



GenePharma

THE RNAi COMPANY

RNAi 产品使用手册

上海吉玛制药技术有限公司

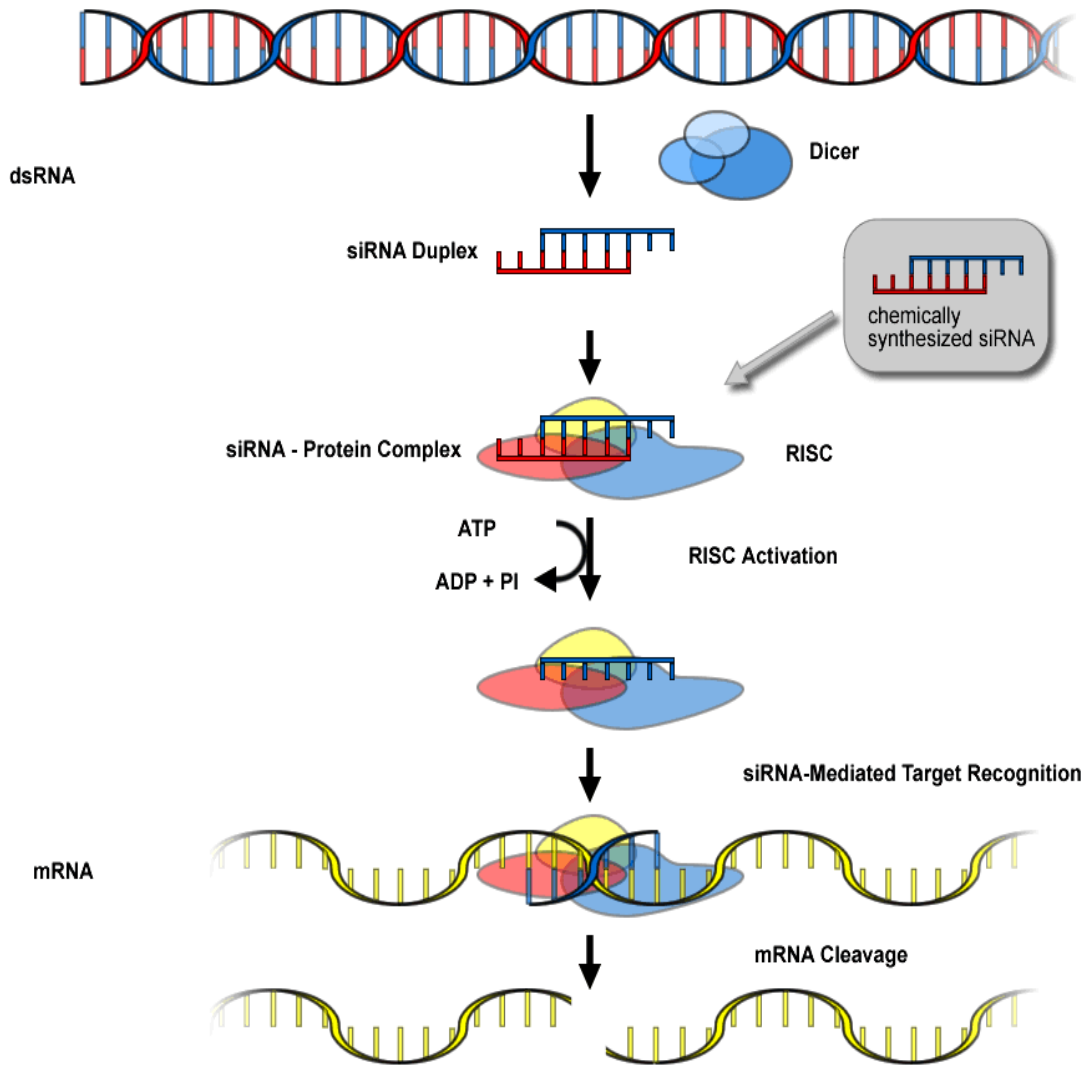
Shanghai GenePharma Co.,Ltd.

I. RNAi 简介	1
A. RNAi 实验原理	
B. RNAi 实验流程	
C. RNAi 实验所需试剂	
D. 上海吉玛 RNAi 相关产品	
II. siRNA 设计	7
A. 哺乳动物 siRNA 设计	
B. 上海吉玛 siRNA 产品特性	
C. siRNA oligo 技术数据	
III. siRNA 对照	9
A. 普通阴性对照	
B. 荧光标记的阴性对照	
C. siRNA 阳性对照	
D. 转染试剂对照	
E. 避免 off-target 对照	
IV. siRNA 转染	10
A. siRNA 转染的方法	
B. RNAi-Mate 转染试剂	
C. RNAi-Mate 适用的细胞类型	
D. 转染前细胞培养	
E. RNAi-Mate: siRNA/DNA 比例	
F. 贴壁细胞转染程序	
G. 悬浮细胞 siRNA 转染程序	
H. DNA 和 siRNA 共转染细胞程序	
I. 体内 siRNA 导入方法	
J. siRNA 转染常见问题与建议	
V. mRNA 水平 RNAi 效果监测	15
A. siRNA 细胞转染条件优化	
B. Real-Time PCR RNAi 效果检测	
C. Real-Time PCR 结果分析	
VI. 蛋白质水平 RNAi 效果监测	20
A. western-blot 原理	
B. western-blot 操作步骤	
C. western-blot 上样液的制备	
D. western-blot 常用试剂的配制	
VII. RNAi 实验常见问题解答	22

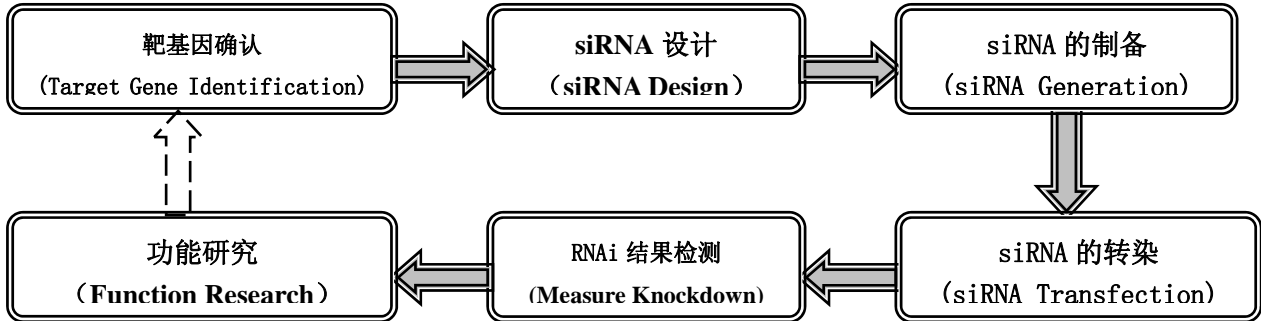
I. RNAi 简介

A. RNAi 实验原理

RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 现象是由与靶基因序列同源的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 引发的广泛存在于生物体内的序列特异性基因转录后的沉默过程。细胞中的核糖核酸酶 III 家族成员之一的, dsRNA 特异性的核酸酶 Dicer 将 dsRNA 裂解成由 21-25 个核苷酸组成的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 随后 siRNA 作为介导子引起特异地降解相同序列的 mRNA, 从而阻断相应基因表达的转录后基因沉默机制。



B. RNAi 实验流程



C. RNAi 实验所需试剂

试剂种类	试剂用途
siRNA oligo	与您所要敲除靶基因的转录本 (mRNA) 完全互补
转染试剂	如脂质体法, lipofectamin2000(invitrogen), 上海吉玛的转染试剂 RNAi-Mate, 电穿孔法等
实验对照	包括阴性和阳性及 Mocking control
基因表达的检测方法	如 mRNA 水平检测用 qRT-PCR; 蛋白表达水平检测用 western blot

