

1. 产品简介

1.1 适用范围

本说明书适用于金拓思生物提供的 siRNA 及 miRNA mimics 双链小分子 RNA。

- ① 10D 的双链 siRNA & mimics 欲溶解为 20 μ M 的样品, 可用 125 μ l DEPC H₂O 去重悬 10D 的 siRNA & mimics, 溶解后为 20 μ M 的样品。
- ② 由于 Oligo RNA 呈很轻的干膜状附在管壁上, 打开时极易散失, 所以打开管子前先离心 10000rpm 2min, 然后再慢慢打开管盖, 溶解时请加足量 DEPC 水后盖上管盖, 振荡溶解。
- ③ 荧光标记的 RNA, 如 FAM、HEX、Cy3、Cy5 等标记的 oligo 因为对光敏感, 必须避光保存。

1.2 运输保存

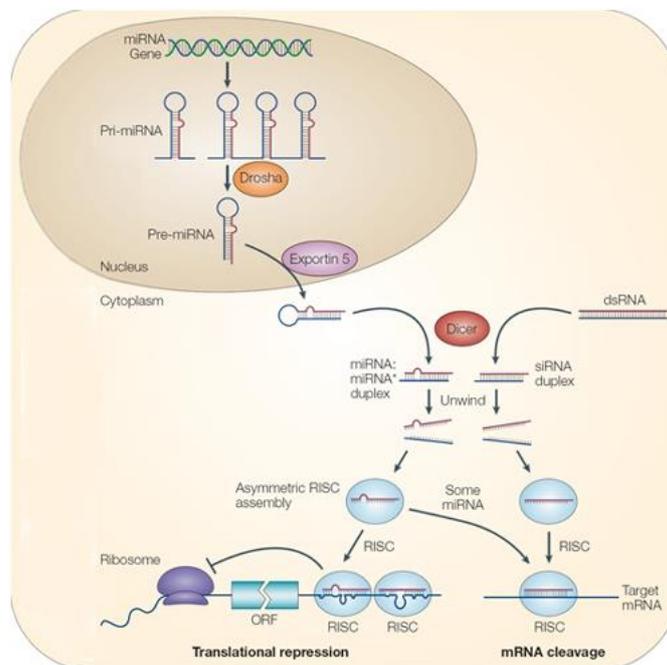
本产品以冻干粉的形式, 常温运输。收到产品后, 放 -20 $^{\circ}$ C ~ -80 $^{\circ}$ C 保存。干粉状态下保存 3-6 个月, 溶解状态下保存 1 个月, 溶解后请尽快使用。使用前请瞬时离心, 用 DEPC 水配制成 20 μ M 储存液, 分装保存于 -20 $^{\circ}$ C ~ -80 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。

1.3 实验原理

细胞质中, siRNA 进入含有 Argonaute 蛋白的 RNA 诱导沉默复合物 (RISC), RISC 复合体通过感知 siRNA 双链体的热力学不对称性, 区分向导链 (黑色) 和信使链 (蓝色)。信使链由于 Argonaute 蛋白的限制性内切核酸酶活性而发生移除, 而向导链则停留在成熟的 RISC 复合体, 并引导对互补 mRNA 靶基因的切割

microRNA 是长度约为 22nt 的内源性小 RNA, 存在于植物和动物体内, 由含有 70nt 的发夹状前体经 Dicer 酶作用而成。可以通过破坏靶 mRNA 的稳定性、抑制靶 mRNA 的翻译来对靶 mRNA 发挥调控作用

miRBase 数据库 <http://mirbase.org/index.shtml>



1.4 所需试剂

RNA oligo	双链siRNA或者miR-mimcis
转染试剂	金拓思提供的RNA Rocket 或者 Lipofectamin 2000/3000/MAX (Invitrogen) ...
实验对照	包括阴性和阳性及Mocking control

