

免疫细胞用 siRNA 使用说明书

产品介绍

本公司生产的 siRNA 均为化学方法合成并经 HPLC 纯化的双链小分子 RNA，即用型，可直接用于细胞转染使用。

产品类型 (表 1)

产品类型	目标基因 siRNA	siRNA NC 阴性对照	FAM-siRNA 转染对照	阳性对照 siRNA	GA-RNA Transfection Kit 转染试剂	DEPC 水	目标基因 qPCR 引物
单条 siRNA	6nmol	X	X	X	X	√	X
三保一套装	6nmol*3 条	3nmol	3nmol	3nmol	X	√	X
四保一套装	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	X	√	X
三保一套装 pro 版	6nmol*3 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	X
四保一套装 pro 版	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	X
三保一套装 max 版	6nmol*3 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	5nmol*1 对
四保一套装 max 版	6nmol*4 条	3nmol	3nmol	3nmol	0.5mL	√	5nmol*1 对

使用前须知

产品形式：冻干粉(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)

运输条件：常温运输

储存条件：请于-20℃ ~ -80℃条件下存放，冻干粉可以稳定保存一年。

注意事项 1：siRNA 在操作过程中，需注意避免（核酸酶 RNAase，温度，极端 PH 等）可能导致的产品降解。请遵循 RNA 操作规范，带手套操作，ep 管，移液枪和枪头等都要避免污染，实验过程中，产品最好于冰上放置。

注意事项 2：使用前请瞬时离心（在最大转速约为 4,000g 的低速条件下离心装有 siRNA 的 EP 管，让 siRNA 聚集在试管的底部）轻轻的打开管盖，用 DEPC 水或者 RNase free water 配制成 20μmol/L 的 siRNA 储存液，柔和地用移液枪吹打充分混匀 siRNA 储存液。分装保存于-20℃~-80℃，避免反复冻融（不超过 5 次）。

siRNA	3nmol	5nmol
DEPC 水	150ul	250ul

表 2 20μmol/L 的 siRNA 储存液的配置参考

注：若搭配 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂不得使用 PBS 或培养基稀释 siRNA

siRNA 的细胞转染步骤

为了降低细胞密度、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可重复性，

1、一般建议：

1. 接种细胞时的每个孔的细胞密度，数量保持尽可能一致，且细胞均匀分布。
2. 转染实验每个转染处理组建议设置至少 3 个复孔；
3. 基安生物推荐的 siRNA 转染终浓度为 40nmol/L，该浓度对于多数情况可以达到较为理想的 siRNA 干扰效果，不同类型的细胞以及研究目的的 siRNA 的最佳转染终浓度各不相同。最佳转染效率建议通过调整 siRNA 的用量（优化范围推荐 5~100nmol/L）来进行优化。
4. 转染时的细胞密度应根据细胞生长速度、大小、后续检测时间等条件进行调整。

转染步骤示例：

以基安生物的 GA-RNA Transfection 转染试剂（转染试剂组成见表 3）转染 siRNA（6 孔板，siRNA 转染终浓度为 40nmol/L）为例，其他规格容器的试剂用量请参考表 4，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

基安生物的 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂

GA-RNA Transfection Kit 转染试剂是一种专门用于小片段 RNA（siRNA /ASO / miRNA mimic/ miRNA inhibitor/piRNA / tRNA 等）的高效低毒转染试剂（不建议转染质粒），极具生物相容性，转染效率优异，细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便，快捷，高效。

GA-RNA Transfection Kit（免疫细胞）组成	100ul	1.5ml
GA-RNA Reagent	100ul	1.5ml
GA-RNA Buffer	1ml	15ml

表 3 GA-RNA Transfection Kit 转染试剂成分组成及规格

注) GA-RNA Transfection Kit 转染试剂为常温运输，长期储存为 2~8℃保存，可稳定保存一年，不可冷冻，冷冻后会破坏 Reagent 组分的结构和性状，会极大的影响细胞转染效果。推荐转染前细胞密度 50%~80%为最佳。

1、细胞接种：

贴壁细胞：以 293T 细胞为例，接种~ 0.4×10^6 个细胞到含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中，使细胞转染时达到 50-80%细胞密度。