D. 上海吉玛 RNAi 相关产品

siRNA oligo	普通 siRNA Oligo	上海吉玛 siRNA Oligo 是在 ISO9000 质量标准下生产并经过了反复优化和严格测试；产品质量高度稳定，以退火双链 RNA 冻干粉的产品形式提交给用户。
	化学修饰 siRNA Oligo	上海吉玛 化学修饰 siRNA Oligo 不仅增强了 siRNA 在血清、体内及细胞培养中的稳定性，同时与标准 siRNA 作用时间相比，上海吉玛 化学修饰 siRNA Oligo 的作用时间可延长一倍左右。
	荧光标记 siRNA Oligo	荧光标记 siRNA oligo 可用荧光显微镜、流式细胞仪、激光共聚焦显微镜等观察到，可直观地观察 siRNA 转染效率，优化转染条件；荧光标记的 siRNA 还可用于 siRNA 细胞定位及双标实验（配合标记抗体）来追踪转染过程中导入了 siRNA 的细胞，将转染与靶蛋白表达结合起来。
	siRNA 阴性对照	上海吉玛 RNAi negative control 与哺乳动物基因无同源性，作为实验的阴性对照，同时通过标记荧光，可以方便地在荧光显微镜下观察转染的效率，有利于优化转染条件。荧光容易拍摄，它有很好的 pH 耐受性，因而在活细胞中更稳定。
	siRNA 阳性对照	上海吉玛 RNAi positive control 用于确定实验中转染、RNA 提取和检测方法的可靠性。上海吉玛提供的阳性对照包括 LaminA/C、GFP22、Luciferase GL2、MAPK1、Beta-Actin、Vimentin、P53、GAPDH、Cyclophilin B 等。
siRNA 转染	RNAi 转染试剂	RNAi 转染试剂 是一种基于脂质的转染试剂，专门用于转染，确保没有 RNase 活性，细胞毒性低。适用细胞广泛；可在含有抗生素的完全培养基中转染；即用型试剂，不必更换培养基，操作简便易行，重复性好，可在半小时内完成操作；介导 siRNA 高转染细胞和体内高效导入，即使在含血清培养基中也能表现高转染效率；4℃下可长期保存。
RNAi 表达载体法	shRNA 表达载体	上海吉玛 shRNA 表达载体的特点是：克隆载体具有两种形式的克隆酶切位点 BamH1 和 Bbs1，可形成非对称互补粘末端，保证插入片断的方向正确，有效避免载体自体连接；多种筛选标记确定稳定转染细胞系；GFP 报告基因帮助评价转染效率并指示 RNAi 发生位点。上海吉玛现可提供 8 种 shRNA 表达载体，详见公司总目录 C-6 页。

核酸抽提	Ezol RNA Extraction Reagent	Ezol 试剂是用于总 RNA 抽提的试剂, 适用于人类、动物、植物、细菌等组织或细胞的总 RNA 提取; 无论是小量的细胞(5×10^6)或组织(50-100mg)还是大量的细胞(10^7)或组织(>1g)都可得到出色的结果; 操作简便, 可实现 RNA 的快速抽提。
	Enzol RNA Extraction Reagent	Enzol 试剂是用于哺乳动物基因组 DNA 抽提的试剂, 适用于组织、单层或悬浮细胞的基因组 DNA 提取。通常使用本试剂, 从 20 毫克组织可以抽提到约 40 微克基因组 DNA, 从 10^6 - 10^7 Hela 细胞可以抽提到约 25 微克基因组 DNA, 是一种简单、快速、高效、经济的方法。
基因表达检测	RNAi-Startup GAPDH Control Kit	本试剂盒可以用来优化 siRNA 转染条件, 也可作为 RNAi 实验的内参使用。荧光标记的 dsRNA 可直观地观察细胞转染情况; 包含 GAPDH siRNA 阳性对照和阴性对照; 应用 Real-Time PCR 方法准确评价转染前后 GAPDH 基因的 RNAi 抑制情况; 为优化转染条件提供直观依据。
	RNAi-Startup GAPDH Basic Control Kit	荧光标记的 dsRNA 可直观地观察细胞转染情况; 包含 GAPDH siRNA 阳性对照和阴性对照; 应用 Real-Time PCR 评价转染前后 GAPDH 基因活性时, 本试剂盒适用于 Real-time PCR Core Reagent (目录号 QSG-070)。
	RNAi Gene-Knockdown Easy Kit	使用本试剂盒可以完成从“向细胞中导入 siRNA 及转染效率评价”到“实时 RT-PCR 验证 RNAi Knockdown 效果”的全部过程; 荧光标记的 dsRNA 可直观的观察细胞转染情况; 内含 GAPDH siRNA 阳性对照和阴性对照及 PCR 扩增引物和探针, 可应用定量 PCR 方法直观评价转染效率及验证 GAPDH 的 RNAi 抑制效果; 可作为 RNAi 实验的阳性和阴性对照使用。
	RNAi-Startup IFN Response Basic Control Kit	哺乳动物细胞中长链的双链 RNA (dsRNA) 能够诱导干扰素效应, 引起非特异性的转录抑制。如果您不确定您的 siRNA 序列是否会诱发非特异性的 IFN 效应, 则可用本试剂盒进行验证; 应用 Real-Time PCR 检测非特异性 IFN 效应时, 本试剂盒适用于 Real-time PCR Core Reagent (目录号 QSG-070)。
	RNAi-Startup IFN Response Control Kit	如果您不确定您的 siRNA 序列是否会诱发非特异性的 IFN 效应, 则可用本试剂盒进行 Realtime PCR 验证; 同时检测 PKR, OAS-1 和 hStat1 三个 IFN 效应基因并提供 GAPDH 管家基因对照; 检测灵敏度高, 结果直观且易于判断。
	常备的 RNAi 管家基因 Control 试剂盒	上海吉玛制备了一些常用管家基因的 RNAi 实验 Control Kits, 以方便广大科研工作者开展 RNAi 实验。详见上海吉玛产品目录荧光定量 PCR 分册 C8 页。

II. siRNA 设计

A. 哺乳动物 siRNA 设计



哺乳动物 siRNA 设计需要注意的几个方面

基因抑制的有效性很大程度上取决于目的基因序列的选择。目的序列可以随机选择也可以通过在目的基因的不同区域上测试不同的序列以决定何种序列是最有效的。

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'端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点。正义链和反义链都采用这 19 个碱基(不包括 AA 重复)来设计。
2. 避免在起始密码子或无义区域附近选择目的序列。
3. siRNA 序列的 GC 含量应为 30%-60%左右。
4. 在设计 siRNA 时不要针对 5'和 3'端的非编码区 (untranslated regions, UTRs), 原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域, 而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而影响 siRNA 的效果。
5. 将挑选的序列在公共数据库中进行比较以确保目的序列与其它基因没有同源性。
6. 将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人, 或者小鼠, 大鼠等等) 进行比较, 排除那些和其他编码序列/EST同源的序列。例如使用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)。
7. 选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA, 以找到最有效的 siRNA 序列。
8. 阴性对照: 一个完整的 siRNA 实验应该有阴性对照, 作为阴性对照的 siRNA 应该和选中的 siRNA 序列有相同的组成, 但是和 mRNA 没有明显的同源性。通常的做法是将选中的 siRNA 序列打乱, 同样需要检查它和其他基因是否具有同源性。
9. 有结果显示, UU 结尾和 dTdT 结尾的 siRNA 在效果上没有区别, 因为这个突出端无需和靶序列互补。合成 siRNA 时可直接提供以 AA 开头的 21 个碱基序列。

B. 上海吉玛 siRNA 产品特点

上海吉玛 拥有处于国际领先水平的 siRNA 化学合成的全部核心技术，包括 RNA 单体合成、普通 siRNA 合成、化学修饰 siRNA 合成、荧光标记 siRNA 合成等。siRNA oligo 合成是在 ISO9001 质量标准及严格控制的流程和条件下完成的，确保了产品质量的高度稳定。化学合成 siRNA 有操作简便、转染效率高、对细胞的或者组织的毒副作用小、可大规模制备等优点，特别适用于基因靶位点不确定情况下，进行 siRNA 有效片段的筛选。化学修饰的 siRNA Oligo 不仅增强了 siRNA 在血清、体内及细胞培养中的稳定性，同时也延长了 siRNA 的作用时间。

