线路二：哺乳动物细胞 RNAi 实验：siRNA 的设计，合成

前面说过，哺乳动物细胞导入 30bp 以上的长双链 RNA（dsRNAs）往往会诱发非预期的抗病毒应答反应，所以不能用体外合成长的 dsRNA 直接导入细胞。常见的做法之一是直接制备 19—27bp 左右的 siRNAs，然后再将 siRNAs 转入哺乳动物细胞。

siRNA 的设计是决定 RNAi 实验成败关键性的第一步。虽然 siRNA 设计法则在不断地完善，可是并非每个设计出来的 siRNA 一定能有效沉默目标基因的表达，也没有办法 100％预测设计出来的 siRNA 是否有效，所以设计出来的 siRNA 都必须经过实验证实。

直接购买已经证实有效的 siRNAs，好处是已经厂家荧光定量 RT-PCR 预证有效，无需设计、合成和验证，无需顾虑 siRNA 是否有效，便于研究人员把全部精力集中到目标基因功能的研究上，而不需要花费在其他地方——在全球科学家争分夺秒抢夺基因功能研究成果和专利的今天，时间就是金钱，为什么要把宝贵的时间和精力浪费在反复琢磨如何设计和验证 siRNA 上呢？除非你立志成为 siRNA 设计专家。

专业的设计，高质量的合成和纯化，往往只需要很低的浓度就可以达到不错的基因沉默效果，也有助于减少脱靶等非预期反应——需要特别说明的是大多数 siRNA 不能达到 100%沉默基因表达的效果----毕竟不是基因彻底敲除，只是在转录后水平降解 mRNA，再加上 siRNA 转染本身很难保证 100%的细胞被成功转染，未转染细胞在检测时也会影响结果----以 RNAi 试剂领域两大领先厂家 Ambion 和 Qiagen 为例，他们把能降低目标基因表达 70%以上的 siRNA 称为有效，也有些公司的标准更高，如 Bio-Rad 标准是减低目标基因 85%的表达，Dharmacon 和 Sigma 标准则是 75%。siRNA 算是非常高效的，只需很低的浓度就可沉默基因表达，达到有效浓度后再增加也不会提高基因沉默的效果，反而研究结果表明过高浓度的 siRNA（超过 100nM 以上）还有可能导致非预期的脱靶反应。所以在实验中，通常就需要摸条件，以有效的最低浓度为最适浓度以期减少非特异反应。

因此在购买现成的 siRNA，同样的包装量，有效工作浓度不同，每次使用的成本就不用，比如 Bio-Rad 的 27bp siRNA 保证工作浓度是 5nM，Ambion 的保证有效的最高工作浓度是 30nM，多数厂家是 100nM，如果是荧光标记的 siRNA 工作浓度通常达到 100nM。假设同样的量，就算 Bio-Rad 的 27bp siRNA 比 100nM 工作浓度的其他品牌 siRNA 产品贵上 20 倍，二者每次实验使用成本也是一样的！因此，在考虑价格和包装时也要同时留意其有效工作浓度，才好比较价格。当然也需要同时考虑评估标准是用哪种细胞株。以 Qiagen 的资料为例，其验证 siRNA 用于 Hela、A549 细胞工作浓度为 5nM 足够，用于 HepG2、HEK293、MCF-7 细胞则需要用到 25nM。

虽然很多厂家如 Qiagen 等都在持续进行 siRNA 验证工作，以满足更多研究人员的需求，但是毕竟预证有效的 siRNA 还是有限的，如果你的基因并不在此范围内，你也可以选择

1. 厂家设计定制----只要提供基因的信息，即可由厂家设计合成纯化，还可以按要求修饰和

标记。多个厂家提供 NCBI 的 RefSeq 数据库中已有的人类，大鼠或者小鼠的全部基因的 siRNA 定制合成服务，生物通在后面会介绍。对同一个基因通常需要设计 3-5 个不同的 siRNA 以保证其中至少 2 个 siRNA 是有效的，同时可做相互对照。同一基因定制多个 siRNA，相比设计合成单个 siRNA，厂家也会有“套餐”优惠

2. 自己设计再叫厂家合成----如果研究对象不在此列，也可以采用网上免费的 siRNA 在线设计工具来设计，生物通在随后附录一些在线工具的地址以供参考。不过，别指望用不同的设计工具对同一序列设计一定会得到类似的结果---不同的在线工具有不同的设计法则和评分标准，同一序列用不同的在线工具设计得到的结果也可能各不相同