2. 细胞实验方法

2.1 转染

RNA Rocket 是金拓思生物最新推出的新一代 RNA 高效转染试剂，应用于 siRNA、miRNA oligo 的体外转染实验。

转染的一般性指导

使用RNA Rocket 转染RNA Oligo 进入哺乳动物细胞时，遵从以下一般性指导：

- 为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染siRNA 或miRNA 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RNA Rocket的浓度，并在20-100nM 范围内改变siRNA 或miRNA 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 或miRNA 可能具有细胞系依赖性。我们推荐开始时使用50nmol/L siRNA 或miRNA。
- 推荐在60%-80%细胞密度时进行转染。通常基因阻断的分析至少要在转染后24-72 小时进行。低密度转染细胞可以使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。RNA Rocket极低的细胞毒性可以方便研究者根据目的细胞生长特性，靶基因的表达特性，选择适合条件进行转染。
- 通过合适的阴性、阳性对照优化转染和检测条件。可以使用金拓思荧光标记的阴性对照序列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，推荐在每一次实验都包括荧光标记的阴性对照序列，作为转染效率的指示剂。对大多数细胞，看家基因是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的siRNA 转入靶细胞（同样适合实验靶siRNA），转染48 小时后统计对照蛋白或mRNA 相对于未转染细胞的降低水平。过多的siRNA 将导致细胞毒性以至死亡。
- 避免RNA酶污染。微量的RNA 酶将导致siRNA/miRNA 实验失败。由于实验环境中RNA 酶普遍存在，如皮肤，头发，所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品。因此保证实验每个步骤不受RNA 酶污染非常重要。尤其直接接触Oligo 原液的枪头、Tube，请务必保证RNase free。我们推荐商业化的RNase free 的枪头及Tubes。
- 健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性。通常，健康的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验，推荐用50 代以下的转染细胞，否则细胞转染效率会随时间明显下降。

2.2 需要准备的材料

开始实验前准备下列试剂：

- 目的哺乳动物细胞系（使用传代数低的细胞；转染前确信细胞健康和超过90%的存活率）
- 目的siRNA 或者miRNA Oligo（金拓思推荐溶解至20 μ M 储液）
- RNA Rocket（使用前贮存在+4 $^{\circ}$ C）
- 培养基（使用前 37 $^{\circ}$ C 预热）

e. 合适的细胞培养板及其它

2.3 转染步骤（以24孔板为例）

使用RNA Rocket 转染siRNA 或miRNA Oligo 进入哺乳动物细胞时，使用下述步骤。参阅表1-表3，确定加入不同组织培养方式的试剂量以及体积。金拓思推荐以20-100nmol/L 浓度范围 siRNA 或miRNA Oligo 终浓度，及表2中推荐的RNA Rocket的量作为优化的起始点，客户可针对目的细胞系和siRNA 或miRNA Oligo（推荐终浓度范围20-100nM）进行优化。

1. 转染前一天，根据表1推荐的细胞数量，提前一天将细胞接种在6孔板中，以细胞接种时的密度在30-50%为宜。
2. 每一个转染样品按照如下的方法准备siRNA/miRNA oligo—RNA Rocket复合物：
 - a. 转染前，取siRNA/miRNA oligo 冻干粉稀释至20uM（金拓思推荐的储液是20uM，取125ul DPEC水进行溶解，稀释至20uM）。取5ul 20uM 的siRNA/miRNA oligo 溶液加入到100 μl Opti-MEM 或无血清DMEM，无血清1640。轻轻混匀，室温放置5min。
 - b. 孵育5min后，取6-8 ul RNA Rocket 加入到a.中准备好的培养基稀释的siRNA/miRNA oligo，加入后立即充分混匀（可用振荡器振荡或用加样器吹吸10次以上），轻微离心后，室温放置10min（请保证足够时间静置，且孵育时间不超过1h）。以便允siRNA/miRNA oligo—RNA Rocket 复合物的形成。
 - c. 在复合物孵育的10min 内，从细胞培养板中移除原有的培养基。每孔加入500ul 的完全培养基（可含10%血清和抗生素）。RNA Rocket不受血清和抗生素的影响。
3. 将siRNA/miRNA oligo—RNA Rocket复合物逐滴滴加到每一个包含细胞和培养基的孔中。轻轻地前后摇动培养板混合均匀。使用RNA Rocket转染中无需去除复合物或者改换培养基，若目的细胞本身对于转染操作较为敏感（如原代细胞），我们建议可在转染后4-6小时改换完全培养基，并不会损失转染的活性。
4. 37℃，CO2 培养箱孵育24-96小时，直到适合进行目的基因分析。我们建议做目的RNA检测可在24-48h 收集细胞检测，目的蛋白检测可在48-72h 收集检测。提前1 天种植细胞数量和培养基体积

