

siRNA 产品使用手册



一、产品简介

RNA干扰 (RNAinterfering, 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 (smallinterferingRNA, siRNA), 随后 siRNA 作为介导子引起特异性地降解相同序列的 mRNA, 从而阻断相应基因表达的转录后基因沉默机制。

吉玛公司依靠国际领先的核酸化学合成技术, 严格的质量控制体系, 提供高质量的 siRNA 产品, 以及各种修饰后的 siRNA 产品。相对普通 siRNA, 修饰后的 siRNA 具有特异、稳定、高效、低毒的优势。为您提供更经济的实验方案, 更轻松的实验操作, 更完美的实验结果。

siRNA 产品常用组分

目的 siRNA: 干扰目的基因的 siRNA, 命名是基因名-物种-siRNA 位点, 比如 P53-homo-282, 表示干扰的是人的 P53, siRNA 片段是基因 282 位点开始的 19 个碱基序列。

NC: 是通用的一段无义序列, 也是众多文献使用的对照序列, 和哺乳动物都没有同源性, 适用于大鼠、小鼠、人等不同基因的研究。不同 siRNA 赠送的 NC 都是一样的, NC 是可以通用的哦。

阳性对照 GAPDH: 阳性对照是针对管家基因 GAPDH 的有确定干扰效果的 siRNA, 是检测操作步骤的——如果操作没有问题, 加了阳性对照 siRNA 后, 这个管家基因 GAPDH 的量肯定会敲除 70% 以上 (干扰 GAPDH 的内参一般选择用 β -actin)

FAM-NC: 这个是带荧光的 NC 片段, 用来确定转染效率, 摸索转染条件——用不同的条件 (根据转染试剂说明书给定用量的 0.5-3 倍) 转染 FAM-NC 后, 直接观察细胞内是否有荧光, 来判断 siRNA 有没有转染到细胞中, 方便确定最佳转染条件。优化好条件后, 再用相同的条件来转染目的 siRNA, 可以基本确定目的 RNA 转进了细胞。

DEPC 水: 经过 DEPC 处理且高温高压去 DEPC 后的无菌无酶水, 用来溶解 RNA oligo, 防止 RNA 快速降解。



二、产品信息

产品名称	siRNA
目录号	A00001-A05060
规格	2 OD - 30000 OD
纯化方式	HPLC
产品形式	干粉
贮存条件	-20°C或-80°C
保存期	6个月（-20°C或-80°C条件下）
换算关系	1 OD \approx 40 μ g \approx 2.5 nmol
注意事项	RNA产品在操作过程中易受外界因素（酶，极端pH或温度等）影响导致降解，请严格遵循RNA操作规则。溶解分装后请在-20°C或-80°C条件下小心保存，建议3个月内用完。
储备液配制	1. 低速瞬时离心（转速<4000 xg）4-5分钟，将siRNA聚集在试管底部； 2. 轻轻打开管盖，1 OD siRNA+125 μ L DEPC水，轻柔加入，缓慢吹吸多次混匀，配制20 μ M储备液。 3. 根据使用情况分装，避免反复冻融；分装使用的管子、枪头注意无酶处理 4. 密封好EP管，-80°C条件贮存，以备使用。



三、使用方法

(一) 细胞实验方法

1. 接种细胞

提前 8-16 小时将细胞接种于培养板中，使转染时的细胞处于对数生长期，细胞密度达到 50%左右。

培养器皿	每孔表面积 (cm ²)	每孔培养基的 体积 (mL)	贴壁细胞 接种密度	悬浮细胞 接种密度
96孔板	0.3	0.1	$2.5\sim 7.5\times 10^3$	$2\sim 5\times 10^4$
24孔板	2	0.5	$1.5\sim 3.5\times 10^4$	$1\sim 2.5\times 10^5$
12孔板	4	1	$3\sim 7\times 10^4$	$2\sim 5\times 10^5$
6孔板	10	2	$1\sim 2\times 10^5$	$0.4\sim 1\times 10^6$
60 mm	20	4	$3\sim 5\times 10^5$	$1\sim 2.5\times 10^6$
100 mm	60	10	$0.75\sim 1.25\times 10^6$	$2\sim 5\times 10^6$

注:

- (1) 不同细胞生长速度不同，接种数量及密度需依据细胞类型，培养时间，实验目的而定。
- (2) 为了降低由于实验操作带来的误差，保证实验结果的可重复性，建议每个样品设置 3 个复孔，或一组实验重复 3 次。
- (3) 细胞铺板时，尽量保证每孔细胞数量一致，并将细胞均匀铺于孔底。对于孔径较小不易混匀的孔板，建议先用培养基重悬并混匀细胞，再行铺板。

2. 转染细胞

siRNA 工作浓度是 30-150 nM。具体用量和操作要根据使用的转染试剂说明书来确定。建议实验前先摸索一下转染条件（在转染试剂说明书给定用量的 0.5-3 倍摸索），确定最佳转染条件后再做后续实验；

*计算依据：20 μM 的浓度情况下，1 μL 含有 20 pmol，在 1 ml 细胞培养液中加 1 μL (20 pmol)，那终浓度就是 20 pmol/mL=20 nM。加 2 μL 就是 40 nM，以此类推。



以 siRNA-mate plus 转染试剂 24 孔板为例

➤ 推荐用量

	96孔板	24孔板	12孔板	6孔板
siRNA/miRNA用量/孔	3 pmol	15 pmol	30 pmol	75 pmol
Buffer/孔	1.7 μL	8.5 μL	17 μL	42.5 μL
plus用量/孔	推荐用量1	0.3 μL	1.5 μL	3 μL
	推荐用量2	0.6 μL	3 μL	6 μL

注:

- (1) 请注意 RNA/ plus 的比例是 RNA 封装的关键因素如需增减 RNA 用量请按照推荐用量表中每孔 RNA/plus 比例 (pmol siRNA : μL plus) 进行等比例缩放。
- (2) 表格用量仅是一个孔的用量, 如果要设置复孔, 需要按复孔量进行倍比放大;
- (3) siRNA-mate plus 摸索条件的时候, 建议用 3 个条件摸索, siRNA+推荐用量 1 (常规细胞), siRNA+推荐用量 2 (较难转的细胞), 2*siRNA+推荐用量 2 (难转染的细胞)

➤ siRNA/miRNA 预混液制备

取 Buffer 8.5 μL 置于无菌无酶 EP 管中, 加入 15 pmol siRNA/miRNA (若 siRNA 原液浓度 20 μM, 取 0.75 μL), 吹打混匀, 即得 siRNA/miRNA 预混液。

注:

- (1) 请确保 siRNA 原液的溶剂为无酶水, 且浓度不低于 10 μM。
- (2) 不得使用 PBS 或培养基稀释 siRNA/miRNA 原液, 请确保稀释得到的 siRNA/miRNA 预混液浓度为 1.5 pmol/μL (1.5 μM) 左右。

➤ RNA/plus 复合物制备

向上述 EP 管中, 按每管 siRNA/miRNA 预混液加入 1.5 μL (或 3 μL) plus 转染试剂, 立即用移液枪吹打数十次进行混匀, 即得 RNA/plus 复合物。

注: RNA/plus 复合物尽快加入到细胞中。如特殊情况, 在室温条件下存放不要超过 8 小时, 请勿将 RNA/plus 复合物置于冷冻条件。

➤ 加样

将制得的 RNA/plus 复合物加至细胞中, 轻轻晃动 24 孔板使分散均匀 (前后和左右方向各晃动十多次)。放回培养箱中培养, 根据实验安排进行后续实验。

注: 培养基是完培, 可以含有双抗和血清。



3. 效果检测

ESC siRNA 转染 24~48 小时可以定量检测目的基因变化。转染完成后 48~72 小时内可进行蛋白以及功能实验检测，最佳检测时间与细胞类型及基因特性有关，推荐几种常见的 ESC siRNA 效果检测方法：

- ① 目的基因表达水平变化：qRT-PCR，基因芯片等方法。
- ② 目的蛋白质翻译水平变化：Western Blot，蛋白芯片等方法；
- ③ 细胞功能变化：细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移等；

4. 相关产品推荐：

产品编号	产品名称	产品编号	产品名称
G04026	siRNA-Mate plus 转染试剂 (100 μL)	E21001	染料法 qRT-PCR 定量试剂盒
G04008	GP-transfect-Mate 转染试剂 (100 μL)	E21002	染料法 qRT-PCR 定量试剂盒
G04029	invivo siRNA-mate 动物体内 转染试剂 (300 μL)	E23001	染料法定量和校准 qRT-PCR 试剂盒
E17002	引物套装	E23006	探针法定量和校准 qRT-PCR 试剂盒
E17003	引物探针套餐	E18001	新鲜组织和细胞总 RNA 分离 纯化试剂盒

