应尽量在 30min 之内与稀释好的 siRNA 混和。

(3) 将 siRNA-lipo2000 混合液加入含有细胞以及培养液的细胞培养板中，轻轻摇晃，使之混和；

(4) 将培养板置于 37℃的 CO₂ 培养箱中培养至检测时间(24~96h)。沉默效率的检测一般建议的时间为 24~72h。

可选操作(并非必要的操作)：转染操作完成，经过 37℃培养 4~6h 后，可以将孔里含有 siRNA-lipo2000 混合液的培养基移去，更换新鲜的生长培养基，这样也不会影响转染的效率。注意：如果转染时使用的不含血清的培养基(即血清饥饿的条件下进行转染)，4~6h 后必须换成完全培养基(含血清、含抗生素)，以确保细胞生长。

3. mRNA 水平的检测：siRNA 的作用机理在于其引起靶 mRNA 的降解，因此 mRNA 的降解水平是 siRNA 沉默效率的最直接指标。一般在 siRNA 转染后 24~72h 即可以检测到靶 mRNA 水平的降低。检测方法一般采用 Real-time PCR 定量检测。

4. 蛋白水平的检测：蛋白水平的检测一般需要借助抗体(针对靶基因蛋白质的抗体或针对融合蛋白的抗体)或报告基因系统检测，检测手段一般有 Western-blot、免疫组化等。一般说来，检测时间受细胞内蛋白质表达量、蛋白质本身的半衰期等因素的影响，一般为 48~96h，甚至更长时间之后多点采样。

实验指导

表 1 使用 lipofectamine2000(invitrogen)转染 siRNA 用量参考(siRNA 转染浓度为 10-100nM)

V1: 细胞培养液体积; V2: siRNA-lipo2000 混合液总体积

	每孔中总体积(v1+v2)	siRNA 的 终浓度	siRNA 的量/孔	如需共转染, 质粒 DNA 的量(ng)	加入转染试剂的量/孔 (lipofectamine2000)
96-well	100μL(50μL+50μL)	100nM	0.5μL	10-100	0.25μL(0.2-0.5μL)
	100μL(50μL+50μL)	50nM	0.25μL	10-100	0.25μL(0.2-0.5μL)
	100μL(50μL+50μL)	30nM	0.15μL	10-100	0.25μL(0.2-0.5μL)
	100μL(50μL+50μL)	20nM	0.1μL	10-100	0.25μL(0.2-0.5μL)
	100μL(50μL+50μL)	10nM	0.05μL	10-100	0.25μL(0.2-0.5μL)
24-well	500μL(400μL+100μL)	100nM	2.5μL	100-200	1μL(0.5-1.5μL)
	500μL(400μL+100μL)	50nM	1.25μL	100-200	1μL(0.5-1.5μL)
	500μL(400μL+100μL)	30nM	0.75μL	100-200	1μL(0.5-1.5μL)
	500μL(400μL+100μL)	20nM	0.5μL	100-200	1μL(0.5-1.5μL)
	500μL(400μL+100μL)	10nM	0.25μL	100-200	1μL(0.5-1.5μL)
12-well	1mL(800μL+200μL)	100nM	5μL	200-400	2μL(1.5-2.5μL)
	1mL(800μL+200μL)	50nM	2.5μL	200-400	2μL(1.5-2.5μL)
	1mL(800μL+200μL)	30nM	1.5μL	200-400	2μL(1.5-2.5μL)
	1mL(800μL+200μL)	20nM	1μL	200-400	2μL(1.5-2.5μL)
	1mL(800μL+200μL)	10nM	0.5μL	200-400	2μL(1.5-2.5μL)
6-well	2mL(1500μL+500μL)	100nM	10μL	500-1000	5μL(2.5-6μL)
	2mL(1500μL+500μL)	50nM	5μL	500-1000	5μL(2.5-6μL)
	2mL(1500μL+500μL)	30nM	3μL	500-1000	5μL(2.5-6μL)
	2mL(1500μL+500μL)	20nM	2μL	500-1000	5μL(2.5-6μL)
	2mL(1500μL+500μL)	10nM	1μL	500-1000	5μL(2.5-6μL)

转染小贴士(以 24 孔板为例):