生物通 ebioTips 6：好的实验设计应该至少选择 2 个以上针对同一目标基因的**有效 siRNAs** 同时平行做实验，以相互验证实验结果确实是由于目标基因沉默而引起的，并非个别 siRNA 的特异现象。严谨的实验态度是可靠结果的保证。如果未知是否有效，针对同一个基因选择 3-5 个 siRNA 平行实验是非常有必要的。自 03 年以来，不少文章从浓度、siRNA 作用机制上阐述了导致脱靶反应的原因，这种平行对照更加显得必不可少。

1.商品化 siRNAs：

已经纯化、买来即用的 siRNAs，简单方便，适合瞬时基因沉默而不适合做长期沉默，不能重复使用。分为预证 siRNA 和定制 siRNA. 两种，前者厂家预证有效，后者根据一定法则厂家设计，但是未经实验证实----不过通常能保证 3 个设计中至少 2 个有效，或者 5 个里有 3 个有效（目标基因 70%表达沉默称为有效）。合成好的 siRNA 通常以冻干或者溶液状态提供，虽然 siRNA 可以在 4° C 条件下稳定 2 周，最好还是放-20° C 冰箱，避免反复冻融，可稳定 6M 左右。若要长期保存以冻干形式为好。对于定制合成 siRNA，通常可以选择标准纯度（>85%），HPLC 纯化（>97%），PAGE 纯度（>97%）和体内实验纯度。即使是标准纯度的 siRNA 也需要经过 MALDI-TOF 质谱和 HPLC 分析，退火后经过 PAGE 分析的，如果合成量不大，标准纯度已经足够普通的体外实验用，如果起始合成量较大，40nmol 以上或者经过修饰的 siRNA，则最好选择经过 HPLC 纯化。如果是计划做体内实验则需要购买去除内毒素，彻底脱盐的 siRNA。商品化的 siRNA 的量，国外厂家多以 siRNA 产物 nmol 数标识（Invitrogen 是以合成量来标识的，不同的纯化方法得到的产量有不同），而国内的合成厂家则喜欢用 OD 值表示----由于 OD 值读数易受产物中的其他成分影响，因此需要留意产物纯化方式。参考 Sigma 的数据，1OD 的 19-23bp 产物差不多相当于 5nmol，可做 75 次 24 孔板转染，上海吉玛的数据则是 1OD 产物差不多相当于 2.5nmol。

Qiagen 自从几年前收购了全球知名的 RNA 合成厂家 Xeragon，凭借 Xeragon 在 RNA 合成领域的雄厚技术实力和声望，成功进军 siRNA 合成领域并迅速取得了领先地位。利用 BIOPREDsi 法则进行设计，Qiagen 的 HP Validated siRNAs 正在进行全球最大规模的 siRNA 验证工作，已经得到验证的有超过 2000 多个人类基因的 3500 多个有效 siRNAs。每个 siRNA 都经过至少 4 次独立转染，每次双份的转染实验从而得到 8 个基因沉默效率的数据，每次独立转染都必须经过比较同一个正对照(MAPK)的基因沉默效率（70%以上为有效）进行每次转染效率间的平衡、荧光定量

RT-PCR 同时检测目标基因和。经过和未转染细胞之间的比较，得到的数据经过 ΔΔ*CT* 和管家基因 GAPDH 作为内参进行平衡，定量 PCR 还要通过实验排除污染，引物二聚体，引物发夹结构的影响，甚至连每个目标 mRNA 的溶解曲线也进行监控。这样得到最后能满足沉默效率在 70%以上的 siRNA 才能被保留入选。这样严格的产业标准是一般实验室所无法实现的。现在 Qiagen 开放提供详细序列信息，每个 siRNA 5nmol 报价 Y4678，按照去年价格战的折扣，不到 3000。Qiagen 网站上还有 FlexiTube 订购组合，一次订购 4 个以上，每个 siRNA 1nmol 价格 90 美元不到，以如此严谨的评估标准得到保证有效的 siRNA，这个价格性价比颇高。1nmol 大约相当于 13-15ug siRNA。

