siRNA产品使用说明

RN：R10043.3

产品简介

常规化学合成siRNA为21~25nt的双链小分子RNA，即用型。

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℃~-80℃保存**，冻干粉可以稳定保存一年。

使用前瞬时离心，用**RNase-free H_2O**或灭菌**ddH_2O**配制成**20μM**储存液，分装保存，**避免反复冻融（不超过5次）**。

表1 20μM储存液的配置参考

siRNA(nmol)	0.25	0.5	1	2	5	20
溶解体积(μl)	12.5	25	50	100	250	1000

注：如需进行高通量筛选试验，可选择siRNA Library。

使用前须知

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℃~-80℃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，一般建议：

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，且细胞均匀分布。

1. 转染浓度：

siRNA产品最佳工作浓度因不同的细胞类型及研究目的而异。锐博生物推荐的siRNA初始转染浓度为50nM，转染后检测时间为24~72h。最佳转染效率一般通过设置时间曲线和浓度梯度进行优化，优化的范围建议为5~100nM。

2. 转染步骤：

以ribo*FECT*™ CP Reagent 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表2。

1）接种细胞

a. 贴壁细胞：转染前一天，接种1×10^5细胞至含有500μl完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到50~80%。

注：1）不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量需要依据经验而定；2）每孔接种的细胞数量尽量相同，使细胞均匀分布于培养基表面。

b. 悬浮细胞：

接种1×10^5~5×10^5个细胞至含有500μl完全培养基的24孔板。

2）转染步骤

对于每个转染样品，请按以下步骤准备：

a. 稀释siRNA：用50μl 1X ribo*FECT*™ CP Buffer（v1）稀释1.25μl 20μM siRNA储存液（v2），轻轻混匀，室温孵

育5min。

b. 混合液制备：加入5μl ribo*FECT*™ CP Reagent（v3），轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

注：1）请不要振荡，溶液可能会有浑浊，但不会影响转染；2）混合液可室温放置一段时间，但不宜超过24h。

c. 将ribo*FECT*™ CP混合液加入到443.75μl细胞培养基（v4）中，轻轻混匀。

注：混合液加入原细胞培养基，无需移除或更换。

d. （可选）进行其他必要的特殊处理（如加药处理）。

e. 将培养板置于适当的培养条件下培养24~96h（培养时间与实验目的相关）。

表2 使用ribo*FECT*™ CP转染siRNA用量参考

v1: ribo*FECT*™ CP Buffer (1X)； v2: 20μM siRNA储存液； v3: ribo*FECT*™ CP Reagent； v4: 细胞培养基

	siRNA终浓度	每孔终体积	1X Buffer(v1)	siRNA (v2)	Reagent(v3)	培养基(v4)
96-well	100nM	100μl	12.5μl	0.5μl	1.25μl	85.75μl
	50nM	100μl	12.5μl	0.25μl	1.25μl	86.00μl
	30nM	100μl	12.5μl	0.15μl	1.25μl	86.10μl
	20nM	100μl	12.5μl	0.1μl	1.25μl	86.15μl
	10nM	100μl	12.5μl	0.05μl	1.25μl	86.20μl
24-well	100nM	500μl	50μl	2.5μl	5μl	442.50μl
*	50nM	500μl	50μl	1.25μl	5μl	443.75μl
	30nM	500μl	50μl	0.75μl	5μl	444.25μl
	20nM	500μl	50μl	0.5μl	5μl	444.50μl
	10nM	500μl	50μl	0.25μl	5μl	444.75μl
12-well	100nM	1ml	100μl	5μl	10μl	885.00μl
	50nM	1ml	100μl	2.5μl	10μl	887.50μl
	30nM	1ml	100μl	1.5μl	10μl	888.50μl
	20nM	1ml	100μl	1μl	10μl	889.00μl
	10nM	1ml	100μl	0.5μl	10μl	889.50μl
6-well	100nM	2ml	250μl	10μl	25μl	1715.00μl
	50nM	2ml	250μl	5μl	25μl	1720.00μl
	30nM	2ml	250μl	3μl	25μl	1722.00μl
	20nM	2ml	250μl	2μl	25μl	1723.00μl
	10nM	2ml	250μl	1μl	25μl	1724.00μl

