

siRNA 产品使用手册

1. 产品简介

siRNA 是最常用的基因沉默实验工具, 可在细胞内引导 RISC 系统特异性剪切目标 mRNA, 从而抑制目标基因表达。曜源生物提供适用于常规细胞实验的常规 siRNA 和动物实验用 5'Cho1 + 2'OMe 修饰 siRNA 等。

2. RNAi 原理与实验流程

2.1 RNAi 原理

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由与靶基因序列同源的双链 RNA(dsRNA)引发的序列特异性转录后基因沉默过程。细胞中 Dicer 酶将 dsRNA 裂解为 21-25 个核苷酸的小干扰 RNA(siRNA), siRNA 进入 RISC 复合物后, 特异性识别并降解相同序列的 mRNA, 从而阻断相应基因表达。

2.2 实验流程

1. 靶基因确认
2. siRNA 设计
3. siRNA 制备
4. siRNA 转染
5. RNAi 结果检测
6. 功能研究

2.3 常用试剂

试剂种类	用途
siRNA oligo	与目标基因转录本互补
转染试剂	脂质体法、电穿孔法、纳米高分子法等
实验对照	阴性对照、阳性对照、Mock 对照等
mRNA 检测	qRT-PCR
蛋白检测	Western blot
功能检测	EdU 增殖、TUNEL 凋亡等

3. 产品类型

类型	特点
普通 siRNA	常规基因沉默实验
化学修饰 siRNA	增强血清、体内及细胞培养稳定性, 作用时间可延长
荧光标记 siRNA	可用荧光显微镜、流式细胞仪、共聚焦显微镜观察转染效率、细胞定位
siRNA 阴性对照	与哺乳动物基因无同源性, 用于说明 siRNA 作用的特异性
siRNA 阳性对照	如 GFP-274、Luciferase GL2、Beta-Actin、P53、GAPDH, 用于验证实验体系可靠性
动物用修饰 siRNA	如 5'Cho1 + 2'OMe 修饰, 用于体内实验

4. 运输与保存

1. 产品以冻干粉形式提供, 常温运输。
2. 收到产品后, 请于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 保存。冻干粉可稳定保存一年; 在推荐条件下稳定性可达 6 个月。
3. 使用前请瞬时离心。
4. 细胞实验 siRNA 用灭菌无酶水或 DEPC 水配制成 $20\ \mu\text{M}$ 储存液, 分装保存于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$, 避免反复冻融, 不超过 5 次。
5. 动物用 siRNA 用生理盐水等实验动物等渗溶液溶解至注射所需体积后使用。
6. 荧光标记 RNA 必须避光保存。
7. 打开管子前先离心 $10000\ \text{rpm}$, $2\ \text{min}$, 再慢慢打开管盖, 避免干膜散失。

20 μM 储存液配置参考

siRNA 量	灭菌无酶水体积
5 nmol	250 μL
20 nmol	1000 μL

补充:

- siRNA 平均分子量约 13,300。
- $1\ \text{OD duplex} \approx 2.5\ \text{nmol} \approx 33\ \mu\text{g}$ 。
- $1\ \text{OD siRNA}$ 用 $125\ \mu\text{L DEPC H}_2\text{O}$ 重悬, 可得 $20\ \mu\text{M}$ 样品。

5. 使用前须知

1. 产品以冻干粉形式提供, 由于影响结晶形态的因素很多, 产品外观可能有差异, 甚至无法用肉眼观察到, 此为正常现象。
2. 为避免外界因素(酶、极端 pH、温度等)导致产品降解, 所有操作请严格遵循 RNA 操作要求。
3. 开盖前瞬时离心, 沿管壁轻柔加溶剂, 于室温溶解半小时, 并涡旋振荡数次促溶。完全溶解后及实验过程中, 产品最好于冰上放置, 使用完毕后请于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 小心保存。
4. 寡核酸转染效率主要由细胞性质和转染方法决定, 需针对具体实验细胞选择合适的转染方法。
5. 叠氮钠等试剂有毒, 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。
6. 本产品仅供科研使用, 不可用于体外诊断或治疗。
7. 实验过程中需使用 DEPC 处理过的耗材和试剂, 注意避免 RNase 污染。
8. 具体实验条件请根据细胞类型、转染试剂和所购产品说明书进行优化。

6. siRNA 设计原则

1. 从转录本 mRNA 的 AUG 起始密码开始, 寻找“AA”二连序列, 并记下其 3' 端 19 个碱基序列作为潜在 siRNA 靶位点。正义链和反义链均采用这 19 个碱基。
2. 避免在起始密码子或无义区域附近选择目的序列。
3. siRNA 序列 GC 含量应为 30%-60%。