- 24 孔板每个孔的细胞培养总体积是 500μL。由于 siRNA-lipo2000 混合液的体积是 100μL, 转染前可以先将原细胞培养基(500μL)吸弃, 更换为 400μL 无抗生素(可含血清)的新鲜培养基, 使得培养基体积与 siRNA-lipo2000 混合液体积之和刚好达到 500μL。转染时, 各用 50μL Opti MEM I 来分别稀释 lipo2000 和 siRNA, 对于 24 孔板, lipo2000 用量是 1μL/孔; siRNA 用量则根据所选用转染浓度而异(详见“转染 siRNA 用量参考”)。
- 稀释 lipo2000 和 siRNA 操作要点:
lipo2000 稀释后需要室温放置 5min, 才能与稀释好的 siRNA 混合, 因此, 可以先稀释 lipo2000, 在静置期间再稀释 siRNA。两者稀释完毕, 轻轻混匀, 注意在混合试剂时, 请勿剧烈吹打或振荡, 过度用力可能会破坏脂质体的结构, 以及 siRNA-lipo2000 混合物的形成。上述混合液至少需要放置 20min(室温), 才能加到细胞培养板中, 但是最长时间不能超过 4-6h。lipo2000 用毕, 请置于 4℃冰箱, 小心保存。
- 在某些情况下(如转染效率不佳), 可以尝试在血清饥饿的状态下转染, 也就是转染前将原培养基换成 400μL Opti-MEM I 稀释液(无血清无抗生素的培养基), 使得整个转染过程中, 细胞都是处于无血清状态, 注意这种情况下, 转染完 4~6h, 必须进行换液操作。
- 转染完成后在 37℃的 CO₂ 培养箱培养 24~72h, 直到可以检测为止。
- 请选择合适的孔板(或者细胞培养板), 以确保后续实验过程中有足够 RNA 或蛋白量用于沉默效果的检测。

转染前后换液操作：

1) 转染前换液：

- 如果细胞容易污染，在转染前一天铺板时，不能使用无抗生素的培养基，则在转染前务必要吸弃原培养基，更换成无抗生素的新鲜培养基(可以含有血清)。
- 换液量：如果是 24 孔板，无抗生素的新鲜培养基量是 400 μ L/孔，即吸弃培养板孔内原培养基 500 μ L，加入 400 μ L 无抗生素的新鲜培养基。为了保证细胞培养体积维持 500 μ L，无抗生素的新鲜培养基的量只需加入 400 μ L/孔，因为转染时还要再加 100 μ L siRNA-lipo2000 混合液(V1=400 μ L, V2=100 μ L, V1、V2 见“转染 siRNA 用量参考”)。

2) 转染后换液(可选操作)：

转染操作完成，经过 37 $^{\circ}$ C 培养 4~6h 后，可以将孔里含有混合液的培养基移去，更换新鲜的生长培养基，这样也不会影响转染的效率。

注意：如果转染时使用的是不含血清的培养基(即血清饥饿的条件下进行转染)，4~6h 后必须换成完全培养基(含血清、含抗生素)，以确保细胞生长。

注意事项及建议：

实验要求无 RNA 酶环境，枪头、EP 管都要经 DEPC 处理；

整个实验过程，siRNA 应于冰上放置，使用完毕，请于-20 $^{\circ}$ C或-70 $^{\circ}$ C保存。

为了避免细胞密度、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重复性，一般建议：

- 每次转染实验时，每个转染样品至少设置3个复孔；
- 接种细胞时，保证每孔接种的细胞数量尽量相同，尽量使细胞在各孔的表面平均分布；对于siRNA的转染，各孔细胞的密度均达到30~50%；对于siRNA与质粒DNA共转染，各孔细胞的密度均达到80~90%；
- 使用“转染siRNA用量参考”的推荐用量和体积，请小心取量，必要时进行相应的优化转染实验。

荧光标记 siRNA 使用说明

产品简介：

荧光标记的 siRNA 是检测转染效率、优化转染方法最常用的一种方法。荧光标记的 siRNA 转染细胞后，可以直接使用用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察，也可以通过流式细胞仪检测，确定是否有效转染及转染效率的高低。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。

表 2 锐博生物荧光标记 siRNA 种类

Dye	Max Excitation	Max Emission	Compatible Filter	Compatible Fluorescence
FAM	492	518	488 $\pm$ 15	
Cy3	555	570	555 $\pm$ 15, 488 $\pm$ 15	
Cy5	649	680	647 $\pm$ 15	GFP、CFP、FITC

由于 Cy5 的最大发射波长为 680nm，很难用肉眼观察，而且不能使用高压汞灯作为理想的激发光源，因此，使用普通荧光显微镜时，不推荐使用 Cy5。通常观察 Cy5 时需使用激光扫描共聚焦显微镜或流式细胞仪。

使用方法：

1、保存：

-20 $^{\circ}$ C~ -70 $^{\circ}$ C，避光保存，冻干粉或液体。

液体(贮存浓度为 20 μ M)避免反复冻融(为保证 siRNA 的完整性，冻融次数最多不超过 5 次)。

2、转染(以 Cy3 标记的 siRNA 为例，仅供参考)：

2.1 使用 lipofectamin2000(Invitrogen)转染的步骤(以贴壁细胞为例)

Cy3-siRNA 的转染过程大体和普通 siRNA 是一样的，注意整个实验过程要**尽量避光**。

(1) 转染前一天，接种适当数量的细胞至细胞培养板中，使转染时的细胞密度能够达到 **30~50%**(不同细胞生长速度不一样，因此，接种细胞的数量需要根据细胞培养的经验)，请使用无抗生素的培养基。