已经验证的 siRNA 毕竟很有限，各厂家还有一种由厂家根据用户目标基因，提供设计合成服务的 Pre-designed 的 siRNA，虽然没有验证，但是经专家设计，并经过严谨筛选，成功率高，也很省事----对于研究基因功能的研究人员来说，集中精力专心研究目标基因的功能，尽快发表研究成果才是主要目标。以 Qiagen 为例，提供针对人类，小鼠，大鼠几乎全部基因的 siRNAs 设计合成。所有设计的序列都经过严格筛选：

----筛选最新基因组同源序列，以避免脱靶反应；

----SNP 筛选以避开 SNP 位点，

----干扰素结构域分析：已知一些结构域会引发干扰素相应，包含这些结构域的 siRNA 要被剔除。Hornung et al（.Nature Medicine 2006）研究表明免疫细胞，特别是浆细胞样树突状细胞（plasmacytoid dendritic cells）内吞 siRNA 后会分泌 I 型干扰素。作者还鉴别了 9 个碱基的结构域特别容易引发 IFN-I 分泌。所以，如果 siRNA 会进入血液就要特别小心避免这类结构。

----3'UTR seed region 分析：有文章表明，某些 siRNA 反义链的 seed region(反义链的的 2-8 个碱基)和一些非目标 mRNA 的 3'非编码区不完全匹配（imperfect matches）时有可能导致脱靶反应，使得非目标 mRNA 也发生降解。原因是这种 siRNA 可能模拟一个 miRNA 作用。Qiagen 的设计会对 RefSeq 数据库中人类大鼠和小鼠的 3'UTR 序列和 siRNA seed region 的互补性进行分析，并尽量避开潜在可能出问题的序列。（生物通编者注：完全避免这种 imperfect matches 很难，并且匹配并非意味必然会导致问题出现。只是在筛选过程中尽量避免潜在可能出问题的序列。）

这种Pre-designed siRNA单个报价不便宜。不过由于一个基因通常需要 3-5 个siRNAs 同时平行实验，Qiagen提供的FlexiTube GeneSolution一次订购 4 个不同的 1nmol的 Pre-designed siRNA，总价格不到 300 美元，价格直逼国内siRNA合成价格，加上著名厂家设计合成，还是有吸引力的。Qiagen还有提供一种根据已发表文献公布的siRNA序列合成的商品，如果自己能找到文献也可以直接合成。Xeragon独有的TOM RNA合成专利使得合成siRNA纯度 90%以上。

Ambion独立的Silencer Validated siRNAs ——预证siRNAs，已经实验验证能有效沉默目标基因 70%或以上，大小为 21bp；3'末端以UU结尾，涵盖人类 400 多个基因（www.ambion.com/siRNA），有 5nmol和 20nmol两种冻干粉包装提供。要特别说明的是，由于Ambion的siRNA3’末端突出都是UU结尾的，完全模拟自然存在的siRNA，由于在化学合成的过程中，添加U的试剂成本

要比 T 贵得多，难度大，UU 末端合成成本要远远高于 TT 末端或者其他末端，因此你会发现，Ambion 的商品 siRNA 要比其他品牌贵不少，有如川菜一般劲辣。同样的，在设计 siRNA 时，Ambion 的所有产品设计原则也是优先寻找 mRNA 序列中带有 AA 的下游 19 个碱基（得到 3’UU 末端），也就是务求令 siRNA 的 21 个碱基完全匹配 mRNA 序列。尽管 Tuschl 本人后来也表示 siRNA 3’末端的 UU 作用并不很大，多数公司设计是直接找 19nt 序列后直接加 TT，这样设计难度也小很多，但是 Ambion 公司却一直坚守 UU 法则，不曾放弃。Silencer Validated siRNAs 现在的序列信息也免费开放提供，包括厂家验证的数据都一起提供。由于 Ambion 公司提供的预证 siRNA 工作浓度为 30nM，比多数厂家 100nM 的有效工作浓度要低很多，就算同样包装大小的 siRNA 比别人贵 3 倍，每次实验成本也还是 Ambion 的划算点。知识产权，或者说服务创造价值，大概就体现在这里吧。

由于 Ambion 给 ABI 收购了，所以买 Ambion 的 siRNA 还可以直接购买 ABI 公司提供的相应基因的 Taqman 荧光定量 RT-PCR 试剂盒，非常方便，用不着打着灯笼到处搜罗不同品牌的试剂，为联合国大军之间的配合作战而烦恼了。正好 ABI 公司大量人类基因的荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒也非常出名，这样就可谓一步到位，只可惜价格很高贵。