表1 提前1天种植细胞数量和培养基体积

培养容器	转染前1天接种细胞数量	每孔表面积 (cm ²)	每孔培养基总体积(ml)
6-well/ 35 mm	1 5 0 0 0 0 ± 5 0 0 0 0	9.4	2 ml
12-well	5 0 0 0 0 ± 20 000	3.8	1 ml
24-well	2 5 0 0 0 ± 1 0 0 0 0	1.9	0.5 ml
48-well	1 5 0 0 0 ± 5 0 0 0	1	0.5 ml
96-well	7 5 0 0 ± 2 5 0 0	0.3	0.1 ml
60 mm/ T25 flask	4 0 0 0 0 0 ± 1 0 0 0 0 0	28	4 ml
100 mm/ T75 flask	1 0 0 0 0 0 0 ± 2 5 0 0 0 0	78.5	10ml

表2 RNA Rocket推荐用量（24孔板）

siRNA/miRNA 终浓度	RNA Rocket用量/24孔
> 50 nM	3 ± 1 ul
≤50 nM	1 to 2 ul

表3 不同细胞培养容器转染推荐用量

培养容器	表面积相 对于24孔 比率	RNA 用量 (取溶解成 20 μ M 的储 存液)	RNA Rocket	RNA—RNA Rocket复合 物	每孔培养 基	总体积	RNA 终浓 度*
6孔板	4	5	8 \pm 2 μ l	200 μ l	2ml	2 ml	50nmol/L
12孔板	2	2.5	4 \pm 2 μ l	200 μ l	1 ml	1 ml	50nmol/L
24孔板	1	1	2 \pm 1 μ l	100 μ l	500 μ l	500 μ l	50nmol/L
96孔板	0.2	0.2	1 \pm 0.5 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l	50nmol/L
60 mm/ T25 flask	8	10	15 \pm 5 μ l	400 μ l	4ml	4ml	50nmol/L
100 mm/ T75 flask	20	12.5	40 \pm 10 μ l	500 μ l	10ml	10ml	50nmol/L

* 建议根据您的实验体系做RNA 终浓度的优化。

2.4 贴壁细胞转染程序

以24孔板为例，若要检测基因沉默或者过表达效果，推荐最低RNA oligo终浓度为50nM（不同细胞可以上下优化2-4倍浓度）；遵循以下操作方法可以高效地将RNA oligo转染贴壁和悬浮培养的多种真核细胞。但是对某些特殊的细胞系和培养条件，或特殊应用等，也需要单独特别优化。

1. 细胞铺板

转染时细胞密度：一般来说，当细胞密度达到60-80%时进行转染可以取得较高的转染效率。然而，不同细胞的最适转染密度都不尽相同。因此在初次转染某种细胞时，可以通过预实验先确认该细胞最佳的状态及转染密度。

2. 复合物的制备及转染

- 1) 使用前将RNA Rocket转染试剂轻轻混匀；
- 2) 直接将适量的RNA oligo与RNA Rocket转染试剂直接混合后，用移液器吸吹混匀，静置10-15min，再将复合物加入300 μ l完全培养基混匀后加入24孔板中；
- 3) 37 $^{\circ}$ C静置培养细胞，6-8 h后换液拍照。36-72 h检测mRNA或蛋白水平的表达；

注：1. 在复合物制备过程中绝对不能用任何试剂对核酸或转染试剂进行稀释，只需将两者按比例直接混合即可。

2. 整个转染过程都可以用完全培养基，无需用无血清培养基。

3. 若第一次转染后转染效率不理想，可在转染后第二天继续添加核酸-RNA Rocket复合物进行转染，可进一步提转染效率。

2.5 效果检测

转染完成后24~72小时均可进行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。

a. RNA水平的检测（RNAi沉默鉴定标准）：siRNA作用的目标分子是目的基因的RNA，在RISC

系统的作用下剪切目标RNA，故检测目的基因的RNA水平可直接反应siRNA是否发挥了相应的作用，且通过qRT-PCR可计算具体的抑制效率。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：引物设计质量很重要。

b. 蛋白水平的检测：对于蛋白编码基因，还需检测相应的蛋白表达水平，以确定是否目的蛋白也成功下调。由于蛋白表达水平的变化受多个因素影响，有时候会出现RNA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，用于判断RNAi不理想的原因。

c. 功能筛选：应用EdU细胞增殖、EdUTP细胞凋亡等检测方法进行siRNA对细胞功能的直接筛选。

2.6 siRNA 体内导入方法

步骤以33 μ g的核酸（siRNA/miRNA）与125 μ l体内转染试剂RNA Rocket，20g裸鼠尾静脉注射为例。

1. 核酸溶解：10D siRNA 使用前离心，轻轻打开管盖，加入125 μ l 无菌水，震荡溶解；

2. 取出RNA Rocket体内转染试剂盒，平衡到室温；

3. 核酸稀释：取1.5ml灭菌EP管，加入125 μ l siRNA，再加入RNA Rocket 125 μ l，充分混匀；室温静置15-20min；（转染复合物即用即配，配置好了室温静置不宜超过30min）