(2) 配制好 Cy3-siRNA 贮存液(20 μ M)后, 按如下步骤准备 Cy3-siRNA-lipo2000 混合液(以 24 孔板的操作为例, 其他孔板各种的试剂用量, 请参照“siRNA 使用说明”或“Lipofectamine2000 manual”):

- 取 1 μ l/孔 Lipo2000(使用前轻轻摇匀), 用 50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释。轻轻混和后在室温孵育 5 min;
- 取适量 Cy3-siRNA 贮存液(根据不同转染浓度取量, 50nM 为 1.25 μ l/孔), 用 50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释, 轻轻混和均匀;
- 稀释好的 Lipo2000(a)经过 5min 的孵育后, 与稀释好的 Cy3-siRNA(b)轻轻混和, 室温静置 20min, 以形成 Cy3-siRNA 与 Lipo2000 混合物, 如果溶液出现浑浊, 属于正常现象, 不会影响转染效果。

注意: 稀释好的 Lipo2000(a)尽量在 30min 之内, 与稀释好的 Cy3-siRNA(b)混和, 如果放置时间过长, 可能导致转染试剂活性的降低;

(3) 将 Cy3-siRNA-Lipo2000 混合液(c)加入含有细胞及培养液的孔中, 轻轻摇晃孔板, 使混和;

(4) 在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养至检测时间(参考的观察时间可以是转染后 12~24h);

可选操作: 转染操作完成, 经过 37 $^{\circ}$ C 培养 4~6h 后, 可以将孔里含有 Cy3-siRNA-Lipo2000 混合液的培养基移去, 更换新鲜的生长培养基, 这样也不会影响转染的效率。另外, 更换培养基也可以将残留在培养液中的 Cy3-siRNA 移去。

(5) 转染效率检测: 荧光显微镜、流式细胞仪、激光共聚焦显微镜等(见后面)。

2.2 转染操作注意事项:

(1)避免 Cy3-siRNA 在紫外光、可见光下暴露, 建议转染时室内和超净台内不要开灯(FAM 的避光要求尤其严格);

(2)保持 Cy3-siRNA 管外有锡纸包裹;

(3)转染操作请尽量快, 操作时间尽量短, 操作完毕后, 请尽快将培养板放到培养箱。

(4)一般来说, 使用 Lipo2000 作为转染试剂, 转染后 4~6h 就可以保证 siRNA 转染过程完成。只要转染过程完成, 就可以进行转染效率的检测。参考的观察时间可以是转染后 12~24h。

3、观察与检测

3.1 检测方法: 荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪

3.2 荧光显微镜观察注意事项:

(1)Cy3 是一种红色荧光染料, 最佳激发波长 555nm, 但在 488nm 处也能检测。

(2)使用 Lipo2000 转染, 参考的观察时间可以是转染后 12~24h, 我们建议尽量在转染后 24 小时内完成检测。由于 Cy3-siRNA 相对比较稳定, 对于检测的时间要求相对不是特别严格, 成功转染的细胞如果没有受到强光刺激的话, 荧光一般不会消失(注: FAM 荧光很容易淬灭), 在更长的时间也可以检测到荧光(如转染后 48h 还可以观察到清晰的荧光)。注意, 检测前对细胞进行的各种处理操作都必须避光。

(3)到了检测的时间, 为减少背景干扰, 也可以先用 PBS 或惯用的细胞洗涤液洗细胞 1~2 次, 把没有转染进去而残留在培养基或附在表面的 Cy3-siRNA 洗掉。注意洗涤时小心, 不要使细胞也洗脱落了。

(4)确保熟悉荧光显微镜操作。建议检测时, 可以先使光路先对准没有转染 Cy3-siRNA 的孔, 调好焦距, 打开激发光, 一切准备就绪后再进行观察(一般情况下可以马上看到荧光)。

(5)观察时间不宜过长, 尽量避免荧光被猝灭, 光路对准转染孔, 马上观察和拍照。拍完荧光照片后, 在同一视野中拍下明场的细胞照片。

(6)初次操作, 可能未必能成功, 所以请妥善保存好未用完 Cy3-siRNA, -20 $^{\circ}$ C 避光!! 熟悉操作后, 重做一次, 但注意如果重复次数太多, 时间太久, 荧光难免减弱!

(7)请务必小心操作, 耐心实验, 每一个细节上的失误都有可能导致实验失败。

(8)检测的效果还与检测条件有关, 包括检测时间、仪器的灵敏度等, 不同操作者可能得到不一样的结果。

(如可以使用 Leica 莱卡显微镜观察, 但是使用 Olympus 奥林巴斯显微镜观察的效果可能不是很好)

(10)注意保证 Cy3-siRNA 的保存和使用方法无误, 另外, 所有操作都必须在避光条件下进行。

3.3 流式细胞仪或激光共聚焦显微镜检测:

请参照仪器说明书