Silencer Pre-designed siRNAs——预设计 siRNAs,是 Ambion 公司联手 Cenix BioScience 公司以业内非常成熟的 siRNA 设计软件来设计。除了已知的公开法则，包括我们前面提及的坚持优先序列中的 AA 下游 19 个碱基，务求 21 个碱基完全和 mRNA 匹配，3’端 UU 突出结尾等完全模拟自然 Dicer 酶切结果，还包括了多年的实验心得，比如 siRNA 反义链的 3'端 GC 含量高，5'端 GC 含量低有助于提高 siRNA 效率；此外该软件并非只顾埋头设计，还会对已知序列进行检索以避免和其他基因同源而导致脱靶反应，还要检索已知的 SNP 库以避开 SNP 位点，已知的蛋白质结合位点如 CpG 位点也要避开（蛋白质结合位点会影响 RICS 复合物与 mRNA 的结合）等等工作；以沉默效率 70%以上作为评估成功标准对其设计进行验证测试：针对 400 多个人类内源转录本（包括难设计的基因）而设计的 1100 多个 siRNAs 成功率高达 82％以上——因此，Ambion 保证 3 个以上针对同一目标基因而设计的 siRNA 中至少有 2 个能使目标基因的沉默效率达到 70％或以上，同一基因你订购 3 个 Pre-designed 的 siRNAs 就可以了，3 个里正好有 2 个有效 siRNAs 可以作为平行对照。厂家提供 NCBI 的 RefSeq 上列出的人类、小鼠和大鼠的全部基因的 siRNAs，品种很齐全，是由化学合成的、已经纯化和退火的即用型 siRNA，当然，序列信息是提供给你的。5nmol 标准纯化的价格在 2600-3200 之间。

著名的仪器厂家 **Bio-Rad** 也加入 RNAi 产品大军中，根据 2005 年 Kim 和 Rose 等人在 Nature Biotechnology 上发表的文章，独树一帜地提出 27bp 的 siRNA（Bio-Rad 称之为 Dicer 底物 siRNA）能够在 RNAi 信号通路更上游环节----Dicer 酶切割双链 RNA 步骤中有效地激活 RNA 干扰信号通路，更加真实的模拟体内的 RNA 干扰发生过程。较之 21bp 的 siRNA，27bp 的 siRNAs 能够实现对目的基因的大于 100 倍的抑制效果，可以在低浓度水平实现对目的基因的高效抑制，减少了高浓度条件下 siRNA 分子的 off-target 效应。Bio-Rad

提供的siLentMer Validated Dicer-Substrate siRNA Duplexes，均保证在 5nM的工作浓度下，实现对目的基因>85%的干涉效率。siLentMer 验证的siRNA 不仅可以用于实现对目的基因的高效抑制，而且可以用来作为实验的阳性对照或者阴性对照。基于生物通前面提及的理由，针对每一个目的靶基因，Bio-Rad提供 2 对siLentMer 验证的siRNA，确保了目的基因特异干涉的可靠性。这个参数相当漂亮，工作浓度小到 5nM，基因沉默效率 85%以上，27bp的siRNA确实有过人之处，我们前面算过，就算同样包装的产品比其他工作浓度要达到 100nM的产品贵 20 倍，每次实验成本也是一样的。目前已经推出的有人类 30 多个基因的siRNA，即将再推出 30 多个基因的siRNAs。就是品种太少（查询：www.bio-rad.com/RNAi/ ）。对于前者没有的基因，可以尝试siLentMer non-validated siRNA，设计遵循同样的高级算法，针对每一个目的靶基因提供 4 对siLentMer非验证的siRNA，确保了目的基因特异干涉的有效性。值得一试。值得留意的是 2006 年Dharmacon公司在《RNA》上发表的文章提出 23bp以上的siRNA会影响细胞活力和引起IFN响应，因而提出应该关注 27bpDicer底物的非预期反应。这个不妨增加对相关的基因表达情况的检测来进行评估。另外 27nt 的siRNA由于还需要经过Dicer酶切，所以不适合目前过度修饰的方法，