上海吉玛 siRNA 产品特点	
质量控制	siRNA oligo 合成是严格控制的流程和条件下完成的；在 ISO9000 质量标准下生产；产品经过分光光度计精确定量。
纯化	HPLC 纯化；全长双链 siRNA 含量>97%
标记和修饰	在 3' 和 5' 末端标记生物素、荧光素和磷酸等更加方便监测 siRNA 的抑制特异基因表达的效果
长度	19~23 碱基/链
储存和稳定性	建议在 -20° C 的环境中存贮，避免多次冷冻和化冻处理。上海吉玛保证在上述条件下寡核苷酸的稳定性可达到 6 个月，荧光标记的 RNA 必须避光保存。
技术数据表	技术数据表与 siRNA oligo 一同交付，包括名称、序列、浓度、OD 和 nmols 的精确数量、纯化类型。
个性服务	按照客户要求分装；免费设计服务。

C. siRNA oligo 技术数据



与 siRNA 相关的一些技术数据及注意事项

1. siRNA 的平均分子量 13,300。
2. siRNA oligo 的 OD、nmol 和质量间有相应的公式可以计算；一般情况下，对于一个 21 bp 的 siRNA oligo，有如下简单关系： $1 \text{ OD duplex} = 3.0 \text{ nmols} = 40 \text{ ug}$
3. 1 OD 的 siRNA 欲溶解为 20 uM 的样品，可用 150 uL DEPC H₂O 去重悬 1 OD 的 siRNA，溶解后为 20 uM 的样品。
4. 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，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。
5. 荧光标记的 RNA，如 FAM、HEX、TAMRA 等标记的 Oligo 因为对光敏感，必须避光保存。

III. siRNA 对照

A. 普通阴性对照

上海吉玛可提供与目的基因序列无同源性的通用阴性对照和将选中的 siRNA 序列打乱 (scrambled) 的普通阴性对照。

1. siRNA 实验应该有阴性对照;
2. 通用阴性对照为与目的基因的序列无同源性的普通阴性对照;
3. Scrambled 阴性对照和选中的 siRNA 序列有相同的组成,但是和 mRNA 没有明显的同源性;
4. 阴性对照需要确定和目的靶细胞中其它基因没有同源性。

B. 荧光标记阴性对照

上海吉玛可提供与目的基因序列无同源性的荧光标记 (6-FAM) 通用阴性对照。

1. 上海吉玛 RNAi negative control 与哺乳动物基因无同源性;
2. 通过标记荧光, 可以方便地在荧光显微镜下观察转染情况;
3. 可用于优化转染条件和评价转染效率;
4. 具备很好的 pH 耐受性, 在活细胞中更稳定。

C. siRNA 阳性对照

阳性对照作为一个实验系统检查是很重要的。您可以利用阳性对照来确认 RNAi 实验中转染、RNA 提取和基因表达检测方法是可靠的。

上海吉玛可提供的 siRNA 阳性对照	
1	LaminA/C
2	GFP22
3	Luciferase GL2
4	MAPK1
5	Beta-Actin
6	Vimentin
7	P53
8	GAPDH
9	Cyclophilin B

D. 转染试剂对照



对于一个完善的对照系统, 转染试剂对照(Mock transfection)是不可缺的。转染试剂对照可以检测转染试剂对细胞的毒性、细胞的成活率等细胞转染的各个因素影响。

E. 避免 Off-target 对照

对于 RNAi 研究来说, 在哺乳动物中, off-target 效应是一个十分关注的问题。有大量的报道, 一个 siRNA 影响多个基因的表达。因此, 大量研究关注于用针对同一个基因的不同区域的多个 siRNA 进行实验, 然后分析各自对基因表达效果的影响。理想的结果是针对不同区域的 siRNA 对同一个靶基因产生相似的干扰效果。上海吉玛公司的技术人员为您针对同一个靶基因设计多对 siRNA oligos, 为您解决 off-target 的难题。

IV. siRNA 转染

A. siRNA 转染的方法



哺乳动物转染的常见方法有：磷酸钙共沉淀、电穿孔法、DEAE-葡聚糖和 polybrene、机械法（例如，显微注射和基因枪）、阳离子脂质体试剂，其中阳离子脂质体试剂转染法是目前最常用的转染方法。

应用脂质体型转染试剂进行转染需要注重的几个方面：

1. 转染试剂的用量
2. siRNA 的用量
3. 转染时的细胞密度
4. 转染时的操作顺序
5. 细胞与转染试剂/siRNA 复合物的温浴的时间

B. Lipofectamin2000 转染试剂

选择最适合的转染试剂和转染条件，往往取决于不同的哺乳动物细胞类型和不同的核酸分子。Lipofectamin2000 适用于核酸的体内和体外操作，可应用于 DNA、RNA、反义寡核苷酸、siRNA 的转染，也可应用于 DNA/siRNA 的共转染操作；是一种新型的高效 siRNA 转染试剂。

Lipofectamin2000 的应用领域：

- 原代培养细胞和转化细胞株的基因转染
- siRNA 高通量转染试验
- DNA 转染：DNA 和 siRNA 的共转染
- 核酸（siRNA、DNA、RNA）的体内导入试验
- 贴壁细胞和悬浮细胞转染

Lipofectamin2000 的特点：

- 不必更换培养基，操作简便易行，可在半小时内完成操作
- 在含血清培养基中也能表现高转染效率
- 细胞毒性低；适用细胞广泛
- 即用型试剂，可在含有抗生素的完全培养基中转染
- 基于脂质的转染试剂，确保没有 RNase 活性
- 可介导 siRNA 高转染细胞及体内 siRNA 的高效导入

C. Lipofectamin2000 适用的细胞类型

Lipofectamin2000 转染试剂可广泛应用于多种细胞系的 DNA 和 siRNA 转染如：HeLa (人颈部癌细胞)、MCF-7 (人乳房癌细胞)、Hep3B (人肝细胞癌细胞)、COS-7 (猴肾细胞)、Neuro-2a (鼠神经母细胞瘤细胞)、NIKS (人角质化细胞)、B16 (鼠黑色素瘤细胞)、DLD-1 (人结肠癌细胞)、NIH/3T3 (鼠胚胎成纤维细胞)、HT-29 (人结肠腺癌细胞)、A549 (人肺癌细胞)、CHO-k1 (仓鼠卵巢细胞) 和 293 (腺病毒 5 DNA 转化的人胚胎肾细胞)、SVRbag4 细胞等。

D. 转染前细胞培养



在细胞板上培养细胞时，应使细胞汇合在 24 小时内达到 70-90%。

细胞培养用品	表面积 (mm ² /孔)	细胞密度	培养基 (μL /孔)
96孔板	50	1.5×10^4 - 5.0×10^4	100 μL
48孔板	100	3.0×10^4 - 1.0×10^5	200 μL
24孔板	200	8.0×10^4 - 2.0×10^5	500 μL
12孔板	401	1.6×10^5 - 4.0×10^5	1.0 mL
6孔板	962	3.0×10^5 - 8.0×10^5	2.0 mL
35 mm	962	3.0×10^5 - 8.0×10^5	2.0 mL
60 mm	2827	1.0×10^6 - 2.5×10^6	6.0 mL

E. 合适的 lipofectamin2000 用量



合适的 siRNA(DNA): lipofectamin2000 比例对核酸的高效转染有重要影响; 我们推荐的 DNA: lipofectamin2000 为 1: 0.5—1: 5 (ug:ul), siRNA: lipofectamin2000 为 1: 0.01-1: 0.1 (pmol: ul) 一般情况下, 此范围内都可获得高的转染效率。

细胞培养用品	siRNA/DNA	培养基最终体积	Lipofectamin2000(siRNA/DNA)
96孔板	5pmol/0.2 μg	100 μL	0.25 μl /0.5 μl
24孔板	20pmol/0.8 μg	500 μL	1 μl /2 μl
12孔板	40 pmol /1.6 μg	1 mL	2 μl /4 μl
6孔板	100 pmol /4.0 μg	2 mL	5 μl /10 μl
35 mm	100 pmol /4.0 μg	2 mL	5 μl /10 μl
60 mm	600 pmol /8.0 μg	5 mL	10 μl /20 μl

F. 贴壁细胞转染程序



IMPORTANT

选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。siRNA(DNA)和 lipofectamin 的用量和两者的比例可在推荐范围内适当调整。