悬浮细胞：以 THP-1 细胞为例，接种~ 0.5×10^6 个细胞至含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中。

注) 1: 不同细胞初始接种数量依据不同的细胞大小，细胞类型和细胞生长速度，培养时间，实验目的相应调整，每个孔接种的细胞数量尽可能相同，且细胞均匀分布。

2: 悬浮细胞、免疫细胞、原代细胞本身的特性普遍比较难转染，可通过调整 siRNA 用量以及转染试剂的用量，不同的转染试剂及尽可能规范实验操作等来尝试提高转染效果，如无明显改善可更换为电转方式或其他方法。

2、siRNA 转染

siRNA 预混液制备：取无菌无酶 EP 管一支，加入 22.5ul 的 GA-RNA Buffer 和 4ul 的 20umol/L 的 siRNA 储存液，吹打混匀。

siRNA-GA 转染复合物制备：取 26.5uL 的 GA-RNA Reagent 加入到 siRNA 预混液的 EP 管中，移液枪充分吹打混匀 20 次以上，或者旋涡 2-3s。

注：a)转染复合物在室温下可稳定存放 8 小时，请勿将 siRNA-GA 转染复合物置于冷冻条件。

b) RNA/GA-RNA Reagent 的比例是 GA-RNA Transfection 转染试剂封装的关键因素，如需增减每孔 siRNA 用量，您可以按比例增加或减少加入细胞的 siRNA-GA 转染复合物的体积。

将 **siRNA-GA 转染复合物** 加入到待转染的孔板的细胞培养基中，轻轻混匀。
 逆行其他必要的特殊处理（可选，如加药处理等具体依据具体实验情况来确定）。

将培养板置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 24~96h（培养时间与实验目的相关，qPCR 一般为转染后 24-48h 收集细胞提取 RNA 检测 RT-qPCR；WB 一般为转染后 48-96h 收集细胞检测 WB）。

试剂	孔板			
	96 孔(ul)	24 孔(ul)	12 孔板	6 孔(ul)
GA-RNA Buffer	1.1	5.6	11.3	22.5
20umol/L siRNA 储存液	0.2	1	2	4
GA-RNA Reagent	1.3	6.6	13.3	26.5

表 4 终浓度 40nmol/L siRNA 不同培养皿的推荐转染用量

3. siRNA 效果检测

RNA水平检测：转染siRNA后24~48h进行RNA水平检测。通过qPCR检测目的基因RNA水平的变化情况是RNAi实验结果的公认标准。由于细胞种类的不同，各实验最佳检测时间也不相同。检测时间过晚可能导致检测干扰效率不佳甚至检测不到干扰效果。（注：检测的qPCR引物设计质量很重要，我司（基安生物）可提供优质的qPCR引物设计合成）

蛋白水平检测：对于编码蛋白的基因，如需进行蛋白水平检测，推荐转染后48-96h进行相应检测。由于蛋白表达受到影响因素较多，如检测蛋白水平变化不明显请检测其mRNA水平变化情况，以确定siRNA是否起作用。（注：wb检测的抗体质量很重要，我司（基安生物）可提供优质的wb抗体）

常见问题

1. 基安生物siRNA套餐售后说明：在细胞本身转染效率能够达到80%及以上转染效率，且目标基因本底的表达丰度和内参GAPDH/β-actin的Ct值在15个Ct以内的情况下，siRNA可达到70%以上的沉默效果。若经qRT-PCR鉴定，套餐中3/4条siRNA均未达到70%或以上的沉默效果，基安将根据您提供的实验结果进行分析。如核实为siRNA本身效果不佳，可免费重新设计并合成针对靶基因的2条新的siRNA。特殊物种（除人，大鼠，小鼠以外）的基因，lncRNA/circRNA不享受此售后条款。