(二) 动物实验方法

动物体内 siRNA 建议添加一些修饰，比如添加化学修饰或者硫代修饰提高稳定性，添加胆固醇修饰可以提高转染效率。siRNA 动物注射使用剂量随给药方式、siRNA 修饰方式以及递送系统的不同具有较大差异，建议根据推荐剂量结合实验目的通过预实验优化实验方案。

为避免稀释后的 siRNA 反复冻融，建议干粉溶解后一次用完（可以用生理盐水溶解）。如果不能用完，将干粉高浓度溶解（用 DEPC 水溶解）后，按照小鼠的数量和每只小鼠实际使用量进行分装冻存（使用的管子、枪头注意无酶处理），解冻后用生理盐水稀释，一次用完，不要再次冻融。

GP-ESC siRNA 是加了甲氧、氟代、硫代修饰的 siRNA，更适合在动物实验中使用。相比于普通的 siRNA，经过特殊化学修饰的 GP-ESC siRNA 具有更高的稳定性和更低的免疫原性，可以在复杂的动物体内环境中能保持更长时间的活性。作用效果可维持数周时间。



1. 相关产品比较

产品名称	功能	作用时间	递送系统	应用模型
siRNA	干扰目的基因	3-4天	需要	细胞
GP-ESC siRNA	干扰目的基因	1-2周	需要	细胞/动物
ASO	干扰目的基因	1周	需要/不需要	细胞/动物
miR-Up™ agomir	模拟高表达miRNA	2周	不需要	细胞/动物
miR-Down™ antagomir	竞争性或特异性抑制内源miRNA	2周	不需要	细胞/动物

2. 对大小鼠不同给药方式单次给药量推荐

产品	推荐给药量 (nmol)
GP-ESC siRNA	1-20
ASO	1-20
agomir	1-20
antagomir	5-200

3. 不同给药方式的给药体积

动物	颅内注射	皮下注射	眼部注射	尾静脉注射	腹腔注射	肌肉注射
小鼠	5 μ L	30-50 μ L	2-5 μ L	200 μ L	200 μ L	50-100 μ L
大鼠	5-10 μ L	50-100 μ L	2-5 μ L	200 μ L	300 μ L	100-200 μ L

(三) 动物实验方法参考

1. 系统注射给药

一般以尾静脉注射为主，适用于循环系统（免疫系统）及血流丰富的器官（如心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏）。

给药频率：

① 对于短时作用模型（作用时间<1周），建议单次高剂量注射，可以连续注射3天；

② 对于长时作用模型（作用时间>1周），建议中低剂量多次给药，每周注射2次维持作用效果。

2. 局部注射给药

适用于大脑、肌肉、皮肤、眼睛、鼻腔、耳蜗、移植瘤、生殖器等局部组织及系统给药难以到达的部位，如表皮、皮下（肿瘤）、子宫腔等。



3. 干扰效果检测

给药处理结束后，取相关组织进行 IHC、qPCR、WB 等实验检测处理效果。

(四) 动物实验案例

1. 实验案例一

Signal Transduction and Targeted Therapy (IF40.8) | Optimized RNA interference therapeutics combined with interleukin-2 mRNA for treating hepatitis B virus infection

研究模型: 采用rAAV-HBV1.3小鼠模型来评估tLNP封装siHBV (“tLNP/siHBV”)的基因沉默效率

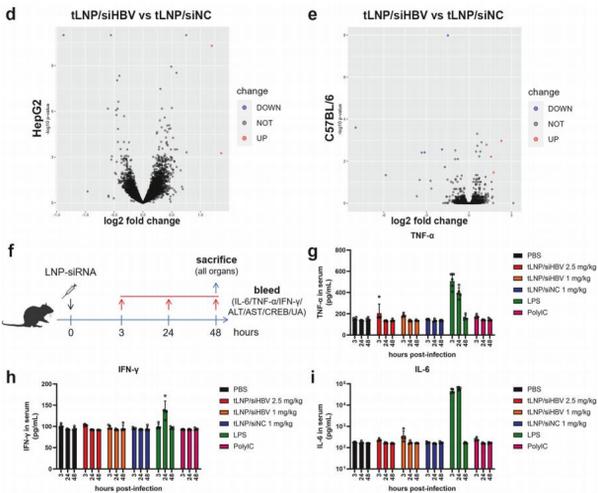
动物模型: 雄性C57BL/6小鼠接种携带HBV基因组的rAAV-HBV1.3病毒。六组小鼠(每组八只动物)，分别为1×磷酸盐缓冲液(PBS)、tLNP/siNC、tLNP/siHBV和ETV、siNC和siHBV组