1. 转染前一天, $4-5 \times 10^4$ 细胞接种在 24 孔板上, 0.5mL 含 FBS 和抗生素的 DMEM (或 Opti-MEM, 其他培养基) 细胞培养基。
2. 选择用于初期接种的细胞数量, 应能在 24 小时内使细胞汇合达到 70-90%。
3. 在 50 μ l 的 DMEM (或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 无血清培养基加入 20pmol siRNA(或 0.8 μ g DNA), 柔和混匀;
4. 混匀 lipofectamin 试剂, 用 50 μ l 无血清的 DMEM 或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 稀释 1 μ l lipofectamin 试剂 (DNA 转染时, 则加入 2 μ l lipofectamin 试剂), 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟;
5. 将稀释好的 siRNA 和 RNAi-Mate 试剂混合; 轻柔混匀, 室温放置 20 分钟, 以便形成 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物。
6. 将 100 μ l siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中, 来回轻柔摇晃细胞培养板。
7. 细胞在 CO₂ 培养箱中 37°C 温育 24h-48h 后, 进行转染后的其它检测步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育 4-6 小时后, 除去复合物, 更换培养基。

G. 悬浮细胞转染程序

1. 转染的当天, 收集细胞离心, 用含 FBS 的培养基重悬。
2. 在 50 μ l 的 DMEM (或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 无血清的培养基加入 20pmol siRNA(或 0.8 μ g DNA), 柔和混匀;
3. 混匀 lipofectamin 试剂, 用 50 μ l 无血清的 DMEM 或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 稀释 1 μ l lipofectamin 试剂 (DNA 转染时, 则加入 2 μ l lipofectamin 试剂), 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟;
4. 将稀释好的 siRNA 和 lipofectamin 试剂混合; 轻柔混匀, 室温放置 20 分钟, 以便形成 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物。
5. 再加入 400 μ l 细胞悬浮液 (细胞数量决定于细胞类型和转染后分析测试的时间)。
6. 细胞在 CO₂ 培养箱中 37°C 温育 24h-48h 后, 进行转染后的其它检测步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育 4-6 小时后, 除去复合物, 更换培养基。

H. DNA 和 siRNA 共转染细胞

1. 在转染的前一天， $4-5 \times 10^4$ 细胞接种在 24 孔板上，0.5 mL 含 FBS 和抗生素的细胞培养基。
2. 选择用于初期接种的细胞密度，应能在 24 小时内使细胞汇合达到 70-90%。
3. 在 100 μ L 的无血清的培养基中稀释 20 pmol siRNA 和 0.2 μ g DNA，加入 2 μ l lipofectamin 试剂，充分混合，放置 20 分钟，以便形成 siRNA/ DNA/lipofectamin 复合物。
4. 将 siRNA/ DNA/lipofectamin 复合物加入培养基中，轻轻混匀。
5. 细胞在 37°C 温育 24h-48h 后，进行转染后的其它步骤。

I. siRNA 体内导入方法

1. 适量的 siRNA 或 DNA 溶于不含 RNA 酶的无菌水中，轻轻混匀，因为注射液体积有限，建议采用高浓度的 siRNA 或 DNA，一般 DNA 为 2 μ g/ μ L、siRNA 为 10 μ g/ μ L。
2. 取适量的 DNA、siRNA 或 siRNA\DNA 复合物与 lipofectamin 混合。例如，在 1#管中加入 0.5 μ L 的 DNA (1 μ g) 和 0.5 μ L 的 siRNA (5 μ g)，在 2#管中加入 0.55 μ L 的 lipofectamin (24 μ g) 和 0.45 μ L 不含 RNA 酶的无菌水中，将 1#管中的溶液加入 2#管中，在室温下温育 30 分钟，以形成 siRNA/DNA-lipofectamin 复合物。
3. 制备的 siRNA/DNA-lipofectamine 复合物可用于体内导入 siRNA、DNA 或 siRNA\DNA。

J. siRNA 转染常见问题与建议

转染效率低	建议
RNAi-Mate: siRNA(DNA)未优化	我们推荐的 DNA: lipofectamin2000 为 1: 0.5—1: 5 (ug:ul), siRNA: lipofectamin2000 为 1: 0.01-1: 0.1 (pmol: ul)
siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物浓度低	可适当提高 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物的浓度
细胞生长状态不好	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 70-90%, 并在 24 小时内完成转染。
DNA 或 siRNA 的纯度太低	使用高质量的 DNA 或 siRNA, 最好使用柱纯化的 DNA 和 HPP 级的 siRNA
稀释 DNA 或 siRNA 的培养基中含有血清	一般情况下, 血清不会明显降低 siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物的形成, 建议使用不含血清的培养基稀释 DNA 或 siRNA
实验的重复性不好	建议
细胞汇合情况不一致	使用相同数量的种细胞, 接种后的培养时间、培养条件一致
细胞传代次数太多	使用传代次数较低的细胞
细胞出现明显死亡	建议
与细胞生存相关的关键基因被关闭	重新设计实验
细胞状态欠佳	使用传代次数较低的细胞; 细胞接种后在 24 小时内达到 70-90%, 并在 24 小时内完成转染。
siRNA/RNAi-Mate (或 DNA/lipofectamin) 复合物浓度过高	siRNA/lipofectamin (或 DNA/lipofectamin) 复合物一般不会影响细胞生长, 当浓度过高时, 有时也会产生毒性。
基因表达或基因沉默效果差	建议
表达载体设计不对或 siRNA 设计不正确	重新设计
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

V. mRNA 水平RNAi效果监测

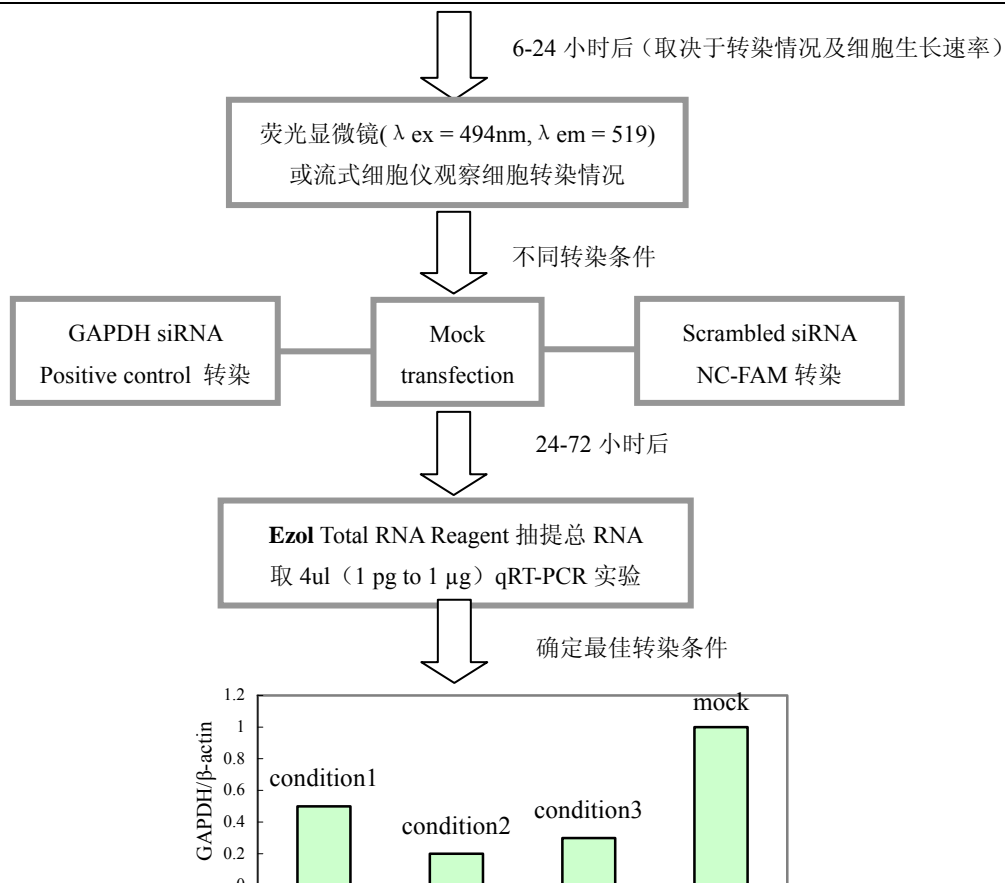
A. siRNA细胞转染条件优化



证实siRNA的作用效果和优化转染条件的最佳方法就是：特异基因的siRNA处理的细胞与阴性对照siRNA处理的细胞，通过qRT-PCR监测靶基因转录水平。

1. 细胞转染条件优化实验流程 (RNAi-Startup GAPDH Control Kit)

