



RNAi-Mate转染试剂操作手册

吉玛基因



www.genepharma.com

吉玛基因
B013_v001-20141210

RNAi-Mate转染试剂操作手册

产品简介

RNAi-Mate转染试剂适用于核酸的体外操作,可应用于DNA,RNA,反义寡核苷酸,siRNA等转染,也可用于DNA/siRNA共转染操作。现有的商业化siRNA转染试剂已不能满足高通量siRNA转染实验的需求。因此,GenePharma公司推出一种新的高效siRNA转染试剂—RNAi-Mate转染试剂。

应用领域

- ◆原代培养细胞和转化细胞株的基因转染;
- ◆siRNA高通量转染试验;
- ◆DNA转染;
- ◆DNA和siRNA共转染;
- ◆贴壁细胞和悬浮细胞转染。

特点

- ◆不必更换培养基,操作简便易行,重复性好,可在半小时内完成操作介导siRNA高效转染细胞;
- ◆在含血清培养基中也能表现高转染效率;
- ◆可在室温下运输,在-20°C下可长期保存;
- ◆适用细胞广泛:即用型试剂,可在含有抗生素的完全培养基中转染,操作简便;
- ◆确保无RNase污染。

| 目录号 | 产品说明 | 规格 | 价格 | 交货期限 |
|------|---------------|-------|-------|--------|
| C-01 | RNAi-Mate转染试剂 | 0.1mL | ¥ 160 | 2 个工作日 |

操作方法

一、体外转染方法

1. 细胞培养

可广泛应用于多种细胞系的DNA和siRNA转染。已成功地应用于多种代表各种来源的细胞类型,包括Hela(人宫颈癌细胞), MCF-7(人乳腺癌细胞), Hep3B(人肝细胞癌细胞), COS-7(猴肾细胞), Neuro-2a(鼠神经母细胞瘤细胞), NIKS(人角质化细胞), C6(鼠神经胶质瘤细胞), DLD-1(人结肠癌细胞), NIH/3T3(鼠胚胎成纤维细胞), HT-29(人结肠腺癌细胞), A549(人肺癌细胞), CHO-k1(仓鼠卵巢细胞)和293(腺病毒5 DNA转化的人胚胎肾细胞), SVRbag4细胞。

建议在转染实验开始前,将细胞培养在细胞板上,加入合适的培养基,在24小时内使细胞汇合达到70-90%。

表一 细胞培养器皿和使用

| 细胞培养用品 | 表面积(mm ² /孔) | 细胞密度 | 培养基(μL/孔) |
|--------|-------------------------|---------------------------------------|-----------|
| 96孔板 | 50 | 1.5×10^4 - 5.0×10^4 | 100μL |
| 48孔板 | 100 | 3.0×10^4 - 1.0×10^5 | 200μL |
| 24孔板 | 200 | 8.0×10^4 - 2.0×10^5 | 500μL |
| 12孔板 | 401 | 1.6×10^5 - 4.0×10^5 | 1.0 mL |
| 6孔板 | 962 | 3.0×10^5 - 8.0×10^5 | 2.0 mL |
| 35 mm | 962 | 3.0×10^5 - 8.0×10^5 | 2.0 mL |
| 60 mm | 2827 | 1.0×10^6 - 2.5×10^6 | 6.0 mL |

2. 选择合适的RNAi-Mate: siRNA/DNA比例

合适的siRNA(DNA):RNAi-Mate比例对核酸的高效转染有重要影响;我们推荐的DNA:RNAi-Mate为1:0.5-1:5(μg:μl), siRNA:RNAi-Mate为1:0.01-1:0.1(pmol:μl)一般情况下,此范围内都可获得高的转染效率。

表二 DNA转染细胞的RNAi-Mate:DNA推荐量

| 细胞培养用品 | DNA | 培养基最终体积 | RNAi-Mate |
|--------|-------|---------|-----------|
| 96孔板 | 0.2μg | 100μL | 0.5μl |
| 24孔板 | 0.8μg | 500μL | 2μl |
| 12孔板 | 1.6μg | 1 mL | 4μl |
| 6孔板 | 4.0μg | 2 mL | 10μl |
| 35 mm | 4.0μg | 2 mL | 10μl |
| 60 mm | 8.0μg | 5 mL | 20μl |

表三 siRNA转染细胞的RNAi-Mate:siRNA推荐量

| 细胞培养用品 | siRNA | 培养基最终体积 | RNAi-Mate |
|--------|----------|---------|-----------|
| 96孔板 | 5pmol | 100μL | 0.25μl |
| 24孔板 | 20pmol | 500μL | 1μl |
| 12孔板 | 40 pmol | 1 mL | 2μl |
| 6孔板 | 100 pmol | 2 mL | 5μl |
| 35 mm | 100 pmol | 2 mL | 5μl |
| 60 mm | 600 pmol | 5 mL | 10μl |

3.贴壁细胞转染程序

本程序适用于使用24孔板贴壁培养细胞的转染。选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。siRNA(DNA)和DNA的用量和两者的比例可在推荐范围内适当调整。

3.1 转染前一天, $4-5 \times 10^4$ 细胞接种在24孔板上, 0.5mL含FBS和抗生素的细胞培养基。

3.2 选择用于初期接种的细胞数量, 应能在24小时内使细胞汇合达到70-90%。

3.3 在50 μ l的DMEM(或Opti-MEM,或其他无血清培养基)无血清培养基加入20pmol siRNA(或0.8 μ g DNA), 柔和混匀。

3.4 混匀RNAi-Mate试剂, 用50 μ l无血清的DMEM或Opti-MEM, 或其他无血清培养基)稀释1 μ l RNAi-Mate试剂(DNA转染时, 则加入2 μ l RNAi-Mate试剂), 轻轻混匀, 室温放置5分钟。