注：1）*：实验示例用量参考。2）表中数据仅供参考，对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化。

3）效果检测：

转染完成后24~72小时均可进行siRNA沉默效果检测，最佳检测时间与细胞类型，转染试剂，检测目的等相关。

1）RNA水平的检测：mRNA是检测siRNA沉默效率的最佳指标，siRNA转染后24~72h即可检测到靶基因mRNA表达明显降低，检测方法宜采用qPCR检测方法。注：引物设计质量很重要，需要确保检测引物有效性。

2）蛋白水平的检测：蛋白是RNAi沉默效率的重要指标，其检测手段主要为Western Blot等。检测时间受细胞内蛋白质表达量、半衰期等因素的影响，一般为48~96h。

3）功能筛选：应用EdU细胞增殖、EdUTP细胞凋亡等方法进行细胞功能筛选。

动物实验方法：

动物模型：根据实验需要选择合适的动物模型（表3）。

修饰方式：由于动物实验对siRNA稳定性的要求较高，尽管未修饰的siRNA也可以进行动物实验，但是以Chol，OMe，PS修饰的siRNA效果较好。

给药方式：局部给药：最直接的导入方式，siRNA的导入效率较高，用量少，siRNA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。

系统给药：一些无法通过局部给药方式到达的靶位，如内脏，器官以及一些散列分布的靶位（如淋巴细胞，转移性肿瘤细胞等），可使用系统性注射方式，具有广泛的组织分布，包括心、肝、脾、肺、肾等。

表3 动物siRNA实验使用方法参考

Reference	Animal	Tissue	Gene	Modification	Doses	Dosing Frequency	Dosing Strategy
Jin Hou, *et al.* **Cancer Cell**. 2011	Mice	Tumor	PAK4	-Chol,-OMe,-PS	1 nmol	Twice/week, 4 weeks	瘤内多点注射，10nmol siRNA稀释于20~50μl PBS
Höbel S, *et al.* **J Gene Med**. 2010	Mice		VEGF	-F,-OMe,-PS	1.3 μg	Day 0	PEI包裹100pmol siRNA
M. DiFiglia, *et al.* **PNAS**. 2007	Mice	Brain	Htt	-Chol,-OMe,-PS	1 nmol	Day 0	右纹状体注射0.5μl 1mM化学修饰siRNA
Wang H, *et al.* **J Biol Chem**. 2008	Mice		SOD1	-F,-HS	4 μg	Continuous 28 days	Alzet osmotic pump持续给药
Lewis J, *et al.* **Mol Neurodegener**. 2008	Mice		SNCA	-OMe,-PS	180 nmol	Continuous 15 days	Alzet osmotic pump持续给药（2mM siRNA的PBS）
Xiong SQ, *et al.* **Ophthalmologica**. 2009	Mice	Eye	EPO	None	5 μg	Day 0	玻璃体腔注射，1μl liposome-EPO siRNA（5μg）
Kleinman ME, *et al.* **Nature**. 2008	Mice		VEGF	-Chol,-OMe	1 μg	Day 0	腹腔注射，1μl PBS稀释化学修饰siRNA
LI Xi, *et al.* **Chinese Journal of Pathophysiology**. 2008	Rat	Liver	Fas	None	40 nmol	Day 0	注射，200nmol/kg siRNA稀释于PBS
Soutschek J, *et al.* **Nature**. 2004	Mice		apoB	-Chol,-OMe,-PS	1.25 mg	Continuous 3 days	静脉注射，50mg/kg化学修饰siRNA
Zimmermann TS, *et al.* **Nature**. 2006	Monkey		apoB	-OMe,-PS	~15mg	Day 0	静脉注射，SNALP包裹2.5mg/kg化学修饰siRNA
Tompkins SM, *et al.* **PNAS**. 2004	Mice	Breath	Influenza	None	20 μg	Day 0	滴鼻，20μg siRNA与10μl Oligofectamine配比混合
Rosas-T, *et al.* **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2009	Mice		XCL1	None	10-15 μg	Day 0	雾化吸入，10~15μg siRNA稀释于50μl PBS
Yuan H, *et al.* **Am J Physiol Renal Physiol**. 2008	Mice	Kidney	Alox15	-Chol,-OMe,-PS	400 μg	Continuous 7 weeks	静脉注射，400μg化学修饰siRNA
Gonzalez-Gonzalez E, *et al.* **Gene Ther**. 2009	Mice	Skin	CBL	None	60 μg	Continuous 12 days	脚掌皮下注射，60μg siRNA稀释于50μl PBS
Yichao Wu, *et al.* **Cell Host Microbe**. 2009	Mice		HSV-2	-Chol, -PS	2 nmol	Day 0	皮下注射，2nmol化学修饰siRNA