细胞培养	siRNA推荐量	siRNA优化范围	培养基最终体积	Lipofectamin推荐量	Lipofectamin优化范围
96孔板	5pmo	2.5-10pmol	100 μ L	0.25 μ l	0.1-0.5 μ L
24孔板	20pmol	10-40pmol	500 μ L	1 μ l	0.5-2 μ L
12孔板	40 pmol	20-80pmol	1 mL	2 μ l	1-4 μ L
6孔板	100 pmol	50-200pmol	2 mL	5 μ l	2.5-10 μ L
35 mm	100 pmol	50-200pmol	2 mL	5 μ l	2.5-10 μ L
60 mm	600 pmol	0.3-1.2nmol	5 mL	10 μ l /	5-20 μ L



2. RNAi-Startup GAPDH Control Kit 试剂盒组成

本试剂盒可完成20次siRNA转染条件的优化，也可作为RNAi实验的内参使用。荧光标记的dsRNA可直观地观察细胞转染，评估转染效率并应用Real-Time PCR方法准确评价转染前后GAPDH基因的RNAi抑制情况。

Amount	Component	Storage
500µl	Real-time PCR Master Mix (5×)	4°C
1nmol	GAPDH siRNA Positive control	-20°C
125µl	Scrambled siRNA NC-FAM (20µM)	-20°C*
60µl	GAPDH mix (10µM)	-20°C*
60µl	β-actin mix (10µM)	-20°C*
25µl	Taq DNA polymerase (5U/µl)	-20°C
1ml	1X RNA Dilution buffer	4°C

* 避光保存，避免反复冻融。

B. Real-Time PCR RNAi 效果检测

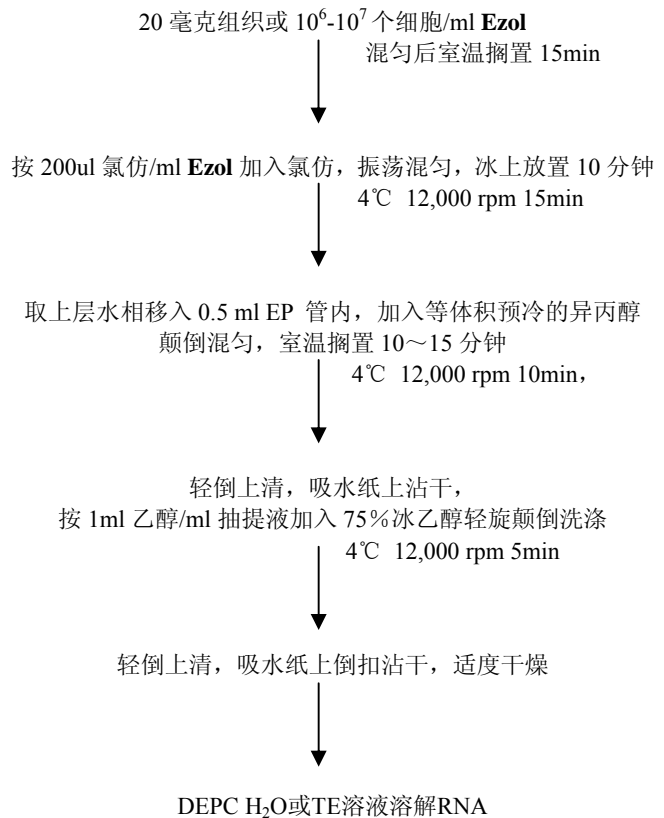
定量PCR是在传统PCR反应体系的基础上添加了具有荧光标记的探针，并通过检测PCR反应管内荧光信号的变化情况来实时监测PCR反应进行的情况。应用定量PCR检测RNAi效果只需要总RNA抽提及qRT-PCR两步。有关Real-Time PCR的原理请参阅上海吉玛 目录荧光定量PCR分册。

1. 细胞总RNA的抽提 (Ezol Total RNA Extraction Reagent)

□EZOL试剂是用于总RNA 抽提的试剂，适用于人类、动物、植物、细菌等组织或细胞的总RNA提取。样本经EZOL 充分裂解后加入氯仿离心，形成上层、中间层和有机层，收集上层用异丙醇沉淀RNA。

□产品特点

可获得高纯度、高产率的 RNA。
适用于多种细胞或组织总 RNA 的提取。
无论是小量的细胞 (5×10^6) 或组织 (50-100mg) 还是大量的细胞 (10^7) 或组织 (>1g) 都可得到出色的结果。
操作简便，可实现RNA的快速抽提。



2. RT 反应获得 cDNA



RT 反应混合物的配置过程应在冰上完成；各试剂使用前最好振荡混匀。

表. RT反应体系组成

Amount per reaction	Component
5 μ l	5 \times RT-Buffer
0.75 μ l	10mM dNTP
3 μ l	25mM Mg ²⁺
0.125 μ l	Oligo dT ₁₅ (50 μ M)
— μ l (10~25ng)	RNA 提取物
0.25 μ l	RNAsin (40U/ul)
0.5 μ l	M-MLV (200U/ul)
To 25 μ l 总体积	RNase Free H ₂ O

* RT-PCR 试剂盒 (QPG-090) 请见上海吉玛 产品目录荧光定量 PCR 分册 F9 页。



对于疑存在二级结构的 RNA 模板，可提高 RT 温度至 42°C。

- 37°C 孵育30分钟，进行RT反应；
- 85°C 10分钟灭活逆转录酶；
- 如RT产物不及时使用，请于-20°C保存；

3. Real-Time PCR 反应

Per rxn	Component
8 μ l	5 \times PCR Master Mix (内含 PCR 引物，荧光探针等)
4 μ l	RT 产物
0.4 μ l	Taq DNA polymerase (5U/ μ l)
To 40 μ l	dd H ₂ O

* Custom Real-Time PCR Gene Detection Assay (QPG-010) 请见上海吉玛 产品目录荧光定量 PCR 分册 F4 页。



IMPORTANT

使用 TaqMan 探针或 SYBR Green I 检测时，荧光信号采集在 PCR 的延伸阶段；使用 Beacon 探针检测时，应在 PCR 退火阶段采集荧光。

Real-Time PCR 反应条件：

94_°C for 2 min , 94_°C for 20 s , 60°C 30 s 40 cycles

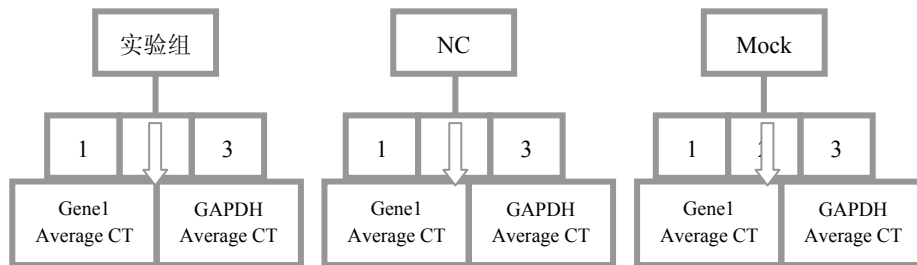
C. Real-Time PCR 结果分析

对于 RNAi 实验而言，我们通常要知道的是某一特定细胞在导入 siRNA 前后某一特定基因的表达变化情况来判断 siRNA 起到了 Gene Knockdown 作用。应用荧光定量 PCR 的方法，可以通过两种途径来实现上述判断，一是测定特定细胞在导入 siRNA 前后某一特定基因 mRNA 数量的变化，即为绝对定量；二是通过检测特定基因与某一管家基因在导入 siRNA 前后相对表达情况的变化，即为相对定量。通常采用相对定量的方法来检测 siRNA 的 Gene Knockdown 作用。

1. Real-Time PCR 实验设计



Real-Time PCR 实验设计时应包括实验组（导入 siRNA），阴性对照（Negative Control）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。下例中以 GAPDH 为管家基因。

