



GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

GM siRNA-mate 转染试剂使用说明书

产品介绍

与其它转染试剂比较，siRNA-mate 转染效率高、细胞存活率高、毒性小。可广泛用于瞬时和稳定转染，也可以应用于蛋白表达和基因功能的研究。

转染试剂保存在 4℃，有效期 2 年。

重要提示

1. 细胞的状态：转染时贴壁细胞的密度以 30-50%为佳，而且转染时细胞应处在生长旺盛的对数生长期。细胞密度过高和细胞传代数过高会影响转染效果。
2. siRNA 的质量：使用高纯度的 siRNA 也是转染成功的关键。在转染前需确定 siRNA 的含量和纯度，实验过程中需要使用 DEPC 处理过的耗材和试剂，注意避免 RNase 污染。
3. 血清的影响：在制备 siRNA-mate 和 siRNA 形成复合体过程中不能添加血清，建议用 OPTI-MEM 或其他无血清培养基（如 DMEM、RPMI-1640 等）稀释 siRNA 和转染试剂，以达到复合物形成的最佳效果。但是，在随后的转染过程中，血清的存在并不影响复合体的转染效果。
4. 转染试剂的用量：对于一定量的 siRNA 建议尝试按照推荐剂量的 siRNA-mate 转染试剂进行优化，以确定最佳的转染效率。以 24 孔板为例，每 10pmol siRNA 可使用 0.5ul, 1ul, 1.5ul 和 2ul 转染试剂作为初步实验条件。

操作流程 (24 孔板)

以 24 孔板为例，若要检测基因沉默的效果，推荐最低 siRNA 终浓度 10nM；若要在显微镜下从荧光强度看转染效率，因荧光信号被检测到需要一定的敏感度，推荐 siRNA 终浓度 50nM。遵循以下操作方法可以高效地将 siRNA 转染贴壁和悬浮培养的多种真核细胞。但是对某些特殊的细胞系和培养条件，或特殊应用等，也许需要单独特别优化，请参考表 1、表 2。

A. 细胞铺板



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

贴壁细胞数量：在转染实验之前的 18-24 个小时，在每个孔的 500ul 生长培养基中加入 $1.5-3.5 \times 10^4$ 个细胞（确保转染时细胞密度在 30-50%）。

悬浮细胞数量：转染实验的当天，在 500ul 生长培养基中加入 $1-2 \times 10^5$ 个细胞。注意：转染时应确保细胞没有过度生长或处于休止期。

B. 转染复合物的制备

1. 将 siRNA-mate 转染试剂放置于室温中，使用前轻轻混匀。
2. 将 100ul DMEM 或 OPTI-MEM（无血清和无抗生素）加入无菌 EP 管中。
3. 在上述含有 DMEM 培养液的 EP 管中加入 10pmol(140ng) 待转染的 siRNA，并充分混匀。随后在管子中加入 2ul siRNA-mate 转染试剂，快速涡旋 10s 使其完全混匀。
4. 室温静置 10 分钟，使 siRNA 和转染试剂形成转染复合物。静置时间不要超过 30min。

C. 转染过程

1. 趁静置时，给 24 孔板换液，每孔换上 0.5ml 预热的新鲜培养基。
2. 将 100 μ l 转染混合物加入孔中，终体系为 600 μ l，siRNA 终浓度为 16.7nM。加完后将板轻轻摇匀。
3. 37°C 静置培养细胞，检测基因沉默水平可在 24-72h 内收样检测 mRNA（RT-PCR 实验等），或 48-96h 内检测蛋白（Western Blot 实验等）。

本产品仅限于科研用途，而不适用于临床诊断、治疗等其他特殊用途。



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

表 1：贴壁细胞或悬浮细胞接种数量、培养基体积

培养器皿	每孔表面积 (cm ²)	每孔培养基的 体积 (ml)	贴壁细胞转染前一天 接种密度	悬浮细胞转染当 天接种密度 ¹
96孔板	0.3	0.1	5 000±2 500	2-5×10 ⁴
24孔板	2	0.5	25 000±10 000	1-2.5×10 ⁵
12孔板	4	1	50 000±20 000	2-5×10 ⁵
6孔板	10	2	150 000±50 000	0.4-1×10 ⁶
60mm	20	4	400 000±100 000	1-2.5×10 ⁶
100mm	60	10	1*10 ⁶ ±250 000	2-5×10 ⁶

注 1：贴壁细胞培养密度取决于培养器皿的表面积，而悬浮细胞则由培养基的体积决定，确保转染时细胞密度在 30-50%。

表 2 不同培养板转染 siRNA 的推荐转染条件

培养器皿	转染稀释液（无血清培养基）体 积 (ul)	转染复合物中 RNA 含量范 围 (pmol)	常规细胞每孔 siRNA- mate 用量 ²
96孔板	50	2-10	0.25-1.5μl
24孔板	100	6-30	1-4μl
12孔板	200	12-60	2-8μl
6孔板	200	22-110	4-16μl
60mm	400	44-220	10-25μl
100mm	500	105-525	30-60μl

注 2：siRNA-mate 转染试剂的用量在此范围内进行优化。