药物临床研究：

RNAi已经成为目前基因功能研究、药靶发现、药物开发的重要方法，针对多种疾病的RNAi药物已经相继进入临床试验阶段，初步统计大约有19个公司正在开发85种siRNA药物，主要集中在眼部、肿瘤、抗病毒、肾病、心血管、呼吸道、糖尿病等方面（表4）。

锐博生物拥有大规模GMP核酸生产车间，配备了AKTA OligoPilot 100，OligoPilot 400核酸合成仪，能够满足百克级核酸药物临床研究合成需求，采用AKTA Explorer 100纯化系统保证核酸纯化质量，应用戴安U3000钛系统高效液相色谱，离子色谱及反相色谱，Beckman毛细管电泳检测仪等多种手段进行核酸纯度鉴定，能够为您的药物临床研究提供有力保障。

表4 部分RNAi药物研发进展

	疾病	药物名称	用药方法	靶基因	试验阶段
眼部疾病	湿型老年黄斑病变 (AMD)	bevasiranib sodium	siRNA	VEGF	临床Ⅲ期
		PF-655	siRNA	VEGF	临床Ⅱ期
		PF-4523655	siRNA	VEGF	临床Ⅱ期
		AGN-211745	siRNA	VEGFR1	临床Ⅱ期
	眼部神经病变 (Ocular neuroprotection)	QPI-1007	siRNA	Caspase 2	临床Ⅰ期
肿瘤	肝癌 (Hepatic cancer)	ALN-VSP	siRNA	KSP, VEGF	临床Ⅰ期
	肿瘤 (Tumor)	CALAA-01	siRNA	RRM2	临床Ⅰ期
	实性瘤 (Solid Tumour Cancer)	TKM-PLK1	siRNA	PLK1	临床Ⅰ期
	实性瘤 (Solid Cancer)	Atu027	siRNA	PKN3	临床Ⅰ期
病毒感染	呼吸综合症 (RSV)	ALN-RSV01	siRNA	N gene	临床ⅡB期
	伊波拉病毒感染 (Ebola Virus)	TKM-Ebola	siRNA	Ebola virus	临床Ⅰ期
	乙型肝炎 (Hepatitis B)	NUC-B100	siRNA	HBV	临床Ⅰ期
肾病	急性肾损伤 (Acute Kidney Injury)	QPI-1002	siRNA	p53	临床Ⅱ期
	淀粉样变肾病 (Amyloidosis)	ALN-TTR01	siRNA	TTR	临床Ⅰ期
	先天性厚甲症 (Pachyonychia Congenita)	TD101	siRNA	Mutant K6a	临床ⅠB期

注：以上信息收集于2012年12月。如需更详尽资料，请联系support@ribobio.com。