4. 裸鼠尾部碘酒或酒精消毒，远端1/3处静脉注射；或肿瘤原位多点注射。注射完成后移去针头，按压针孔10秒以上，防止药液流出；

5. 注射3天后，转染效率可达到高峰期，可取样检测相关基因、蛋白的表达，或进行其他检测。

3. siRNA 或 mimics 效率低，从哪些方面分析。

（1）提高转染效率

RNA Rocket：RNA 比例未优化，参见表 3，在目的细胞上做转染优化，提高转染效率，其次课可以更换转染试剂或者尝试在在他细胞类型上进行转染。非最佳状态的细胞会降低转染效率，建议细胞接种后在 24 小时内达到 60-80%，密度过高或多低都会极大地影响转染效率，在 24 小时内完成转染。

（2）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，在mRNA水平可以在24-48 小时验证结果，在蛋白水平可以到48-72 小时后验证结果

（3）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 Δ Ct值为10以内，比较适合做RNAi，若 Δ Ct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，建议更换其他细胞实验。

（4）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。

常见问题解答 Q&A

Q siRNA 哪条链对 mRNA 起作用？

A 反义链（引导链）将与 mRNA 结合。

Q siRNA 转染多久后检测基因表达的下调？

A 根据您所靶向的基因，在转染后数小时即可在 mRNA 水平检测。我们建议在转染 48 小时后检测 mRNA 的敲低水平。影响检测时间的因素包括转录活性，信使 RNA 的降解速度，以及是否存在替代通路。要确定敲低的峰值，最好进行一个时间梯度实验。

Q siRNA 使用什么进行转染

A 常规细胞系和贴壁细胞建议使用我们的 RNA Rocket 转染即可，针对难转染的原代细胞，神经细胞，干细胞或悬浮细胞，建议使用我们的慢病毒 shRNA 侵染。

Q 可以反复转染获得持续的敲低效果吗？

A 是的，如果经过反复转染步骤细胞状态没问题即可。

Q RNAi 实验需要哪些类型对照？

A 我们建议使用以下对照：

- 阳性对照 siRNA
- 阴性对照 siRNA
- 仅有细胞（无 siRNA）的对照
- 针对靶基因的多条 siRNA
- 仅有转染试剂（无 siRNA）的对照

Q 你们的 siRNA 产品提供哪些质保？

A 各类型产品质保说明如下

定制设计：客户提供基因信息给我们要求设计，但非订购预设计的 *Silencer* siRNA 产品，那么我们会用自己的算法根据目的基因的序列或数据库编号（accession number）（靶向转录变异体，非人、小鼠或大鼠的物种）设计一个 siRNA。定制设计的 siRNA 是不适用于质量保证条款的。

定制合成：用户提供 siRNA 序列，我们合成。定制合成的 siRNA 不适用于质量保证条款。

定制修饰：用户可以提出定制修饰，例如加入荧光标记（FAM, Cy3），定制规格（>50 nmol）或分装的报价咨询。定制修饰的 siRNA 不适用于质量保证条款。

经验证的 *Silencer* siRNA 产品

siRNA 的转染浓度必须在 ≥ 40 Nmol/L，且在转染后 48 小时测定 mRNA 水平。建议采用实时

定量 RT-PCR 技术检测 mRNA 水平。客户还必须提供阳性对照的有效敲低结果，从而证明转染效率是足够的。如果未能检测到我们承诺的敲低水平，而阳性对照的结果是成功的，我们将会免费为您合成一条新的 Silencer siRNA 或退款。

预设计的 *Silencer* siRNA 产品

如果三条之中至少有一条未能引起 >70% 的靶标 mRNA 敲低效果，JTSBIO 将会免费一次性更换至多三条预设计的 *Silencer* siRNA。您必须遵照良好的实验室操作，而且靶向内源基因的经验证的 siRNA（例如，*Silencer GAPDH* siRNA 对照）对照实验结果确认转染效率最佳。为了评估敲低效果，预处理样品内的靶标 mRNA 水平必须与采用非靶向对照 siRNA（例如 *Silencer* 阴性对照）转染的细胞内的靶标 mRNA 水平进行比较。