4. 不要针对 5' 和 3' 端非编码区 (UTR)，这些区域有丰富调控蛋白结合位点，可能影响 siRNA 效果。
5. 将挑选序列在公共数据库中进行比较，确保与其它基因无同源性。
6. 与相应基因组数据库比较，排除与其他编码序列/EST 同源的序列，例如使用 BLAST。
7. 通常一个基因需要设计多个靶序列 siRNA，以找到最有效序列。
8. 阴性对照应与选中的 siRNA 序列有相同组成，但与 mRNA 无明显同源性。通常做法是将选中的 siRNA 序列打乱，并检查与其他基因无同源性。
9. UU 结尾和 dTdT 结尾的 siRNA 在效果上无区别，因为突出端无需与靶序列互补。合成 siRNA 时可直接提供以 AA 打头的 21 个碱基序列。

7. 细胞实验方法

7.1 通用建议

为降低细胞密度、试剂用量、转染效率等因素导致的孔间差异，保证实验可靠性和重复性，一般建议：

1. 每个转染样品设置复孔。
2. 接种细胞时，每孔细胞数量尽量保持一致，且细胞在各孔表面平均分布。
3. 除特定实验外，一般以到检测时间点时细胞未完全长满为宜。
4. 转染成功是 siRNA 发挥作用的前提，需选择对实验细胞转染率高且毒性低的转染试剂和方法。

7.2 转染浓度与检测时间

- 一般 siRNA 初始转染浓度为 50 nM，转染后检测时间为 24-72 h。最佳转染效率一般通过时间梯度和浓度梯度优化，浓度梯度优化范围一般为 5-100 nM。
- mRNA 水平检测：一般转染后 24-72 h 可检测到目的基因 RNA 表达明显降低。
- 蛋白水平检测：一般 48-96 h 检测。
- 最佳检测时间与细胞类型、转染试剂、检测目的相关。

7.3 转染步骤：Lipofectamine RNAiMAX (24 孔板示例)

RNAiMAX 为脂质类 RNA 转染试剂，适用于 siRNA、miRNA mimics、miRNA inhibitor 等小片段 RNA。

1) 细胞铺板

- 贴壁细胞：转染实验前 18-24 h，每孔 500 μ L 生长培养基中加入 $1.5-3.5 \times 10^4$ 个细胞，确保转染时细胞密度在 30%-50%。
- 悬浮细胞：转染当天，在 500 μ L 生长培养基中加入 $1-2 \times 10^5$ 个细胞。
- 转染时应确保细胞没有过度生长或处于休止期。

2) 转染复合物制备

1. 将 RNAiMAX 转染试剂放置于室温，使用前轻轻混匀。
2. 将 100 μ L OPTI-MEM 或无血清培养基加入无菌 EP 管中。
3. 加入 10 pmol (约 140 ng) 待转染 siRNA，充分混匀。
4. 加入 2 μ L RNAiMAX 转染试剂，快速涡旋 10 s 使其完全混匀。
5. 室温静置 10 min，使 siRNA 和转染试剂形成转染复合物。静置时间不要超过 30 min。

3) 转染过程

1. 趁静置时, 给 24 孔板换液, 每孔换上 0.5 mL 预热的新鲜培养基。
2. 将静置完毕的 100 μ L 转染复合物加入孔中, 终体系为 600 μ L, siRNA 终浓度约为 16.7 nM。
3. 加完后将细胞培养板轻晃摇匀。
4. 37°C 静置培养。检测基因沉默水平可在 24-72 h 内收样检测 mRNA, 或 48-96 h 内检测蛋白。

4) RNAiMAX 推荐转染条件 (以说明书为依据)

培养器皿	转染稀释液体积 (无血清培养基)	转染复合物中 RNA 含量范围	常规细胞每孔 siRNA-Mate 用量
96 孔板	50 μ L	2-10 pmol	0.25-1.5 μ L
24 孔板	100 μ L	6-30 pmol	1-4 μ L
12 孔板	200 μ L	12-60 pmol	2-8 μ L
6 孔板	200 μ L	22-110 pmol	4-16 μ L
60 mm	400 μ L	44-220 pmol	10-25 μ L
100 mm	500 μ L	105-525 pmol	30-60 μ L

