

产品简介

siRNA产品使用说明

-----BioTNT 推荐产品

生物提供的siRNA为化学合成双链小分子RNA，即用型。

说明书示例：

ID	primerName	senses (5'-3')	Antisense (5'-3')	PackageOD	Package number	Purification	nm/tube	To make 100uM stock, add buffer (ul)
240226M05	AAA	CCCACAGCAGAUGAGAUCCACGUAA	UUACGUGGAUCUCAUCUGCUGUGGG	2	1	HPLC	3.34	33.4
Negative control				0.5	1	HPLC	1.25	12.5
Negative control FAM				0.5	1	HPLC	1.25	12.5
DEPC 水 1ML*1								

运输保存

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。使用前请瞬时离心，说明书上有配制100uM需要的加水量，先加入适量的RNase-free Water配制20uM的浓度(本浓度适用于分装和储存)，分装保存于-20°C ~-80°C，避免反复冻融（不超过5次）。上面为2OD siRNA的说明书示例，nmol 数量根据序列不同，说明提供了进行复溶的加水量。上例中，可以得到167ul的20uM的siRNA储存液。

使用前须知

产品以冻干粉的形式提供，由于影响结晶形态的因素很多，产品外观有些差异，甚至形态无法用肉眼可见，此为正常现象。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。

表1 20uM 储存液的配置参考

siRNA	100uM	20uM
RNase-free Water	需加入说明书上的水的体积	加入5倍的体积
说明书示例:	加入33.4ul得到	加入167ul得到

推荐使用LipoMAX siRNA/miRNA 转染试剂siRNA在细胞中的转染；

产品: LipoMAX siRNA/miRNA 转染试剂

产品概述

LipoMAX siRNA/miRNA 转染试剂是一种高效的用于siRNA/miRNA的脂质体转染试剂，用于向几乎所有常见细胞系和多种难以转染的细胞系进行转染。并支持快速转染程序，可以缩短您的转染时间，适配高通量、自动化筛选。

产品/组分信息

组分名称	T116-02
LipoMAX siRNA/miRNA 转染试剂	1.5 mL

储存方式

2~8°C保存，不可冷冻，2年有效。

使用说明

使用前注意事项

1. 为降低细胞毒性，细胞铺板时可选择更换不含抗生素的培养基。
2. 制备核酸稀释液和转染试剂稀释液时应使用减血清的转染专用减血清培养基培养基(Cat# B204)、Opti-MEM™培养基或不含血清和抗生素的培养液，因为血清会影响核酸与转染试剂复合物的形成；
3. 一般情况下，转染后无需更换培养基。然而，有些细胞对转染试剂比较敏感，如果在转染后状态不佳，可在4-6小时对细胞进行换液（更换为含血清完全培养基），转染效率无明显影响；
4. 首次使用该试剂或者更换细胞类型，特别是对转染试剂敏感性的细胞，需要进行预实验，使用不同剂量的转染试剂进行实验，以便摸索出最适转染试剂用量。
5. 本产品仅用于科研。

一、siRNA/miRNA 转染

(以24孔板转染 siRNA 为例的操作步骤)

Day 1 :

在500μL不含抗生素的生长培养基中对细胞进行铺板，使得转染时的细胞汇合度达到30-50%。

注：在更低密度时进行转染可以让转染和检测之间的时间间隔更长，并且使因细胞过量生长造成的细胞活力损失更小。

Day 2:

1. 将 siRNA 的储液用 DEPC 水稀释到 20μM；
2. siRNA 稀释液制备: 取 1 个干净的 1.5mL 离心管，向 25μL 转染专用减血清培养基中加入 1μL siRNA (20μM) 后轻柔混匀，得到 siRNA 稀释液；
3. 转染试剂稀释液制备: 另取 1 个干净的 1.5mL 离心管，向 25μL 转染专用减血清培养基加入 1μL LipoMAX 转染试剂，轻柔混匀，得到转染试剂稀释液，室温静置 5 分钟。
4. siRNA-脂质体复合物制备: 将 siRNA 稀释液和转染试剂稀释液混合，轻柔混匀，室温静置 5 分钟，形成 siRNA-脂质体复合物（溶液可能变得浑浊）；
5. 将 siRNA-脂质体复合物均匀滴加入细胞中，以十字交叉的方式进行轻柔混匀。随后将细胞培养板放入培养箱中进行培养，为保证足够的营养，建议4-6小时对细胞进行换液（更换为含血清完全培养基），随后继续培养至鉴定时间，一般需要48~96h。

优化 siRNA 转染：为获得较高的转染效率和较低的非特异性效应，通过改变 siRNA 和 LipoMAX 转染试剂浓度来优化转染条件。对于 24 孔板，在 10-50pmol siRNA 和 0.5-1.5μL LipoMAX 转染试剂 范围内优化转染条件。根据靶基因和靶细胞的性质，在优化条件时也可考虑以更高密度转染细胞。

扩大或缩小转染规模

在不同规格培养容器中转染细胞，按表中所示根据相对表面积按比例改变 LipoMAX 转染试剂、核酸、细胞和培养基的用量。对于自动化、高通量系统，在 96 孔板中进行转染时，建议采用 10μL 的稀释体积。

培养规格	培养基体积	稀释液体积	siRNA/miRNA 转染体系	
			siRNA/miRNA	LipoMAX
96-well	100 μ L	2 \times 5 μ L	5 pmol	0.25 μ L
24-well	500 μ L	2 \times 25 μ L	20 pmol	1.0 μ L
12-well	1 mL	2 \times 50 μ L	40 pmol	2.0 μ L
6-well	2 mL	2 \times 100 μ L	100 pmol	5 μ L
6-cm dish	3 mL	2 \times 200 μ L	200 pmol	10 μ L
10-cm dish	10 mL	2 \times 500 μ L	600 pmol	30 μ L

二、快速转染程序（反向转染）

对于高通量、自动化筛选等一些实验场景，我们推荐使用快速转染程序。您可以通过将细胞直接铺板到转染混合物中，进行快速 96 孔板转染。在平板中制备复合物，并向 100 μ L 体积中直接添加密度为基础方案中规定的细胞密度的两倍的细胞。在存在复合物的情况下，细胞将照常贴壁。

注：对于更大规模的转染，也可尝试快速转染程序，以缩短实验周期。

实验指南

1. 实验对照该如何设置？

正式实验为实验组和阴性对照组（a-b），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（c-d），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甚了解，则需要预实验中设置对照组（d）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：

- a)实验组：使用目的基因siRNA进行转染。
- b)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。
- c)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。
- d)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。
- e)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。
- f)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。

2. 基因沉默效果不好，该如何改善？

1)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）。

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)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BioTNT的推荐浓度（50nmol）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。

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)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针对性地进行分析调整。

6)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。