Sigma 公司的化工试剂在业界的声望就如同 IBM 的金字招牌，近年也来大举进攻分子生物学领域的研究试剂。Sigma 拥有著名的Proligo 公司强大的生产技术平台，是四大拥有 MIT 专利授权合成 siRNA 的公司之一，专利的合成技术令产品质量更有保障。采用著名的 Rosetta siRNA 设计法则，TT 结尾设计，专职的 siRNA 设计专家可针对用户的要求与设想提供专业的设计服务，只需要提供 Gene ID 或基因名，可以选择位置偏好和种属特异性、纯化方法、产量，修饰等要求，就可以度身定制得到想要的 siRNA，Sigma 保证每 3 条 siRNAs 至少 2 条沉默效率 75%以上。事实上，Sigma 合成的 siRNA 纯度很高，完全不需特殊的 HPLC 或者 PAGE 纯化即可进行有效的RNAi 实验。目前体验价仅为￥3120/3 对siRNA 设计合成。价格可亲。

Dharmacon 公司早在 2004 年发表在Nature Biotechnology 上的文章提出了 siRNA设计的 8 大原则，包括 GC 含量控制，3’端碱基偏向性，减少重复序列、特异位点的碱基偏好性等等。随着研究的深入，Dharmacon 的SMARTselection 参数设计在传统的 8 个控制参数基础上，增加诸如 SNPs 位点、高度冗余序列和高度同源序列、siRNA 反义链“seed region”以及某些毒性或者干扰素 motif 的过滤。Dharmacon 公司的 siRNA 商品和前面介绍的预证 siRNA 不同------它不是一个一个单独验证有效，而是以 SMARTpool 形式提供，即将 4 条由 SMARTselection 技术设计的siRNA 按照比例混合，确保对任何人、小鼠和大鼠三个物种已知基因有高效沉默性（证标准条件下沉默基因表达水平≥75％，超过 85％的 SMARTpool siRNA 试剂可以沉默靶基因表达水平至少 90%甚至更高）。混合 siRNA提高了实验的成功率，5nM 的价格目前的市场报价为 3900RMB，不用验证也可确保有效沉默（很取巧的方法）。Dharmacon 还会根据最新的 NCBI 序列数据库中靶基因序列的更新而升级相关产品。

不过，鉴于混合 siRNA pool 无法了解到

底那个 siRNA 真正有效，混合 siRNA 有引发副反应的可能且难以排除，Dharmacon 也为已经买过 SMARTpool 产品的用户提供 SMART pool upgrade（如果你不买 SMARTpool，可以选择购买 Set of 4，设计方法都一样的，但价格要贵几乎一倍），即以 4 条单独的 siRNA 形式提供。4 条独立的 siRNA 针对目标基因的 4 个不同位点，提供序列信息；保证 4 条 siRNA 中有 3 条可以有效沉默目的基因表达水平至少 75％。由于单条的双链 siRNA 可以不受混合 siRNA 试剂的影响而对其功能进行单独分析；降低因个别序列引起的脱靶效应，有效降低实验结果假阳性，只需收获您的阳性结果，减少反复筛选实验的需要，一步到位沉默靶基因。如果每个 siRNA2nmol，4 个报价￥3900（Set of 4 ￥7140，OnTarget Plus 的价格￥8400.）。如果你不想要 4 条----厂家保证 4 条里有 3 条 75%有效，最差的也保证 50%有效，单独购买每条报价￥2340（5nmol）。

Dharmacon 公司最新研究成果表明：siRNA 的 Seed Region（反义链 2-7nt 序列）和 mRNA 的 3'-UTR 的匹配关系与基因沉默中的脱靶效应相关，因此，单独对正义链的修饰失活并不能完全降低脱靶效应。Dharmacon 公司 ON-TARGETplus siRNA 不单通过修饰正义链阻止其与 RISC 的相互作用，并促进反义链与 RISC 的相互作用；并且通过修饰反义链的 Seed Region 从而将于 Seed Region 相关的脱靶效应降到最低，结果表明双重修饰减少脱靶效应可达 90％以上，真正意义上排除基因沉默中的脱靶效应，有助于提高 siRNA 的特异性，降低假阳性，增加基因沉默实验可信度。5nmol 的 SMARTpool ON-TARGETplus siRNA 报价￥5100, Upgrade 则 4860。

Dharmacon 所提供的 siGENOME 试剂是相当全面和灵活的基因沉默平台，它支持研究的各个阶段，比如从最初的药物靶点筛选到后来临床治疗阶段效果的确认。目前为止已涵盖人、小鼠和大鼠三个物种的基因组范围内 NCBI 基因序列数据库中所有已知基因，有超过确保沉默 81,000（包括人，小鼠，大鼠）个基因的 siRNA 试剂。