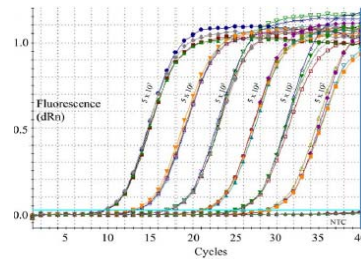


2. Real-Time PCR 得到 siRNA 导入前后目标基因和管家基因的 Ct 值



IMPORTANT

各组重复实验的 Ct 值差异不能过大；一般地，重复实验 Ct 值差异在 1 以内是可以接受的。



实验组		阴性对照 (NC)		Mock Transfection	
Target Gene	GAPDH	Target Gene	GAPDH	Target Gene	GAPDH
30.40	23.63	24.21	22.66	26.21	24.60
30.35	23.40	24.60	22.56	26.15	24.31
30.41	23.52	24.66	22.48	26.35	24.72

3. Real-Time PCR 数据分析



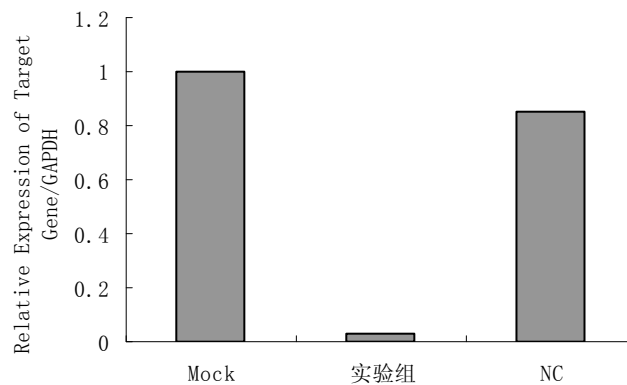
以 *Mock Transfection* 为对照 (Calibrator), 管家基因为 *Normalizer*, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照}}$

	Target Gene Average Ct	GAPDH Average Ct	ΔCt Target Gene-GAPDH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct_{\text{Mock}}$	Target Gene Rel. to Mock
Mock	26.24 ± 0.10	24.54 ± 0.21	1.7 ± 0.21	0.00 ± 0.21	1.0(1.16-0.86)
实验组	30.39 ± 0.09* ¹	23.51 ± 0.15* ²	6.88 ± 0.17* ³	5.18 ± 0.17	0.027(0.024-0.031)
NC	24.49 ± 0.24	22.56 ± 0.09	1.93 ± 0.25	0.23 ± 0.25	0.85(0.71-1.01)

注: *1 为同一样本重复实验的 Ct 值的标准偏差, 可用 Excel 计算得到:

*2 计算公式为 $s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$, 例如 $\sqrt{(0.15)^2 + (0.09)^2} = 0.17$

*3 计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct + S}$ 和 $2^{-\Delta\Delta Ct - S}$, S 为 $\Delta\Delta Ct$ 的标准偏差, 例如 $2^{-(-2.5+0.10)} = 5.3$



VI. 蛋白质水平 RNAi 效果监测

A. western-blot 原理



Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳, 被检测物是蛋白质, “探针”是抗体, “显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品, 转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)上, 固相载体以非共价键形式吸附蛋白质, 且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原, 与对应的抗体起免疫反应, 再与酶或同位素标记的第二抗体起反应, 经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

Western 免疫印迹 (Western Blot) 是将蛋白质转移到硝酸纤维素薄膜上, 然后利用抗体进行检测。

western 显色的方法主要有:

1. 放射自显影
2. 底物化学发光 ECL
3. 底物荧光 ECF
4. 底物 DAB 呈色

现常用的有底物化学发光 ECL 和底物 DAB 呈色, 操作也比较简单, 原理如下(二抗用 HRP 标记): 反应底物为过氧化物+鲁米诺, 如遇到 HRP 即发光并使胶片曝光。

B. western-blot 操作步骤

1. 在使用之前将浸湿的 Whatman 3M 滤纸放于电极之间, 放置 10min。
2. 变性的细胞裂解液上样, 20ug/道, 80V, 1hr; 100v, 4hr。
3. 取下凝胶, 用双蒸水洗后转入电转液, (39 mM glycine, 48 mM Tris-Cl, 0.037 % SDS, 20 % methanol)中浸泡。
4. 剪 6 张与凝胶大小一致的 Whatman 3M 滤纸和 1 张硝酸纤维素膜, 在电转液中浸泡 5 min。
5. 用 Bio-Rad 半干式电转移装置, 由下至上依次放置 3 层 3M 滤纸、硝酸纤维素膜、凝胶、3 层 3M 滤纸, 赶走各层之间气泡, 按 $0.65\text{mA}/\text{cm}^2$ 接通电流, 转移 2hr。
6. 转移结束后, 取出 NC 膜, 用 1xPonceau S 染色 2 min, 稍漂洗后, 标出 Marker 所在的位置, 观察蛋白转移效果。
7. 将 NC 膜放入用 1XTBST 缓冲液(150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl pH 7.6, 0.05Triton X-100)配制的 0.5% dry milk 中封闭 2hr, RT。
8. 加入抗一抗, 室温杂交 3 hr; 1 X TBST 洗膜 3 X 10min。
9. 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温作用 2hr。
10. 1 X TBST 洗膜 3X10min。加入 ECL 化学荧光试剂 A, B 各 0.5 ml 混匀, 润透 NC 膜后室温作用 1 min。
11. 暗室中将膜迅速封入保鲜膜中 X-ray film 压片放射自显影 5 min。
12. 置于显影液中 15—30 sec, 定影液中 1.5 min, 清水冲洗晾干。

C. western-blot 上样液的制备:

1. 细胞用生理盐水洗涤两次, 每孔加入 100uL 双去污剂细胞裂解液, 置 4℃, 30min。
2. Eppendorf 管置冰上, 超声破碎细胞。
3. 12000g, 4℃离心 10min。
4. 上清入新管, 取 3uL 细胞裂解液, 稀释 10 倍, 用 BCA 试剂盒测定细胞蛋白浓度。
5. 加入 2xLammilline 溶液, 100℃, 5min, 随后置于冰上冷却 5min。
6. 放置 -80℃待用。

D. western-blot 常用试剂的配制:

- 1、丙烯酰胺和 N, N'-亚甲双丙烯酰胺, 应以温热(以利于溶解双丙烯酰胺)的去离子水配制含有 29%(w/v)丙烯酰胺和 1%(w/v)N, N'-亚甲双丙烯酰胺储存液丙稀酰胺 29g, N, N'-亚甲叉双丙稀酰胺 1g, 加 H₂O 至 100ml。)储于棕色瓶, 4℃避光保存。严格核实 PH 不得超过 7.0, 因可以发生脱氨基反应是光催化或碱催化的。使用期不得超过两个月, 隔几个月须重新配制。如有沉淀, 可以过滤。
- 2、十二烷基硫酸钠 SDS 溶液:10%(w/v)0.1gSDS, 1mlH₂O 去离子水配制, 室温保存。
- 3、分离胶缓冲液:1.5mmol/LTris-HCl (pH8.8):18.15gTris 和 48ml1mol/LHCl 混合, 加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。
- 4、浓缩胶缓冲液:0.5mmol/LTris-HCL(pH6.8):6.05gTris 溶于 40mlH₂O 中, 用约 48ml 1mol/L HCL 调至 pH6.8 加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。这两种缓冲液必须使用 Tris 碱制备, 再用 HCL 调节 PH 值, 而不用 Tris.CL。
- 5、TEMED 原溶液 N, N, N',N'四甲基乙二胺催化过硫酸铵形成自由基而加速两种丙稀酰胺的聚合。PH 太低时, 聚合反应受到抑制。10%(w/v)过硫酸铵溶液。提供两种丙稀酰胺聚合所必须的自由基。去离子水配制数 ml, 临用前配制。
- 6、SDS-PAGE 加样缓冲液:pH6.8 0.5mol/L Tris 缓冲液 8ml, 甘油 6.4ml, 10%SDS 12.8ml, 巯基乙醇 3.2ml, 0.05%溴酚蓝 1.6ml, H₂O 32ml 混匀备用。按 1:1 或 1:2 比例与蛋白质样品混合, 在沸水终煮 3min 混匀后再上样, 一般为 20-25ul, 总蛋白量 100μg。
- 7、Tris-甘氨酸电泳缓冲液:30.3gTris, 188g 甘氨酸, 10gSDS, 用蒸馏水溶解至 1000ml, 得 0.25mol/L Tris-1.92mol/L 甘氨酸电极缓冲液。临用前稀释 10 倍。
- 8、转移缓冲液: 配制 1L 转移缓冲液, 需称取 2.9g 甘氨酸、5.8gTris 碱、0.37g SDS, 并加入 200ml 甲醇, 加水至总量 1L。
- 9、丽春红染液储存液: 丽春红 S 2g, 三氯乙酸 30g, 磺基水杨酸 30g, 加水至 100ml。用时上述储存液稀释 10 倍即成丽春红 S 使用液, 使用后应予以废弃。
- 10、脱脂奶粉 5%(w/v)。
- 11、NaN₃ 0.02% 叠氮钠(有毒, 戴手套操作), 溶于磷酸缓冲盐溶液(PBS)。
- 12、Tris 缓冲盐溶液(TBS):20mmol/LTris/HCL(pH7.5), 500mmol/LNaCl。
- 13、过氧化物酶标记的第二抗体。
- 14、100mmol/LTris-HCL(pH9.5)。
- 15、100mmol/L NaCl。
- 16、50mmol/LTris-HCL(pH7.5), 5mmol/L EDTA。

VII. 常见问题解答 (FAQ)

吉玛公司提供的 siRNA 是双链的还是单链的?

