

siRNA 产品使用说明书

常规化学合成 siRNA 为 21~23nt 的双链小分子 RNA，产品为冻干粉形式的即用型试剂。

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。使用前瞬时离心，用 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O 配制成 20 μM 储存液，分装保存，避免反复冻融(建议不超过 5 次)。

表 1 20 μM 储存液的配置方法

siRNA (nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积 (μL)	125	250	500	2500

注:1OD duplex=2.5 nmols=40 ug

使用须知:

- (1) siRNA 呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先离心，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O 后盖上管盖，震荡溶解。
- (2) 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。

细胞实验方法:

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，我们建议：

- (1) 转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；
- (2) 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

1.转染浓度

(1)为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染 siRNA 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 Lipofectamine™ 2000 的浓度，并在 20-100nM 范围内改变 siRNA 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 可能具有细胞系依赖性。

(2)在 30-50%细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72h 进行。低



密度转染细胞可以使转染和分析之间的间隙更长,从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。

(3)不要在转染时的培养基中加入抗生素,因为这会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。

(4)为了获得更好的结果,可以使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释 Lipofectamine™ 2000 和 siRNA。可以使用荧光标记的 siRNA 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,可以在每一次实验都包括荧光标记 siRNA,作为转染效率的指示剂。

2.转染步骤

以 Lipofectamine™ 2000 转染 siRNA 于 24 孔板,转染浓度为 50nM 为例,其他规格容器转染请参考 2。

(1)接种细胞

贴壁细胞:转染前 24, 在 400 μ L 无抗培养基中接种 0.5-2 \times 10⁵ 个细胞,转染时细胞融合度为 30-50%。(注:铺板时要将细胞消化完全混匀,避免细胞堆积生长。)

悬浮细胞:转染前 24h, 在 400 μ L 无抗培养基中接种 0.5-2 \times 10⁵ 个细胞,转染时细胞数量应在 4- 8 \times 10⁵ 孔。

(2)转染步骤

A.用 50 μ L Opti-MEM 稀释 siRNA(转染细胞的终浓度为 50nM)、轻轻吹吸 3-5 次混匀。

B.轻轻颠倒混匀转染试剂,用 50mL Opti+MEM 稀释 10 μ L Lipofectamine™ 2000,轻轻吹吸 3-5 次混匀,室温下静置 5min。

C.混合转染试剂和 siRNA 稀释液,轻轻吹吸 3-5 次混匀,室温下静置 5 min。

D.转染复合物加入到 24 孔细胞板中,100 μ L/孔,前后轻摇细胞板混合均匀。

E.细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 18-48h,转染 4-6h 后可换新鲜培养基表。

仅供科研用途,不可用于临床诊断!