2. siRNA实验的组别设置：

- 目标基因siRNA处理组（用于检测针对目标基因设计合成的3/4条siRNA分别的有效性和效果，进而筛选出效果最佳的siRNA序列）
- siRNA NC阴性对照组 使用阴性对照siRNA NC进行转染，用于说明目标基因siRNA作用的特异性，作为分析目的基因siRNA作用的参照。（若相比e组，细胞状态明显变差或数量显著降低，则说明siRNA NC对目标细胞可能存在明显毒性，建议更换阴性对照siRNA）
- 阳性对照siRNA处理组：提供的GAPDH siRNA为已验证有效的siRNA。如果si-GAPDH处理组相比siRNA NC对照组未出现GAPDH的有效敲低则说明细胞本身的转染效率/实验转染操作很可能存在问题，若敲低效果很好则可说明细胞转染率好且实验操作及方法正常。也可使用其他自己已验证明确有效的siRNA进行转染并检测沉默效率。（若阳性对照siRNA为si-GAPDH，则qPCR的内参需变更为ACTB或者其他内参）
- FAM-siRNA NC转染对照处理组：使用荧光对照siRNA进行转染，检测当前转染条件下细胞的转染效

率。

e) 转染试剂处理组：使用转染试剂进行转染，但不加siRNA，用于排除转染试剂本身对细胞可能的影响。

(若相比f组，细胞状态明显变差或数量显著降低，则说明转染试剂对目标细胞可能存在明显毒性，建议更换转染试剂)

f) 空白细胞组：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。

(注：其中c, d组可任选其一，两者主要目的都是为了检测细胞转染效率，所有的目标基因siRNA的抑制效果均需和siRNA NC阴性对照组对比计算得出。理想的结果是b.e.f 组的数据应该基本一致差别不大，且a组相比b组目标基因的mRNA降低70%及以上。C组相比b组阳性基因的mRNA降低70%及以上)

RNAi实验是直接作用于目标基因mRNA的，所以我们只能保证mRNA水平有效，不能保证蛋白水平有效。mRNA水平的变化并不一定和蛋白水平完全对应。siRNA因为受到细胞及培养基环境中的核酸酶以及细胞

本身的有丝分裂及新陈代谢等因素的影响，siRNA转染后可以大约维持3-4天的沉默效果。

3. 基因沉默效果不佳改善建议：

1) 提高转染效率

良好的转染效果是RNAi实验成功的基本前提。若基因沉默效果不佳，需优先排查转染效率方面的问题，可通过阳性对照siRNA/FAM-siRNA 转染对照来评估确认细胞转染效率。确认转染效率之后，如果转染效率不理想，则依据转染试剂相关说明进行转染条件（细胞密度，转染试剂用量，转染时间，siRNA用量等）优化尝试，其次可尝试在其他类型细胞上进行转染。若由于实验细胞本身的特性很难转染，可考虑更换转染试剂或转染方法（如电转），或者在实验本身允许的情况下更换易于转染的其他细胞。

2) 检测目的基因初始的表达水平

若目的基因在实验细胞中的原本的表达丰度很低，是难以得到有效的沉默的。一般目的基因与管家基因GAPDH或ACTB的 ΔCt 值差值为10以内，比较适合做RNAi，若 ΔCt 值差值大于15则很难得到有效的沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况，若实验本身允许的情况下建议更换实验细胞。

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，可根据基安生物推荐浓度（40nmol/L的转染终浓度）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) 检测分析方法有误

qPCR引物的特异性不佳或使用有误，检测时间点设置不合理，对照组别设置错误，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地进行分析调整。

5) 更换其他siRNA

若确定转染效果良好，目标基因表达水平符合要求，RNAi的qPCR检测实验的引物特异性良好，及其他因素分析都没有问题的情况下，却没有达到理想的基因沉默效果，则可以尝试重新设计合成新的siRNA尝试。（注：由于RNA本身序列特性，目标基因靶位点的二级结构复杂等因素，目前，没有任何公司或者个人能够保证设计合成的每条siRNA都可以对目标基因达到很好的敲低效果）

6) 其它原因

部分基因因其本身表达调控特性导致其难以沉默，在排除转染效率，基因表达水平、 siRNA 浓度，实验操作等方面的问题，且尝试过5条以上siRNA，均无法有效敲低的情况下，则应考虑更换细胞进行尝试，或者更换其他方法如Crisp等来进行尝试。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源， QianMoBio Co. Ltd,

上海芊陌生物科技有限公司 南京芊陌生物科技有限公司

网址：www.qianmobio.com



shanghai, China, 上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper, 联系销售或者本公司, 可获取对应的科研奖励金。