Invitrogen 的 Stealth™ RNAi 是经过修饰的 siRNA，由于 siRNA 双链中的任一条可以和 RISC 结合进入 RNAi 通路，不起作用的正义链进入 RNAi 体系潜在会和其他基因同源而引发脱靶反应，也可能影响 RNAi 效果。Invitrogen 的 siRNA 经过修饰，正义链不会进入 RNAi 途径，而且据说能提高 siRNA 在血清中的稳定性，在细胞培养中效果最长可达 2 周。

除了那些赫赫有名的牌子，不少新兴公司也力争以更个性化的服务和更灵活的价格挤入 RNAi 这个新兴的市场。韩国 **Bioneer** 公司 AccuTarget validated siRNA 也是已证明敲除效率的 siRNA，当以 100nM 的浓度转染时，保证有大于 70%的敲除效率。每个靶基因提供两条 Validated siRNA，同时出售 Validated real time PCR 引物，可以用实时定量 PCR 仪加 SYBR®荧光染料进行敲除效率分析。AccuTarget 基因组预设计 siRNAs 包含人，小鼠，大鼠基因组的约 44,000 个基因，每个目的基因有三条得分最高的 siRNAs，当以 100 nM 浓度转染时，83.8%的被测 siRNAs 诱导了大于 70%的敲除，其中 38.1%的被测 siRNAs 表现出大于 90%的敲除率。

Santa Cruz：RNAi 真是火啊。连著名的抗体生产厂家 Santa Cruz 也加入了 RNAi 产品线，提供主要包括人类、小鼠在内的多种哺乳动物 10000 多个基因的 siRNAs（20-25nt），参考 2007 年生物通商城的标准报价是 3150，

AccuTarget™ Genome-wide Predesigned *siRNAs*

- 含人，小鼠，大鼠基因组的约44,000个基因
- 每个目的基因有三条得分最高的siRNAs
- 当以100 nM浓度转染时，三条候选siRNAs中至少有两条可以使靶mRNA表达水平降低大于70%

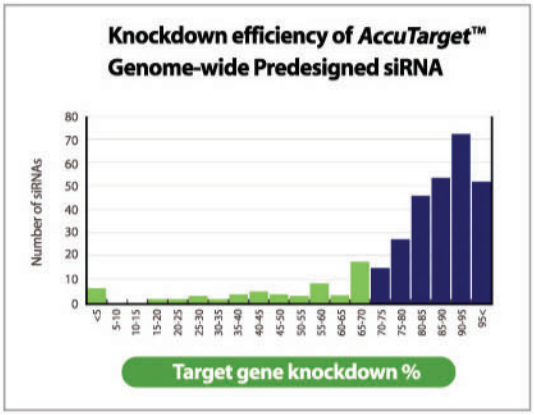

图3. *AccuTarget*™预设计siRNAs的高效率

为检测预设计siRNAs的敲除率，用100 nM 浓度的siRNA 转染HeLa细胞。转染后24小时，提取总RNA并用实时定量PCR检测靶mRNA的表达水平。数据显示使用Bioneer Turbo si-Designer设计的siRNAs的效率：83.8%的被测siRNAs诱导了大于70%的敲除，38.1%的被测siRNAs表现出大于90%的敲除率。

AccuTarget™ validated *siRNAs*

已证明敲除效率的siRNA，当以100 nM的浓度转染时，保证有大于70%的敲除效率。每个靶基因提供两条Validated siRNA，同时出售Validated real time PCR引物，可以用实时定量PCR仪加SYBR®荧光染料进行敲除效率分析。

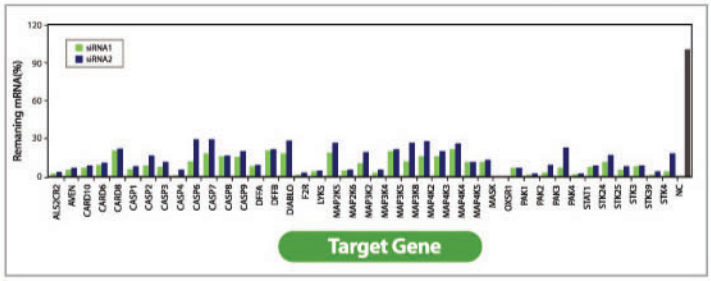

图4. Validated siRNA的敲除效率。用Validated siRNA转染HeLa细胞，然后用实时定量PCR检测敲除率。靶向mRNA的表达水平用百分比表示。对比用Validated siRNA处理过的HeLa细胞和用Negtive Control siRNA处理的HeLa细胞的mRNA表达水平。

