

genOFF™ Human Genome siRNA Premix Library 使用说明

RN: R10038.3

产品简介

genOFF™ Human Genome siRNA Premix Library (以下简称文库), 覆盖人源 2 万个基因, 每个基因对应设有 1 个 siRNA Premix, 由靶向该基因的 3 对 siRNA 混合而成, 分别靶向转录本的 3 个区域, 以获取最佳的基因沉默效果。

- 采用独特的优化设计算法, 最大限度提高特异性
- 特异的化学修饰, 提高 RNA 稳定性, 降低脱靶效应
- 一次实验即可分析大批量基因, 实现大规模高通量筛选

siRNA 排布请见相应的 Gene 排布表。

运输保存

产品 **常温运输**。收到产品后, 请于 **-20℃ 以下** 低温冻存, 冻干粉可以稳定保存 1 年。

genOFF™ Human Genome siRNA Premix Library 产品以 0.5nmol **冻干粉** 的形式存储于 96 孔 PCR 板中, 每板分别设有 80 个 siRNA Premix, (如图 1), 以锡箔膜热封。

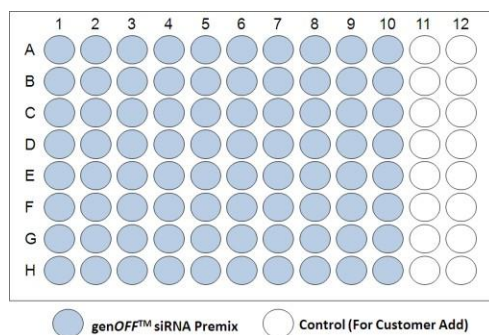


图 1. genOFF™ Human Genome siRNA Premix Library 单块 PCR 板产品排布示意图

注: 每块 96 孔板上包括 80 个靶向不同基因的 siRNA Premix 置于第 1-10 列, 而第 11 列和第 12 列为空, 可根据实验需要设置相应的阴性对照, 阳性对照, 转染对照, 空白对照或其他对照。

使用方法

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, 所有操作需严格遵循 RNA 操作规程。

使用前请先将文库储存板瞬时离心, 轻轻揭开热封铝箔膜, 每孔分别加入 100u1 **RNase-free H₂O**, 配制成 5uM 储存液, 轻轻吹打数次, 取适量 siRNA 储存液分装至培养板或高内涵筛选板。最好分装为多套板, 并以粘性铝箔膜 (Axygen: PCR-AS-200) 或 8 连管盖 (Axygen: PCR-02-CP-C) 严格密封, 以防止液体挥发, 并于 -20℃ 以下低温冻存, 避免过多反复冻融。

细胞实验方法

转染试剂是影响转染效率的关键因素, 您需要根据实验所用细胞类型, 转染方法等选择合适的转染试剂。锐博生物 **riboFECT™ CP** 转染试剂具有转染效率高, 细胞毒性小, 能够适合大多数细胞系的转染实验。以下实验步骤以 **riboFECT™ CP** 转染试剂转染 **Hela** 贴壁细胞为例, 其他转染试剂请参考相应厂商的使用说明。

1. 转染浓度

锐博生物推荐 siRNA 文库初始转染终浓度为 50nM，转染后检测时间为 48~72h。但 siRNA 最佳转染浓度因细胞类型，细胞密度，转染试剂及研究目的不同而有所差异，最佳的转染效率需要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. 转染方法

1) 反向转染

1> 单细胞悬浮液准备

转染前，制备单细胞悬浮液，加入适量培养基待用，细胞密度保持为 $0.8 \sim 2.0 \times 10^5/\text{ml}$ 。不同细胞的接种数量需根据细胞培养经验而定。

注：1) 转染时，细胞密度是影响转染效率的关键因素，细胞生长过度会削弱细胞活力，从而降低细胞的转染效率。而细胞密度过低则可能达不到生长的要求，也会影响转染效率；2) 尽量吹打成单细胞悬浮液，每孔接种的细胞数量应尽量相同；3) 单细胞悬浮液需在使用前制备，不宜过早准备。

2> 转染步骤

- siRNA 文库存储板和相关细胞培养基在使用前需先平衡至室温；
- 按 10: 1 的比例混匀适量 1X riboFECT™ CP Buffer (v2) 和 riboFECT™ CP Reagent (v4)；
- 混匀后，加至细胞培养板，每孔 11ul；
- 每孔加入 1ul 5uM 的 siRNA 储存液 (v3)，轻轻吹打混匀，室温孵育 10~15 分钟；
- 每孔加入 88ul 单细胞悬浮液 (v1)，轻轻吹打混匀。保持每孔总体积为 100ul，则 siRNA 转染终浓度为 50nM；
- 将转染后的培养板放入细胞培养箱中，37° C, 5% CO₂ 培养 48~72h。