给药方式: 尾静脉注射

给药剂量: 0.1、0.3和1 mg/kg(所有siRNA都经过化学修饰)

递送系统: tLNP

给药频率: 6周龄建模，8周龄注射，每周尾静脉注射1次，连续注射5周，8周后处死。实验期间每周采集血液样本进行HBsAg、HBeAg和HBV DNA分析，处死后收集肝脏标本进行组织学和分子分析。



上海电话: 021-51320195 E-mail: support@genepharma.com
苏州电话: 0512-86668828 E-mail: szsupport@genepharma.com
官网网址: www.genepharma.com



B065-V001-20240805

d Global transcriptional profiling of HepG2 cells following treatment with tLNP/siNC and tLNP/siHBV at the dose of 50 nM for 16 h. The volcano plots depicting gene expression changes between tLNP/siHBV and tLNP/siNC treated cells (n = 3). e Transcriptional dysregulation of mice liver after intravenous injection of tLNP/siHBV (1 mg/kg) or tLNP/siNC (1 mg/kg) for 48 h (n = 3). The volcano plots depicting gene expression changes between tLNP/siHBV and tLNP/siNC were shown. f Treatment and sampling schedule of toxicity study in mice. 1 mg/kg and 2.5 mg/kg doses of tLNP/siHBV formulations were intravenously injected into C57BL/6 mice. Mice that treated with PBS and 1 mg/kg of tLNP/siNC (i.v.) were utilized as negative controls, and the lipopolysaccharides (LPS) (5 mg/kg, s.c.) and polyI:C treated mice (10 mg/kg, s.c.) were included as positive controls in the assay. g Cytokine concentrations in the serum including TNF- α , (h) IFN- γ , and (i) IL-6 were determined via commercial ELISA kits at indicated time points. Data were shown as means \pm SDs (n = 5)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01871-8>

2. 实验案例二

ACS Nano (IF15.8) | Overcoming Endosomal Escape Barriers in Gene Drug Delivery Using De Novo Designed pH-Responsive Peptides

研究模型: 使用PH响应肽对基因药物的递送效率

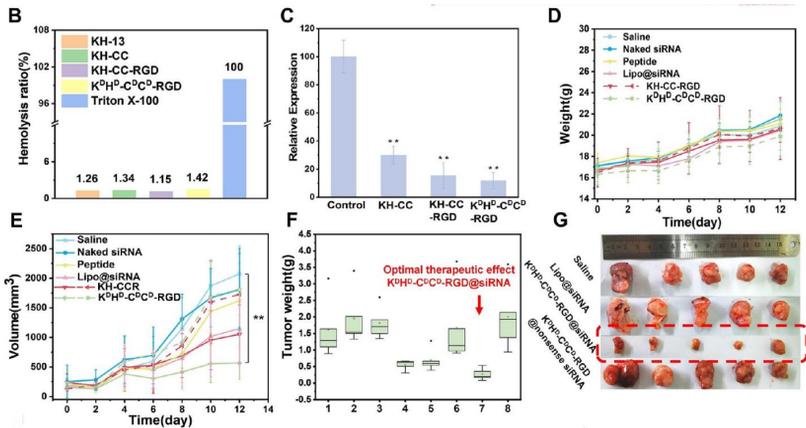
动物模型: BALB/c雌性裸小鼠(6周龄), 小鼠接受皮下注射在右侧腋窝附近接种 1×10^7 HeLa细胞。然后随机分为八组。对照组皮下注射50 μ L正常生理盐水、皮下注射裸siRNA、KDHD-CDGD-RGD peptide、Lipofectamine2000@siRNA、KH-CC-RGD@nonsense siRNA、KH-CC-RGD@nonsense siRNA、KDHD-CDGD-RGD@siRNA、KDHD-CDGD-RGD@siRNA

给药方式: 瘤内注射, 瘤体达到50–100 mm³开始注射

给药剂量: 50 μ L, siRNA浓度(0.05 μ g/ μ L)