3.5 将稀释好的siRNA和RNAi-Mate试剂混合; 轻柔混匀, 室温放置20分钟, 以便形成siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物。

3.6 将100 μ l siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中, 来回轻柔摇晃细胞培养板。

3.7 细胞在CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C温育24h-48h后, 进行转染后的其它检测步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育4-6小时后, 除去复合物, 更换培养基。

4.悬浮细胞转染程序

本程序适用于使用24孔板悬浮细胞的转染。选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。siRNA(DNA)和DNA的用量和两者的比例可在推荐范围内适当调整。

4.1 转染的当天, 收集细胞离心, 重悬。

4.2 在50 μ l的DMEM(或Opti-MEM, 或其他无血清培养基)无血清培养基加入20pmol siRNA(或0.8 μ g DNA), 柔和混匀。

4.3 混匀RNAi-Mate试剂, 用50 μ l无血清的DMEM或Opti-MEM, 或其他无血清培养基)稀释 1 μ l RNAi-Mate试剂(DNA转染时, 则加入2 μ l RNAi-Mate试剂), 轻轻混匀, 室温放置5分钟。

4.4 将稀释好的siRNA和RNAi-Mate试剂混合; 轻柔混匀, 室温放置20分钟, 以便形成siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物。

4.5 将100 μ l siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中, 来回轻柔摇晃细胞培养板。

4.6 再加入400 μ l细胞悬浮液(细胞数量决定于细胞类型和转染后分析测试的时间)。

4.7 细胞在37 $^{\circ}$ C温育24h-48h后进行转染后的其它步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育4-6小时后, 除去复合物, 更换培养基。

5.DNA和siRNA共转染细胞

5.1 在转染的前一天, $4-5 \times 10^4$ 细胞接种在24孔板上, 0.5mL含FBS和抗生素的细胞培养基。

5.2 选择用于初期接种的细胞密度, 应能在24小时内使细胞汇合达到70-90%。

5.3 在50 μ l的DMEM(或Opti-MEM,或其他无血清培养基)无血清培养基加入20pmol siRNA及0.2 μ g DNA, 柔和混匀。

5.4 混匀RNAi-Mate试剂, 用50 μ l无血清的DMEM或Opti-MEM, 或其他无血清培养基)稀释 2 μ l RNAi-Mate试剂, 轻轻混匀, 室温放置5分钟。

5.5 将稀释好的siRNA, DNA和RNAi-Mate试剂混合; 轻柔混匀, 室温放置20分钟, 以便形成 siRNA/DNA/RNAi-Mate复合物。

5.6 将siRNA/DNA/RNAi-Mate复合物加入培养基中, 轻轻混匀。

5.7 细胞在37 $^{\circ}$ C温育24h-48h后进行转染后的其它步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育4-6小时后, 除去复合物, 更换培养基。

二、常见问题与建议

1. 转染效率低

| 问题 | 建议 |
|---------------------------------------|---|
| RNAi-Mate:siRNA(DNA)未优化 | 我们推荐的DNA:RNAi-Mate为1:0.5-1:5($\mu\text{g}:\mu\text{l}$), siRNA:RNAi-Mate为1:0.01-1:0.1($\text{pmol}:\mu\text{l}$) |
| siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物浓度低 | 可适当提高siRNA/RNAi-Mate(DNA/RNAi-Mate)复合物的浓度 |
| 细胞生长状态不好 | 非最佳状态的细胞会降低转染效率,建议细胞接种后在24小时内达到70-90%,并在24小时内完成转染 |
| DNA或siRNA纯度太低 | 使用高质量的DNA或siRNA,最好使用柱纯化的DNA和HPP级的siRNA |
| 稀释DNA或siRNA的培养基中含血清 | 一般情况下,血清不会明显降低siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物的形成,建议使用不含血清的培养基稀释DNA或siRNA |

)%

| 问题 | 建议 |
|-----------|-----------------------------|
| 细胞汇合情况不一致 | 使用相同数量的种子细胞,接种后的培养时间,培养条件一致 |
| 细胞传代次数太多 | 使用传代次数较低的细胞 |

3. 细胞出现明显死亡

| 问题 | 建议 |
|--|---|
| 与细胞生存相关的关键基因被关闭 | 重新设计实验 |
| 细胞状态欠佳 | 使用传代次数较低的细胞;细胞接种后在24小时内达到70-90%,并在24小时内完成转染 |
| siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)复合物浓度过高 | siRNA/RNAi-Mate(或DNA/RNAi-Mate)浓度过高时,有时也会产生毒性 |

4. 基因表达或基因沉默效果差

| 问题 | 建议 |
|---------------------|---------------------|
| 表达载体设计不对或siRNA设计不正确 | 重新设计实验 |
| 转染后培养时间过短 | 基因需要一定时间表达,适当延长培养时间 |

三、质量保证与服务

上海吉玛制药技术有限公司对RNAi-Mate基因转染试剂的每批产品实行严格质量检验,并进行转染验证,以确保其产品质量,提供技术支持。如该试剂存在质量问题,而非操作不当造成,本公司将免费提供更换。请用户在使用本产品前,务必认真阅读本手册。