吉玛公司的 siRNA 是双链的,而且也是按照双链来定价的。

我们需要提供什么信息用于 siRNA 的合成? 你们可以帮助免费设计吗?

您需要准确地提供 siRNA 的 19 个核苷酸的靶序列和悬垂的合成物, 或者您也可以提供相应地基因的 GeneID 或者 Accession Number, 由我们公司技术人员为您免费设计。

如何选择 siRNA 的悬垂组成?

悬垂的序列组成是由顾客自行选择的。最近研究表明悬垂的组成在 mRNA 靶识别和酶解中不是很重要。悬垂可能在形成 RISC 的过程中起结构的作用。很多研究人员选择 dTdT 是因为研究表明脱氧核糖核苷能保护 siRNA 免受酶解。合成序列最重要的是确定靶 mRNA 的 19 个碱基的核心结构。

针对人体基因设计的 siRNA 对其他物种是否也有效?

一般 siRNA 都具有物种特异性, 很少与其他物种有相同的靶位点, 所以针对人体基因设计的 siRNA 不会沉默其他物种的同源序列。然而, 也有研究表明 siRNA 经过特异性设计后能对两个或两个以上的物种有效, 这需要仔细进行 siRNA 设计和生物信息学分析。

你们提供的 siRNA 是怎样装运的? 如果在常温下放置了一个星期, 还有效吗?

吉玛公司为您提供的 siRNA 是冻干粉包装的, 在常温下运输。这些冻干的样品在室温下能稳定保存 2-4 个星期, 所以放置一个星期不会影响其沉默效果。但我们建议您收到样品后最好保存于 -20°C 或 -70°C 有霜冷冻箱中。

在体外实验中, 需要多少量的 siRNA?

我们建议您用于实验的 siRNA 的浓度为 100nM。1nmol siRNA 的量对于一个 24 孔板或是 96 孔板的实验已经足够了。

用 100nM 的 siRNA 转染时只得到 50% 沉默效率, 我可以把 siRNA 的浓度增加到 200nM 甚至 400nM 吗? 增加 siRNA 的浓度一般不能改进沉默效率。高浓度的 siRNA 将可能导致去靶作用和对细胞的毒性。siRNA 的高基因沉默效率来自于合理的设计, 在 100nM 甚至更低的浓度都可能有 75% 的沉默效率。另外, 低的转染效率会导致低的沉默效率, 建议您更进一步优化 siRNA 的导入条件。

定量 RNA 的公式是什么?

研究者可以用 Beer 法定量 RNA: 吸光度 (260nm) = (摩尔消光系数) * (浓度) * (路径长度, cm)。为了便于理解, 等式变为: 浓度 = (吸光度, 260nm) / [(摩尔消光系数) * (路径长度, cm)]。当使用一个标准的 10mm 比色皿时, 在公式中路径长度这个变量等于 1。

6uL 浓度为 10uM 的 siRNA 溶解液中含有多少 ug 的 siRNA?

首先计算含有多少 nmol 的 siRNA: a. 等式: ? nmol = (6 uL)(10 umol/L); b. 单位换算: ? nmol = (6 uL)(10 umol/L)(1 L/1,000,000 uL)(1,000 nmol/umol); c. 答案: ? nmol = 0.06 nmol。然后利用 siRNA 的平均分子量 (13,300 g/mol) 把 nmol 变为 ug: a. 等式: ? ug = (0.06 nmol)(13,300 g/mol); b. 单位换算: ? ug = (0.06nmol)(13,300 g/mol)(1mol/1,000,000,000 nmol)(1,000,000ug/g); c. 答案: ? ug = 0.798 ≈ 0.8 ug。所以 6uL 浓度为 10uM 的 siRNA 溶解液中含有 0.8ug 的 siRNA。

我需要浓度为 20uM 的样品，如何计算重悬 siRNA 缓冲液的数量？

样品浓度的计算如下： $(\text{siRNA 的量, nmol}) / (\text{重悬体积, uL}) = \text{样品浓度, umol/L}$ 。在解答前应先统一单位，确保单位可以抵消。例如：您购买了 20nmol 的 siRNA，想溶解为 50uM 的样品。可按以下方法计算重悬缓冲液体积：a. 等式： $(20 \text{ nmol}) / ? \text{ uL} = 50 \text{ umol/L}$ ；b. 解答未知量： $? \text{ uL} = (20 \text{ nmol})(1 \text{ L}/50 \text{ umol})$ ；c. 单位换算： $? \text{ uL} = (20 \text{ nmol})(1 \text{ L}/50 \text{ umol})(1 \text{ umol}/1,000 \text{ nmol})(1,000,000 \text{ uL}/1 \text{ L})$ ；d. 答案： $? \text{ uL} = 400 \text{ uL}$ 。因此，应该使用 400uL 缓冲液去重悬 20nmol 的 siRNA，溶解后为 50uM 的样品。

一定需要阴性对照吗？

是，阴性对照是 RNA 干扰实验中不可缺少的。由于在超过 200 nM 的浓度下，siRNA 有可能会产生非特异性的压力反应，在实验体系中必需设置阴性对照。它能够帮助我们确认基因表达水平的降低是否是序列特异性的 RNAi 的结果。由于 siRNA 的合成方法和工艺以及转染试剂等因素可能导致广泛的基因沉默现象。如果没有阴性对照，研究人员很可能错误地将广泛的、非特异性基因沉默当作由 RNAi 引起的基因特异性沉默。

常用的阴性对照有哪些类型？

常用的阴性对照大体分为两种，一种是使用通用阴性对照序列，该序列已经被上千篇文章使用；另一类是使用和靶基因 siRNA 打乱序列的 siRNA 作为阴性对照，这样的阴性对照和通用序列相比较，一方面合是按照定制产品价格合成的，另一方面，由于打乱序列是没有经过验证的序列，有可能会产生 off-target 现象。因此，除非有非常特殊的要求，最好使用通用序列作为阴性对照。

在阴性对照体系和实验体系中观察到同样的实验结果，这是什么原因？

这个结果充分说明了设置阴性对照的必要性。该结果表明您所观察到的表型不是序列特异性 knockdown 产生的表型，您需要降低 siRNA 的工作浓度。

为什么说阳性对照在 RNA 干扰实验中很重要？

阳性对照作为一个实验系统检查是很重要的。也就是说，当您看到 siRNA 阳性对照的预期实验结果时，您能确保在您的实验方法中您的转染、RNA 提取物和检测方法是可靠的。通常最好的阳性对照是内在的对照。

你们能提供预先合成的 siRNA 对照么？

可以。吉玛能提供许多预先合成的用于 RNA 干扰实验的对照双链。

用于对照的 siRNA 的最佳浓度是多少？

阳性对照和阴性对照的 siRNA 的浓度都应该与基因特异性的 siRNA 的浓度相同。

在 siRNA 上进行标记的最佳位点在哪里？

反义链的 5'端标记会影响 siRNA 的沉默活性，所以不推荐标记这个位点。在其他三个末端进行标记对沉默活性几乎没有影响。有研究表明正义链的 5'端标记是最有效的化学合成位点。

