GP-siRNA-Mate Plus转染试剂使用说明书

产品介绍

GP-siRNA-Mate Plus是一款操作简单、相对安全性高的高分子纳米转染试剂。该试剂可用于细胞转染，包括贴壁细胞、部分悬浮细胞及部分原代细胞，转染效率高，且毒性极低。作为一款优秀的体内、体外转染试剂，本产品可携带siRNA、miRNA等核酸片段，通过细胞转染或多种注射方式进入细胞或动物体内，帮助实现可能的RNA核酸干扰、表达等体外细胞或体内动物基因调控研究。

运输与储存

运输：常温

储存：4℃ 1年，严禁冻存冻融。

使用注意事项

（一）体外细胞转染密度推荐请参见表1，剂量请参见表2。

（二）体内使用注意事项

1. 核酸溶解：溶解必须使用无菌水，不要使用其他溶剂溶解，否则会直接影响转染效率，导致转染失败；
2. 核酸质量：使用高纯度无内毒素核酸，实验前用无菌纯水溶解（RNA建议采用高压后的DEPC水溶解），配置浓度建议在0.5~4 μg/μL；
   本说明书默认浓度为20 μM（核酸溶液尽量现配现用，避免反复冻融）
3. 体内核酸推荐使用剂量：肿瘤原位注射起始剂量10 μg/瘤体，推荐给药剂量5~20 μg；静脉给药起始剂量为2 mg/kg，推荐剂量1~10 mg/kg，一般给药剂量越高，效果越好，以不造成动物明显炎症或死亡为标准；
4. GP-siRNA-Mate Plus用量：根据核酸用量，推荐核酸剂量(μL)：GP-siRNA-Mate Plus(μL)比例固定为1:1。动物体内试验中，动物肿瘤模型的建立及核酸给药途径可根据具体情况确定，可选择静脉注射、肌内注射、瘤内注射、腹腔注射或局部靶位点注射等；
5. 复合物制备：复合物制备过程中，无需用其他试剂对复合物进行稀释，请计算好实验用量，直接配置；
6. 推荐剂量见表3.

Tips：

吉玛基因oligo，1 OD duplex＝2.5 nmols＝33 μg。不同厂家略有差异，具体请询供货商。

操作步骤

体外细胞转染操作步骤

以24 孔板为例，若要检测基因沉默或者过表达效果，推荐最低RNA oligo终浓度为50nM（不同细胞可以上下优化2-4倍浓度）；遵循以下操作方法可以高效地将RNA oligo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，也需要单独特别优化，请参考表 1、表2。

1. 细胞铺板

转染时细胞密度：一般来说，当细胞密度达到60%～80%时进行转染可以取得较高的转染效率(参见表1)。然而，不同细胞的最适转染密度都不尽相同。因此在初次转染某种细胞时，可以通过预实验先确认该细胞最佳的状态及转染密度。

2. 复合物的制备及转染

（1）使用前将GP-siRNA-Mate Plus转染试剂轻轻混匀；

（2）直接将适量的RNA oligo与GP-siRNA-Mate Plus转染试剂（参见表2）直接混合后，用移液器吸吹混匀，静置10-15 min，再将复合物加入300 μL完全培养基混匀后加入24孔板中；

（3）37℃静置培养细胞，6-8 h后换液拍照。36-72 h检测mRNA或蛋白水平的表达。

注：① 在复合物制备过程中绝对不能用任何试剂对核酸或转染试剂进行稀释，只需将两者按比列直接混合即可；

② 整个转染过程都可以用完全培养基，无需用无血清培养基；

③ 若第一次转染后转染效率不理想,可在转染后第二天继续添加核酸-GP-siRNA-Mate Plus复合物进行转染,可进一步提转染效率。

适用范围：293T，A549，Beas-2B，HeLa，ECA-109，Raw264.7，A375，CAFs，HCT116，HT29，LMH，NE-4C，MGC803，PC-3，PC-12，MCF-7，C6等细胞。