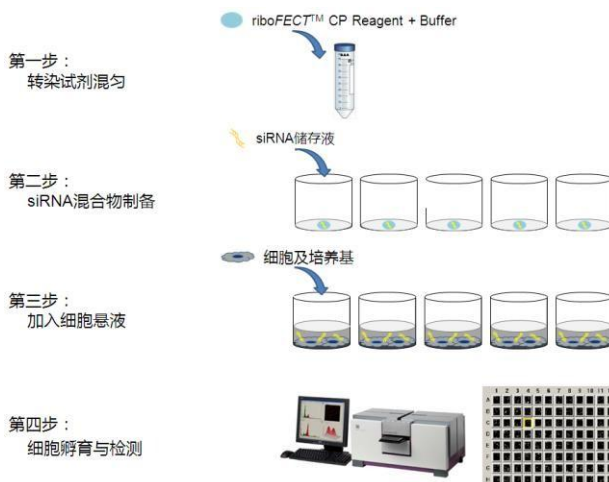


图 2. genOFF™ siRNA Library 细胞反向转染示意图

表 1 使用 riboFECT™ CP 转染 siRNA 用量参考

v1: 细胞培养基; v2: 1X riboFECT™ CP Buffer; v3: 5μM siRNA; v4: riboFECT™ CP Reagent

| Plate | siRNA 终浓度 | 每孔体积 | 培养基(v1) | Buffer(v2) | siRNA(v3) | Reagent(v4) |
|---------|-----------|-------|---------|------------|-----------|-------------|
| 96-well | 100nM | 100μl | 87.0μl | 10μl | 2μl | 1μl |
| | 50nM | 100μl | 88.0μl | 10μl | 1μl | 1μl |
| | 30nM | 100μl | 88.4μl | 10μl | 0.6μl | 1μl |
| | 20nM | 100μl | 88.6μl | 10μl | 0.4μl | 1μl |
| | 10nM | 100μl | 88.8μl | 10μl | 0.2μl | 1μl |

注：橙底标识为实验参考用量示例，对于部分细胞类型需要进一步优化。

2) 正向转染

1>细胞准备

转染前24h, 接种适量细胞至96孔细胞培养板, 使转染时的细胞密度能够达到30~50%, 每孔100 μl 细胞培养基 (v1)。

注: 1) 细胞密度是影响转染效率的关键因素, 细胞生长过度会削弱细胞活力, 降低细胞的转染效率。而细胞密度过低则达不到生长的要求, 也会影响转染效率;

2) 每孔接种的细胞数应尽量相同, 并使细胞均匀分布, 做高通筛选实验时尤其需要考虑。

3) 细胞培养时, 需在细胞培养箱中放入水盘, 以减少细胞培养时的水分蒸发。过夜培养时常发生的96孔培养板的边缘孔与中心孔蒸发速率不同的问题, 需要综合考虑, 如差异过大, 需采取适当措施降低其影响。

2>转染步骤

- siRNA文库储存板在使用前需平衡至室温;
- 取全新96孔PCR板 (去RNase), 每孔加入10μl 1X riboFECT™ CP Buffer (v2) 和1μl 5μM的siRNA储存液 (v3), 轻轻吹打混匀;
- 每孔加入1μl riboFECT™ CP Reagent (v4), 轻轻吹打混匀, 室温孵育10~15分钟;
- 取出96孔细胞培养板, 每孔弃适量培养基;
- 将配制好的【siRNA-转染混合物】加入96孔细胞培养板中, 保持每孔总体积为100μl, 则siRNA转染终浓度为50nM;
- 将转染后的培养板放入细胞培养箱中, 37 °C, 5% CO₂培养48~72h。