7.4 细胞接种数量参考

培养器皿	每孔表面积	每孔培养基体积	贴壁细胞转染前一天接种密度	悬浮细胞转染当天接种密度
96 孔板	0.3 cm ²	0.1 mL	5000 $\pm$ 2500	2-5 $\times$ 10 ⁴
24 孔板	2 cm ²	0.5 mL	25000 $\pm$ 10000	1-2.5 $\times$ 10 ⁵
12 孔板	4 cm ²	1 mL	50000 $\pm$ 20000	2-5 $\times$ 10 ⁵
6 孔板	10 cm ²	2 mL	150000 $\pm$ 50000	0.4-1 $\times$ 10 ⁶
60 mm	20 cm ²	4 mL	400000 $\pm$ 100000	1-2.5 $\times$ 10 ⁶
100 mm	60 cm ²	10 mL	1 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 250000	2-5 $\times$ 10 ⁶

8. 动物实验方法

8.1 给药方式

1. **局部给药:** 最直接的导入方式, siRNA 导入效率较高, 用量少, 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。
2. **系统给药:** 适用于无法通过局部给药到达的靶位, 如内脏、器官以及散列分布的靶位 (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、肾等。

8.2 体内实验推荐剂量参考

- 肿瘤原位注射: 起始剂量 10 μ g/瘤体, 推荐剂量 5-20 μ g。
- 静脉给药: 起始剂量 2 mg/kg, 推荐剂量 1-10 mg/kg。一般给药剂量越高, 效果越好, 以不造成动物明显炎症或死亡为标准。
- 常规实验可参考 100 μ L 注射体积, 浓度 10-500 μ M。
- 原有反义核酸研究表明, 剂量大于 20 mg/kg/day 时可能观察到明显毒性。
- 建议针对具体实验绘制剂量反应曲线。

8.3 动物 siRNA 实验使用方法及剂量参考

文献/来源	动物/模型	给药方式	剂量	频次	备注
Weipu Ma et al. Mol Cancer. 2021	小鼠异种移植瘤	瘤内注射	10 nmol	每周 2 次, 共 3 周	经典局部给药
Hong Zhang et al. Adv Sci. 2021	小鼠异种移植瘤	瘤内注射	10 nmol	每 3 天 1 次	局部给药
Yun-Long Wang et al. Hepatology. 2019	小鼠异种移植瘤	瘤内注射	5 nmol	每周 3 次, 共 2 周	经典文献, 可保留
Junge Deng et al. Cancer Res. 2021	小鼠 PDX	静脉注射	75 mg/kg	前 3 天每天 1 次, 之后每 3 天 1 次, 共 3 周	系统给药
Han Tian et al. Nat Commun. 2020	小鼠心内注射肿瘤细胞	尾静脉	10 nmol	每周 2 次	系统给药
Xiangzhi Wang et al. J Allergy Clin Immunol. 2022	小鼠过敏性气道炎症	气管内	50 μ g 和 150 μ g	每天 1 次, 共 7 天	肺部局部给药
Diefei Liang et al. Autophagy. 2022	小鼠皮肤创伤	皮内注射	20 μ g	创伤建模后第 -2、0、2、4、6 天	皮肤局部给药
Shunlun Chen et al. Exp Mol Med. 2022	小鼠 AF 穿刺诱导 IVDD	注射 L3/4 IVD	5 nmol	术后第 1、7、14 天	椎间盘局部给药
Jun Wang et al. Theranostics. 2020	大鼠胶原诱导关节炎	关节内注射	5 nmol	每周 1 次, 共 3 周	关节局部给药
Ying Xiong et al. PLoS Genet. 2020	麻雀缺氧	胸肌注射	1 nmol	每 3 天 1 次	禽类局部给药
2023-2025 年 LNP/siRNA 肝靶向研究汇总	小鼠/大鼠	尾静脉	0.5-3 mg/kg	每周 1-2 次, 持续 2-4 周	常见于 ApoB、PCSK9、肝靶点
2023-2025 年肿瘤局部递送研究汇总	小鼠皮下/原位瘤	瘤内/瘤周	5-20 μ g 或 1-10 nmol	每周 2-3 次, 持续 2-4 周	局部递送, 用量少
2023-2025 年肺靶向研究汇总	小鼠	气管内/鼻内	20-150 μ g	每天或隔天 1 次, 持续 1-2 周	肺部局部给药
2023-2025 年中枢/鞘内研究汇总	小鼠/大鼠	鞘内/脑内	1-10 μ g	单次或每 3-7 天 1 次	中枢局部给药, 需谨慎优化

9. 效果检测

9.1 RNA 水平检测

siRNA 作用的目标分子是目的基因的 RNA, 在 RISC 系统作用下剪切目标 RNA, 因此检测目的基因 RNA 水平可直接反应 siRNA 是否发挥作用。通过 qRT-PCR 可计算具体抑制效率。一般 siRNA 转染后 24-72 h 即可检测到目的基因 RNA 表达明显降低。注意:

- 引物设计质量很重要。
- RT-PCR 引物应设计在 target 位置的两侧, 而不是同侧, 以避免假阴性或低估 knockdown 效率。
- 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, 则难以得到有效沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况, 建议更换实验细胞。

9.2 蛋白水平检测

对于蛋白编码基因, 还需检测相应蛋白表达水平, 以确定目的蛋白是否也成功下调。由于蛋白表达水平变化受多个因素影响, 有时会出现 RNA 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, 需认真检测其 mRNA 表达水平, 用于判断 RNAi 不理想的原因。

9.3 功能筛选

应用 EdU 细胞增殖等检测方法进行 siRNA 对细胞功能的直接筛选。也可使用 TUNEL 凋亡检测等。

9.4 qRT-PCR 数据分析

Real-Time PCR 实验设计应包括实验组、阴性对照 (NC) 和 Mock Transfection 三组, 每组至少三个重复。各组同时检测目标基因和管家基因的 Ct 值。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$$

相对表达量可用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算。各组重复实验的 Ct 值差异不能过大, 一般重复实验 Ct 值差异在 1 以内是可以接受的。

10. 实验对照设置

正式实验为实验组和阴性对照组, 实验组的抑制效果均需与阴性对照组比较。

在预实验中设置对照组, 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, 则需要在预实验中设置荧光标记转染对照或阳性对照 siRNA 实验进行转染效率检测, 以确定适合的转染试剂及转染条件。

常用对照组:

对照组	说明
实验组	使用目的基因 siRNA 进行转染
阴性对照组 (NC)	使用阴性对照 siRNA 进行转染, 用于说明 siRNA 作用的特异性
正常细胞对照组 (Blank)	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
转染试剂对照组 (Mock)	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
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
阳性对照组	使用已有效的 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

注意:

- 阴性对照是 RNA 干扰实验中不可缺少的。超过 200 nM 的浓度下, siRNA 可能导致非特异性压力反应。
- 常用阴性对照包括通用阴性对照序列和打乱序列的 siRNA。除非特殊要求, 最好使用通用序列作为阴性对照。
- 阳性对照与基因特异性 siRNA 浓度应相同。
- 对于同一靶基因, 可设计多对 siRNA 以解决 off-target 难题。

11. 常见问题与改善建议

常见问题	可能原因	改善建议
转染效率低	细胞代次高、状态差、密度不当; 血清/抗生素干扰; 复合物形成不好; 转染试剂不适配	用低代次、对数期、无支原体细胞; 贴壁细胞转染时约 40-60% 汇合; 转染前不加抗生素; 用无血清培养基稀释 siRNA 和试剂, 室温孵育 15-20 min; 按说明书优化 siRNA:试剂比例; 难转细胞改用电转/核转
细胞毒性大、死亡多	siRNA 或试剂浓度过高; 复合物暴露太久; 细胞密度太低; 试剂内毒素	降低 siRNA 终浓度, 常用 10-50 nM, 敏感细胞可试 5-20 nM; 减少转染试剂用量; 转染后 4-6 h 换新鲜完全培养基, 敏感细胞可 2-4 h 换液; 设 mock 对照; 选低毒试剂
沉默效率低	siRNA 序列无效; 靶基因表达高或蛋白半衰期长; 检测时间不对; 转染效率本身低	设计/购买 3-4 条 siRNA 筛选, 选敲低 >70% 的; mRNA 一般转染后 24-48 h 检测, 蛋白 48-96 h 检测; 必要时重复转染或使用 siRNA pool; 先用荧光标记 siRNA 确认转染效率

脱靶效应或干扰素反应	siRNA 特异性差; 浓度过高; 双链结构或序列激活免疫反应	BLAST 检查特异性; 使用最低有效浓度; 选择化学修饰 siRNA (如 2'-OMe、2'-F); 设 scramble siRNA 对照
重复性差	细胞代次、密度、血清批次、操作时间不一致	固定细胞传代次数和铺板密度; 同批血清和试剂; 统一复合物孵育时间; 每次设复孔并记录条件
悬浮细胞、原代细胞、干细胞难转	脂质体递送效率低, 细胞敏感	优先考虑电转/核转、病毒载体或专用试剂; 优化电转参数; 电转后使用恢复培养基; 原代细胞可先包被促进贴壁
荧光信号弱	荧光 siRNA 降解、淬灭、观察时间不对	用荧光标记对照 siRNA 判断转染效率; 一般 6-24 h 观察; 避光操作; 使用抗淬灭封片剂
细胞污染影响结果	支原体污染、细菌/真菌污染	定期检测支原体; 污染细胞丢弃; 所有试剂无菌、无 RNase