递送系统: lipo2000、peptide

给药频率: 每2天注射一次样本, 共7次治疗, 每2天测量一次小鼠的肿瘤体积和体重。



(D) Body weight curves. The peptide group only used $K^{99}P^{99}C^{99}D^{99}$ -RGD peptide without any gene drugs, and the Lipo@siRNA group used commercially available Lipofectamine 2000. The solid line represents the peptide@siRNA group. The dashed line represents the peptide@nonsense siRNA group. (E) Tumor growth curves. ** $p < 0.01$. The peptide group only used $K^{99}P^{99}C^{99}D^{99}$ -RGD peptide without any gene drugs, and the Lipo@siRNA group used commercially available Lipofectamine 2000. The solid line represents the peptide@siRNA group. The dashed line represents the peptide@nonsense siRNA group. (F) Tumor weight measurement. The numbers 1-8 on the X-axis represent: saline, naked siRNA, $K^{99}P^{99}C^{99}D^{99}$ -RGD peptide, Lipofectamine 2000@siRNA, KH-CC-RGD@siRNA, KH-CC-RGD@nonsense siRNA, $K^{99}P^{99}C^{99}D^{99}$ -RGD@siRNA, and KDHD-CDCD-RGD@nonsense siRNA. The interquartile range IQR (black dots) was used to measure the discrete degree of the data in the box-plot. (G) Tumor images of the best treatment group and control group ex vivo.

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c02400>

附录：常用修饰方式以及作用

编号	修饰方式	5'	中间	3'	修饰作用
1	2'-OMe	√	√	√	增强抗核酸酶活性的能力，提高RNA稳定性
2	2'-F	√	√	√	
3	LNA	√	√	√	
4	Phosphorothioate	-	√	-	
5	FAM	√	-	√	具有荧光，优化各种细胞的转染条件，跟踪RNA在细胞或者动物的位置分布
6	Cy3	√	-	√	
7	Cy5	√	-	√	
8	Cholesterol	√	-	√	提高RNA稳定性以及转染效率
9	Amino	√	-	√	用于连接一些不会影响其功能的化合物，或者亲和纯化基团的连接及一些荧光标记，可以抑制外切酶酶解
10	Thiol	√	-	√	巯基可用于加附各种修饰如荧光标记物和生物素。须用DTT或TCEP将二硫键还原成巯基。
11	Biotin	√	-	√	生物素修饰的寡核苷酸能紧紧的结合在链霉亲和素上，链霉亲和素可以标记上荧光染料和酶或是附着的中间结合物附着在固体物生物表面。
12	Phosphorylation	√	-	√	磷酸化可用于接头、克隆和基因构建以及连接酶催化的连接反应
13	GalNAc	-	-	√	GalNAc与肝脏实质细胞表面的ASGPR结合后，特异性靶向肝脏



参考文献

- (1) Li, L., Liu, X., Yang, S. et al. The HEAT repeat protein HPO-27 is a lysosome fission factor. *Nature* 628, 630–638 (2024).
- (2) Liu Y, Jiang J, Du S, et al. Artemisinins ameliorate polycystic ovarian syndrome by mediating LONP1-CYP11A1 interaction[J]. *Science*, 2024, 384(6701): eadk5382.
- (3) Zai W, Yang M, Jiang K, et al. Optimized RNA interference therapeutics combined with interleukin-2 mRNA for treating hepatitis B virus infection[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 150.
- (4) Xiao J, Wang S, Chen L, et al. 25-Hydroxycholesterol regulates lysosome AMP kinase activation and metabolic reprogramming to educate immunosuppressive macrophages[J]. *Immunity*, 2024, 57(5): 1087-1104. e7.
- (5) Wang Z, Zhang J, Wang Y, et al. Overcoming Endosomal Escape Barriers in Gene Drug Delivery Using De Novo Designed pH-Responsive Peptides[J]. *ACS nano*, 2024, 18(14): 10324-10340.
- (6) Ma, H., Hu, T., Tao, W. et al. A lncRNA from an inflammatory bowel disease risk locus maintains intestinal host-commensal homeostasis. *Cell Res* 33, 372–388 (2023).
- (7) Li Y, Wang D, Ping X, et al. Local hyperthermia therapy induces browning of white fat and treats obesity[J]. *Cell*, 2022, 185(6): 949-966. e19.
- (8) Wu T, Dong J, Fu J, et al. The mechanism of acentrosomal spindle assembly in human oocytes[J]. *Science*, 2022, 378(6621): eabq7361.