AccuTarget™ *siRNAs* library for Human

Bioneer现提供24个siRNA文库，每个靶基因可以任意选购1，2或3条siRNA，新的文库套装会不断更新。

AccuTarget™ *siRNA* library			
Gene Family/ Functional Class	Human Genes	Gene Family/ Functional Class	Human Genes
Caspase pathway	37	Isomerase	104
Kinase	701	Ligase	272
Phosphatase	188	Ligase	123
NF-kB pathway	22	Oxidoreductase	551
Apoptosis	290	Transferase	1432
Cell cycle	113	Motor	122
Antioaidant	38	Receptor	1526
Nucleic acid binding	2589	Ubiquitn	77
Cyclase	22	Tubulin	20
Deaminase	22	Transporter	1023
Helicase	115	Cytochrome P450	52
Peptidase	495	GPCR signaling	732

AccuTarget™ Control *siRNAs*

Positive Control siRNAs (Human GAPDH,GFP,Luciferase)
Negative Control siRNAs (commonly used for Human,Mouse and Rat)

GAPDH-*siRNA*

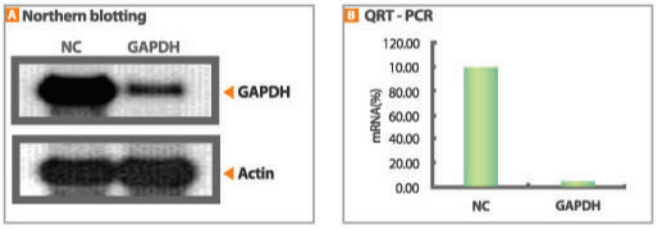

图5.用浓度为100 nM GAPDH和NC(negative control)-siRNA转染HeLa细胞。转染24小时后，从转染细胞中提取总RNA并用实时定量PCR和Northern blot检验。从图. 1B中可以看出。转染24小时后，用GAPDH-siRNA处理过的细胞中仅有3%的GAPDH mRNA残留。这表明使用Bioneer的Positive control GAPDH-siRNA可以轻易地高效率敲除GAPDH mRNA。

GFP-*siRNA*

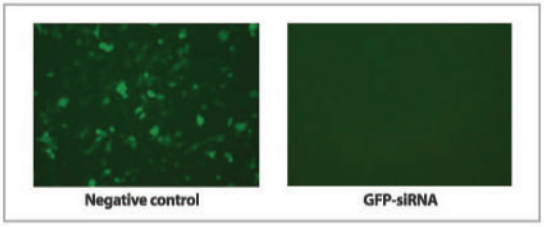

图6. HeLa细胞置于24孔板中，同200 ng的CMV-GFP质粒和10 nM的GFP siRNA用转染试剂共同转染。隔夜，GFP的表达水平用Nikon公司的Eclipse TS epi-荧光显微镜进行观察。对比在NC-siRNA转染的细胞中出现明亮绿色荧光的GFP蛋白，在GFP-siRNA处理的细胞中没有探测到荧光。表明使用Bioneer的GFP-siRNA可以轻易地高效率敲除GFP。

Luciferase-*siRNA*

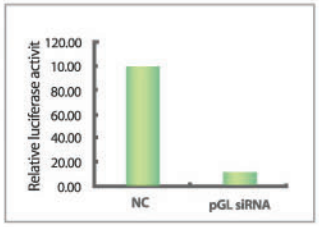

图7. HeLa细胞置于6孔板中，同400 ng的CMV-luc质粒和10 nM的荧光素酶-siRNA用lipofectamine2000共同转染。隔夜，收集细胞并检验荧光素酶的活性。从图6.中可以看出共同转染细胞的敲除率。用Bioneer阳性对照荧光素酶-siRNA处理细胞导致了荧光素酶活性的有效降低(与NC-siRNA处理的细胞相比表现出85%-95%敲除率)。

• Negative control *siRNA* (NC-FITC)

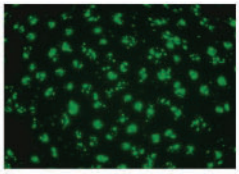

图8. 用FITC-标记的siRNA转染的HeLa细胞在共焦显微镜下观察。细胞中观测到荧光表明了靶细胞被siRNA成功转染。