



GenePharma

RNAi-Mate转染试剂操作手册



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℃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°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°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°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

51

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。