体内动物注射操作步骤

步骤以33 μg的核酸（siRNA/miRNA）与125 μL体内转染试剂GP-siRNA-Mate Plus，20 g裸鼠尾静脉注射为例。

1. 核酸溶解：1 OD siRNA 使用前离心，轻轻打开管盖，加入125 μL无菌水，震荡溶解；
2. 取出GP-siRNA-Mate Plus体内转染试剂盒，平衡到室温；
3. 核酸稀释：取1.5 mL灭菌EP管，加入125 μL siRNA，再加入GP-siRNA-Mate Plus 125 μL，充分混匀；室温静置15-20 min;（转染复合物即用即配，配置好了室温静置不宜超过30min）
4. 裸鼠尾部碘酒或酒精消毒，远端1/3处静脉注射；或肿瘤原位多点注射。注射完成后移去针头，按压针孔10秒以上，防止药液流出；
5. 注射3天后，转染效率可达到高峰期，可取样检测相关基因、蛋白的表达；或进行其他检测。

注：① 复合物制备过程中，确保管壁无液体残留；

② 静脉或腹腔注射体系建议200 μL；

③ 肿瘤原位注射建议原位多点，慢慢推入，总注射体系50 μL；

④ 尾静脉注射一般选用远端1/3处，如感觉到阻力和轻微隆起，需停止，再重新寻找静脉进行操作，否则易导致尾部溃烂。

常见问题及解决方案

细胞转染常见问题

- 转染时细胞密度不合适

多数情况下，当细胞密度达到60%～80%时转染可以取得较高的转染效率。然而细胞类型不同，最适的转染密度也不尽相同。建议优先通过预实验寻找最佳的转染密度，并在后续实验中保持这个密度。

- 细胞状态偏差

传代次数太少或者太多都将导致细胞对转染试剂敏感度的改变。因此，为了提高转染效率以及转染稳定性、降低细胞毒性，应尽量使用适度传代的细胞系，并在不同次实验时保持细胞传代次数的一致性。

- RNA oligo 质量偏低

为实现高效率、低毒性的转染，应使用高质量的RNA oligo (高纯度、无菌、无内毒素)。

- GP-siRNA-Mate Plus /RNAoligo 的比例不佳

通过预实验测试GP-siRNA-Mate Plus/RNA oligo 的最佳比例。在后续的实验中选择转染效率高、细胞毒性低的比例进行转染。

- GP-siRNA-Mate Plus/RNA oligo复合物含有稀释试剂

当包装反应体系中存在稀释试剂，会阻碍GP-siRNA-Mate Plus与RNA oligo形成复合物。

- GP-siRNA-Mate Plus/RNA oligo复合物加入培养基时分布不均匀

局部GP-siRNA-Mate Plus/RNA oligo复合物浓度过高是导致细胞毒性偏高最常见的原因之一。当复合物添加到培养基混合均匀后，平置培养皿，并前后、左右轻轻晃动。

- 细胞较难转染

若第一次转染后转染效率不理想,可在转染后第二天继续添加核酸-GP-siRNA-Mate Plus复合物进行转染,可进一步提转染效率。

动物体内转染常见问题

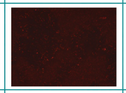
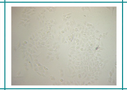
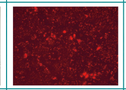
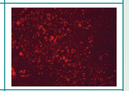
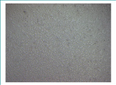
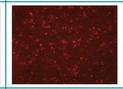
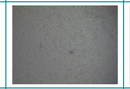
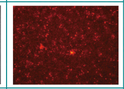
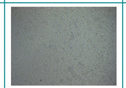
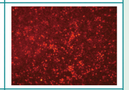
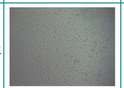
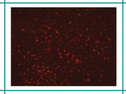
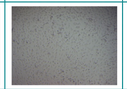
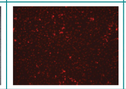
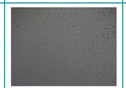
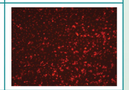
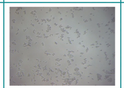
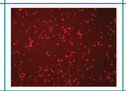
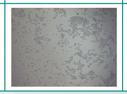
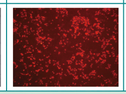
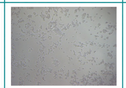
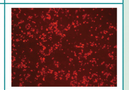
常见问题	可能原因	解决方案
转染复合物出现沉淀	核酸溶剂用PBS或生理盐水等	用无菌水溶解
	核酸终浓度过高	推荐终浓度不超过0.5 μg/μL
	转染复合物存储不当	转染复合物室温放置不宜超过30min
动物出现明显炎症反应或死亡	核酸纯度不高，有内毒素	采用纯度高无内毒素核酸
	一次注射核酸剂量太高，超过动物耐受范围	降低核酸用量，具体可以先用一两只动物做预实验，摸索下最佳浓度
	操作不当	注射时注意规范操作
	转染复合物有沉淀，未去除	见问题一
实验结果不佳	核酸效价不高	用高质量核酸
	核酸剂量不够	在不引起动物炎症反应或死亡的前提下，提高核酸用量
	给药时间不够	适当延长给药时间或是缩短给药间隔时间
	复合物制备过程中操作不当	详见体内转染操作步骤