荧光标记的 siRNA 是不是可以作为良好的对照？如何检测荧光标记的 siRNA？

已经有为数不少的实验室研究过荧光标记的 siRNA 的荧光检测结果和 knockdown 效率之间的正相关关系。荧光标记双链是最常用的优化转染条件的方法。可以用流式细胞仪或者荧光共聚焦显微镜检测标记的 siRNA。

荧光素的最大吸收率和发射率各在哪个波段？

荧光素在 495nm 处有最大吸收率，在 520nm 处有最大发射率。

如何筛选转染试剂？

好的转染试剂有以下特点：1、对 siRNA 有较高的转染率；2、对细胞的毒性小。在 mRNA 水平检测 siRNA 导入的效果比用看家基因的 siRNA 阳性对照检测更为准确。

转染过程中发现大量细胞死亡，我应该如何处理？

如果出现细胞大量死亡，意味着您的转染条件仍然需要优化：

转染条件的优化一般包括以下几个方面：

1. 调整转染试剂的浓度；
2. 在转染后适当的时间内更换无转染试剂的培养液，
3. 调整细胞的生长状态；一般处于良好生长状态的细胞对转染试剂就有更好的耐受性；
4. 调整转染试剂和 siRNA 的比例；

如果同一管转染试剂在不同实验中对细胞的毒性有差异，一般说来应该是实验过程本身带来的差异；

如果已经做了以上几项工作，转染效率仍然得不到提高，建议您更换一种转染试剂。

如何将 siRNA 导入到细胞内？

使用什么样的转染方法，很大程度上取决于您使用的细胞系：

1. 贴壁的、易转染的细胞，我们推荐使用 RNAi-mate；
2. 悬浮的或原代的细胞，我们推荐使用电击转化方法；
3. 电击转化效率仍然很低的细胞，需要选择载体系统。

上海吉玛除提供化学合成的 siRNA 以外，还提供完整的载体系统，请参阅产品资料。

我的课题主要是研究细胞凋亡相关基因，我手上有一些新基因需要使用 RNA 干扰进行深入研究，我该如何选择对照系统？

用 RNAi 进行 pathway 研究，是 RNAi 主要应用之一。在这样的课题中，对照系统的选择尤其重要。已经发表的和已经验证的 siRNA 为 RNA 干扰研究提供了系统性对照。用 RNAi 进行细胞凋亡相关基因的研究，以往已经有众多的文献报道，可以查阅上海吉玛网站 www.上海吉玛.com。

我刚刚开始接触 RNA 干扰技术，从文献上看，不同细胞应该选用不同的转染试剂，不同的研究目的，应该使用不同的 siRNA，我的经费有限，如何有效确定我的研究体系？

在开始 RNA 干扰研究之初，需要确定以下几个方面：

使用化学合成的 siRNA 还是使用载体构建 shRNA？我们推荐您使用化学合成的方法来筛选有效的目的片段，然后把您筛选出来的目的片段插入到载体，进行抗性筛选，得到稳定表达的细胞株，再做长期研究。

反义核酸和 RNAi 有何差异？

反义核酸和 RNAi 从作用原理到使用的范围都有很大差异。这里只能做一个简单的介绍：从原理上说，反义核酸是一段与靶基因配对的单链 DNA 或类似 DNA 的片段与靶基因结合，结果阻止靶基因的转录或是翻译，以往的研究表明在反义核酸的研究中，序列的有效性和有效序列的非特异性往往有比较高的正相关性，这就在一定程度上限制了反义核酸的应用。

RNAi 的作用机理是双链的 RNA 进入细胞内，导致靶基因的切割和降解。siRNA 的序列可以选择在高度特异针对靶基因的位置，也就为 RNAi 作为药物研究提供了高效、低副作用的空间。自从 RNAi 技术问世以来，国外很多专业从事反义核酸研究的公司都纷纷转向 RNAi 研究，ISIS 是一个非常具有代表性的例子。他们认为，如果使用反义核酸可以进行的研究，以及反义核酸可以涉及的研究领域，RNAi 均可以毫不示弱的开展，并且应该会得到更加令人满意的结果。

我使用合成的双链 DNA 克隆载体，但是测序结果不正确，是 DNA 合成的问题，还是其他问题？

首先，质量良好的、并且是退火状态良好的 dsDNA 是克隆成功的关键因素。一般情况下，需要挑不止一个克隆测序（通

常是 2 个以上), 如果两个克隆的序列都是错误的, 并且错误的碱基是相同的, 那么基本可以确定是 DNA oligo 合成的问题. 如果两个克隆的不同碱基发生错误, 有可能是合成片段本身的问题, 也有可能是克隆过程造成的问题, 可以再多挑 1~2 个克隆测序确证. 大多数情况下, 两个阳性克隆中, 一般至少会有一个克隆是正确的, 这种个别碱基在个别分子中的错误是合成和克隆过程共同造成的, 但一般发生的几率较低。

我计划使用 RT-PCR 检测基因 knockdown 结果, 之前应该注意哪些问题?

我们推荐 RT-PCR 的引物应该设计在 target 位置的两侧, 而不是同侧. 目前已经知道的 siRNA 介导的基因 knockdown 机制是 RISC 先介导靶 mRNA 的切割, 切割导致靶 mRNA 的降解, 由于切割和降解可能具有不同的时间点, 因此, 设计于同侧的 PCR 引物可能导致假阴性结果或 knockdown 效率的低估。

另外, RT-PCR 结果会因为靶基因 mRNA 降解时间不同、细胞内靶基因 mRNA 丰度不同而导致假阴性结果, 特别对于丰度较高的基因, 推荐使用的检测方式包括定量 PCR、Northern 检测、western 检测等. 这些方法会更加真实的反映 RNAi 的结果。

开始体内实验前需要注意什么问题?

体内实验设计包含动物模型的选择、给药途径、剂量和给药次数等等. siRNA 使用的数量及浓度主要取决于给药靶点的性质, 诸如肿瘤的类型, 组织的类型, 靶基因表达水平, 动物模型个体大小等等, 针对不同的研究模型, 最好先查阅相关资料。

在体内研究中, 最好的给药途径是什么? 给药频率是多少?

寡核苷酸可以通过大剂量给药或使用 ALZET 微小泵持续给药. 大剂量给药时要慎重, 因为已有研究表明: 一些毒性与寡核苷酸反义链的浓度有关, 快速给药时可能会导致动物下肢瘫痪或致死, 所以给药时要注意观察. 很多已发表的论文实验是通过尾静脉给药的. 任何给药方式都需要优化, 以确保最佳的导入方式和动物的健康. 一般拿静脉注射来说, 每天注射一到两次, 连续注射一到两周。

上海吉玛合成的 siRNA 是否可以用于动物水平的实验?

上海吉玛的 siRNA 经过严格 HPLC 纯化, 已经被用户通过局部注射用于小鼠的体内实验, 并且得到满意的实验结果。

小鼠体内实验需要多少 siRNA?

迄今为止还没有明确的 siRNA 体内实验使用量的计算方式, 在实验前最好先从文献中查询是否已经有相关的文章发表. 对于常规实验, 一般使用 100 μ L 的注射体积, 浓度为 10 to 500 μ M. 原先用 antisense 的研究表明, 当剂量大于 20 mg/kg/day (416 mM) 时, 会观察到明显的毒性. 最好针对您的实验绘制剂量反应曲线。

常规情况下, 给药剂量可以以 \sim 5mg/kg/day [\sim 7.7 nmol/day or 100 mM per day] 作为优化起点. 需要注意的是, 这个剂量只是一个预实验的起点, 最后的给药剂量取决于动物模型、靶基因、靶组织和给药方式等因素。

沉默效果不理想, 应该如何处理?

最常见的影响沉默效果的两个原因是: 转染效率低和 siRNA 序列设计的效果不理想. 如果您初次使用 siRNA 或采用了新的细胞系, 并发现沉默效果不佳, 我们建议您对转染效率进行检测, 并选择优化转染条件. 如果您已经对实验转染条件进行优化但是问题依然存在, 我们建议您换用另一种转染试剂或是采用其他技术, 这也许能提高转染效率. 如果已经提高了转染效率但是沉默效果仍然未达到要求, 可能是因为 siRNA 序列设计的效果不理想。