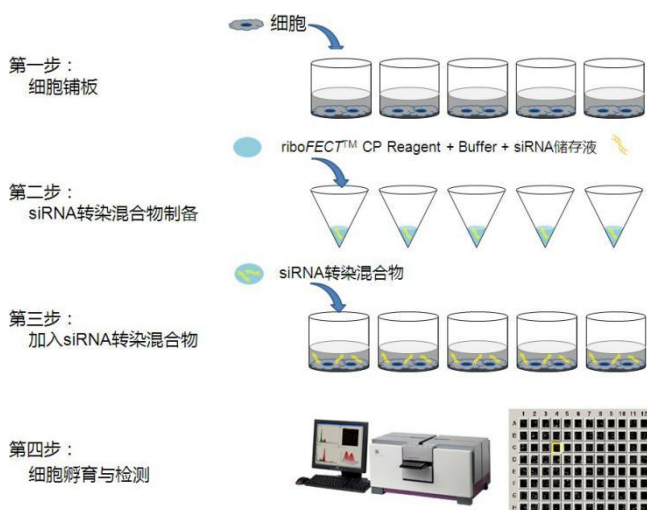


图 3. genOFF™ siRNA Library 细胞正向转染示意图

表 2 使用 riboFECT™ CP 转染 siRNA 用量参考

v1:细胞培养基; v2:1X riboFECT™ CP Buffer; v3:5μM siRNA; v4: riboFECT™ CP Reagent

| Plate | siRNA 终浓度 | 每孔体积 | 培养基(v1) | Buffer(v2) | siRNA(v3) | Reagent(v4) |
|---------|-----------|-------|---------|------------|-----------|-------------|
| 96-well | 100nM | 100μl | 87.0μl | 10μl | 2μl | 1μl |
| | 50nM | 100μl | 88.0μl | 10μl | 1μl | 1μl |
| | 30nM | 100μl | 88.4μl | 10μl | 0.6μl | 1μl |
| | 20nM | 100μl | 88.6μl | 10μl | 0.4μl | 1μl |
| | 10nM | 100μl | 88.8μl | 10μl | 0.2μl | 1μl |

注: 橙底标识为实验参考用量示例, 对于部分细胞类型可进一步优化。

3. 效果检测

转染完成后 48~72 小时进行 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) 细胞形态与功能筛选。通过荧光染色和影像学观测，对细胞进行多重分析，获取被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息。通常采用高内涵筛选仪对 96 孔板或 384 孔板的样品进行平行数据采集和分析，对细胞亚群中荧光信号的统计数据（强度）和细胞的物理特性（大小，面积，高，宽，体积等）实现多重分析，获取被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息。高内涵筛选技术的检测范围很广，包括：靶点激活、细胞凋亡、分裂指数、蛋白转位、细胞活力、细胞迁移、受体内化、细胞毒性、细胞周期和信号转导等。
- 2) 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。
- 3) 蛋白水平的检测：蛋白是 RNAi 沉默效率的重要指标。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，甚至更长时间之后多点采样。

参考文献：

1. Wallis D, Loesch K, *et al.* High throughput differentiation and screening of a library of mutant stem cell clones defines new host-based genes involved in rabies virus infection. *Stem Cells*.2015; Mar 5.
2. Roger Meier, Andrea Franceschini, *et al.* Genome-Wide Small Interfering RNA Screens Reveal VAMP3 as a Novel Host Factor Required for Uukuniemi Virus Late Penetration. *J Virol*. 2014 Aug; 88(15):8565–8578.
3. Wei Wang and Allan Bradley. A recessive genetic screen for host factors required for retroviral infection in a library of insertionally mutated Bim-deficient embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2007; 8(4): R48.
4. Chang Y, Liu C, *et al.* MiR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma. *JHepatol*. 2013 Sep;59(3):518-27.

相关产品

| 序号 | 产品名称 | 规格 | 产品编号 |
|----|--|----------|----------|
| 1 | riboFECT™ CP Transfection Kit (333T) | 1mL | C10511-1 |
| 2 | genOFF™ siRNA Negative Control #1 | 5nmol | stN0001 |
| 3 | genOFF™ siRNA Negative Control #2 | 5nmol | stN0002 |
| 4 | genOFF™ siRNA Negative Control #3 | 5nmol | stN0003 |
| 5 | genOFF™ siRNA Positive Control(EGFP) | 5nmol | stP0001 |
| 6 | genOFF™ siRNA Positive Control(GAPDH) | 5nmol | stP0002 |
| 7 | genOFF™ siRNA Positive Control(ACTB) | 5nmol | stP0003 |
| 8 | genOFF™ siRNA Transfection Control #1(5Cy3) | 5nmol | stT0001 |
| 9 | genOFF™ siRNA Transfection Control #2(5Cy5) | 5nmol | stT0002 |
| 10 | genOFF™ siRNA Transfection Control #3(5FAM) | 5nmol | stT0003 |
| 11 | Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Kit(100T) | 1plate | C10310-1 |
| 12 | Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Kit(100T) | 1plate | C10310-3 |
| 13 | Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Kit(500T) | 5 plates | C10327-1 |
| 14 | Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Kit(500T) | 5 plates | C10327-3 |
| 15 | Cell-Light™ EdUTP Apollo567 TUNEL In situ Detection Kit(20T) | 1 plate | C10810-1 |
| 16 | Cell-Light™ EdUTP Apollo488 TUNEL In situ Detection Kit(20T) | 1 plate | C10810-3 |