包装规格和使用限制

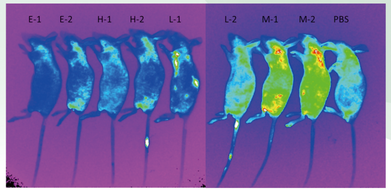
本转染试剂包装规格GP-siRNA-Mate Plus100 μL和1 mL，以上产品仅限科研用途。

案例信息

体外转染细胞评估案例

Oligo用量（20 μM）	0.4 μL (GP-siRNA-Mate Plus)		0.5 μL (GP-siRNA-Mate Plus)		0.6 μL (GP-siRNA-Mate Plus)	
细胞	白光视野	荧光视野	白光视野	荧光视野	白光视野	荧光视野
LMH鸡肝癌细胞						
293T人胚胎肾细胞						
CAFs卵巢癌相关成纤细胞						
raw264.7小鼠巨噬细胞						

体内转染动物评估案例



备注：以上SPF级别4~6 weeks BALB/c-nude小鼠经尾静脉注射入裸鼠体内1~2 OD配合10~30 μL不同转染试剂，注射4h后活体成像仪活体成像仪（kodak in-vivo imagin system 1-X pro）观测CY3体内分布。
M-1/M-2代表吉玛的GP-siRNA-Mate Plus。

附录

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
96 孔板	0.3	0.1	5000 ± 2500	$2\sim5\times10^4$
24 孔板	2	0.5	25000 ± 10000	$1\sim2.5\times10^5$
12 孔板	4	1	50000 ± 20000	$2\sim5\times10^5$
6 孔板	10	2	150000 ± 50000	$0.4\sim1\times10^6$
60 mm	20	4	400000 ± 100000	$1\sim2.5\times10^6$
100 mm	60	10	1×10^6 ± 250000	$2\sim5\times10^6$

注：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 60~80%。

表2：不同培养板转染RNA oligo的推荐转染条件

培养器皿	Growth Medium	RNA转染	
		RNA/μL (20 μM)	转染试剂/μL
96 孔板	100 μl	0.4~0.6	0.4~0.6
24 孔板	500 μl	0.8~1.2	0.8~1.2
12 孔板	1 mL	1.6~2.5	1.6~2.5
6 孔板	2 mL	3.5~5	3.5~5
60 mm	5 mL	7~15	7~15
100 mm	10 mL	25~35	25~35

注： RNA oligo(μl)与GP-siRNA-Mate Plus(μl)的比例为1:1,可根据此比例自行设计用量。

表3:GP-siRNA-Mate Plus转染注射推荐剂量

动物	注射方式	20 uM siRNA用量（μL）	转染试剂用量（μL）	最大注射体积（μL）
成年小鼠	尾静脉	60	60	400
	腹腔	100	100	800
	脑室	2.5	2.5	5
	肿瘤内	15	15	50
裸鼠	尾静脉	60	60	400
	肿瘤内	15	15	50
新生小鼠	脑室	1	1	2
成年大鼠	尾静脉	500	500	2
	脑室	15	15	25

GenePharma Co., Ltd
www.genepharma.com
股票代码：430601

苏州吉玛基因股份有限公司
苏州工业园区东平街199号
bio@genepharma.com
szsupport@genepharma.com
0512-86668828

上海吉玛制药技术有限公司
上海张江高科技园区哈雷路1011号
rnaisupport@genepharma.com
support@genepharma.com
021-51320195

B021-V001-20180116