Q 阴性对照起什么作用？

A 阴性对照是为了反映 siRNA 对细胞的效果不是由序列的非特异性引起的。阴性对照应该和您的阳性分子的化学特征（长度、修饰）相匹配，但应该是一条不靶向任何特定基因的非靶向型序列。

Q 什么是脱靶效应（off target）？

A 脱靶效应是指由 siRNA 通过 RNAi 机制引起的任何非靶基因的沉默。这种效应既可以来自于 siRNA 引导链（反义链）也可以来自于传递链（正义链）。

Q RNAi 技术优势是什么？

A RNAi 是一种快速鉴定基因功能的经济有效的方法，并且对于目前测试过的大多数基因都有效。正在迅速成为敲低目的基因表达的首选方法。RNAi 对于研究基因功能，信号通路分析，RNAi 机制研究，靶点验证均非常有用，并且显示出巨大的诊断和治疗应用潜力。

Q siRNA 与剪切后的 dsRNA 有什么区别？

A 两者的分子结构是相同的：Dicer 将长 dsRNA 特异性剪切为 21 - 23 个核苷酸的双链，同时带有 siRNA 标志性的 2 碱基突起。两者一个重要的区别是 d-siRNA 通常包含一组从目的 dsRNA 全长生成的 siRNA，而 siRNA 通常是指靶向特定目的区域的一个单一序列，并且经常以一个单一寡核苷酸序列或几个寡核苷酸的特定组合的形式被合成。

Q 如何检测 siRNA 效果

A 最常用的测定特异性基因敲低的方法是进行实时 PCR。在某些情况下，可以使用报告基因系统方便地测定报告基因如 β 半乳糖苷酶的表达。也可以使用免疫印迹分析比较导入 siRNA 之前和之后的蛋白表达。

Q 可以针对非编码 RNA 进行干扰吗？

A 可以的，我们的 *Silencer* siRNA 可以设计用于靶向敲低人、小鼠和大鼠细胞质或细胞核内的长链非编码 RNA (>100nt)。

Q siRNA 的末端带 dTdT 突起吗？

A 是的,大多数 *Silencer* siRNA 在正义链末端带有 dTdT 突起。重要的是反义链(引导链)的 3'末端突起会和目的 mRNA 的 5'末端互补,因此,这些末端突起可以由任意不同的核苷酸组成

Q 一般使用多少个 siRNA 来敲低目的基因表达?

A 我们建议至少使用 3 个靶向同一基因的 siRNA。这将为 RNAi 数据带来更高可信度。

Q 设置各种对照组作用是什么?

A 阳性对照 siRNA 例如 *Silencer Select GAPDH siRNA* 将证明转染的有效性并有助于优化转染条件。阴性对照 siRNA 对于设定基因表达的基线是必要的。荧光标记的阳性对照 siRNA 可以直接观测细胞的转染效率。

Q 通过什么方法来检测 RNAI 实验效果,时间点如何设置?

A 可以使用实时 PCR 检测 mRNA 水平。通常在转染后 24, 48 和 72 小时做一个时间曲线分析。蛋白水平可以在 48, 72 和 96 小时后检测。检测时间根据目的基因的不同会有差异。

Q miRNA 是什么? 和 siRNA 区别是什么?

A miRNA (microRNA)是植物和动物基因组中天然产生的短链、高度保守的小非编码 RNA 分子。miRNA 是单链的,长 18-25nt 并且可以调控转录后 mRNA 水平,它们通常结合互补 mRNA 序列的 3'非翻译区(3'-UTR),导致翻译抑制和基因沉默。研究表明数以千计的人类蛋白编码基因被 miRNA 所调控,说明 miRNA 是很多重要生物进程的“重要调控者”。

siRNA 通过序列特异的方式介导目标 mRNA 分子的降解,而 miRNA 抑制翻译而不剪切 mRNA。

Q 如何保存寡核苷酸?

A 将干粉状的寡聚核苷酸保存在-20°C 或更低温度下的非自动除霜的冰箱中。将重悬后的寡聚核苷酸保存在-20°C 或更低温度下,可保存较长时间(可长至一年)。我们建议将重悬后的 miRNA 分装以避免污染。可以存储在-80°C 但并不必要。工作溶液可以在使用前保存在 4°C 多至 7 天。作为干粉它们可以在-20°C 保存 6 个月。