

使用 GeticoFect™ RNAiMax 进行 siRNA 转染操作流程

1. 实验目的

本标准操作流程（SOP）旨在指导科研人员使用 RNAiMAX 转染试剂，高效地将小干扰 RNA（siRNA）导入哺乳动物细胞（包括悬浮细胞和贴壁细胞），以实现特定基因的沉默或表达调控。

2. 适用范围

本 SOP 适用于使用 RNAiMAX 转染试剂进行的 siRNA 转染实验，适用于多种哺乳动物细胞类型，包括悬浮细胞和贴壁细胞。可根据实验需求调整实验规模，适用于从 96 孔板到 100mm 培养皿等不同规格的培养容器。

3. 材料准备

3.1 试剂

- Opti-MEM I 低血清培养基
- RNAiMAX 转染试剂
- 目标 siRNA（浓度为 10 μ M/L）
- 无血清细胞培养基
- 完全生长培养基（不含抗生素）

3.2 耗材

- 24 孔组织培养板（其他规格根据实验需求选择）
- 移液器及枪头
- 离心管
- CO₂培养箱
- 倒置显微镜

4. 操作步骤

4.1 正向转染（Forward Transfection）

适用于贴壁细胞，先铺板细胞，次日制备转染复合物并加入细胞中。

4.1.1 细胞铺板

- 转染前一天，在 24 孔板中每孔加入 500 μ l 不含抗生素的生长培养基，接种细胞，确保转染时细胞汇合度达到 30%-50%。

4.1.2 制备 siRNA-RNAiMAX 复合物

- 对于每孔，在离心管中加入 50 μ l Opti-MEM I 低血清培养基（不含血清），再加入 6pmol 的 siRNA，轻轻混匀。
- 轻轻混匀 RNAiMAX 试剂后，取 1 μ l 加入到另一个离心管中，加入 50 μ l Opti-MEM I 低血清培养基（不含血清），轻轻混匀。
- 将稀释后的 siRNA 溶液与稀释后的 RNAiMAX 溶液混合，轻轻混匀，室温孵育 10-20 分钟。

4.1.3 转染

- 将制备好的 siRNA-RNAiMAX 复合物加入到含有细胞的 24 孔板中，每孔终体积为 600 μ l，siRNA 终浓度为 10nM。轻轻晃动培养板，使复合物均匀分布。
- 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 24-48 小时，直至进行基因敲低检测。4-6 小时后可更换培养基。

4.2 反向转染（Reverse Transfection）

适用于悬浮细胞和贴壁细胞，先在孔内制备转染复合物，再加入细胞悬液。

4.2.1 制备 siRNA-RNAiMAX 复合物

- 在 24 孔板的每孔中加入 100 μ l Opti-MEM I 低血清培养基（不含血清），再加入 6pmol 的 siRNA，轻轻混匀。
- 轻轻混匀 RNAiMAX 试剂后，取 1 μ l 加入到含有稀释后 siRNA 的孔中，轻轻混匀，室温孵育 10-20 分钟。

4.2.2 细胞稀释

- 用不含抗生素的完全生长培养基稀释细胞，使 500 μ l 培养基中含有的细胞数量在接种后 24 小时达到 30%-50% 汇合度。对于悬浮细胞，每孔接种 20,000-50,000 个细胞。

4.2.3 转染

- 将 500 μ l 稀释后的细胞悬液加入到含有 siRNA-RNAiMAX 复合物的孔中，每孔终体积为 600 μ l，siRNA 终浓度为 10nM。轻轻晃动培养板，使细胞均匀分布。
- 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 24-72 小时，直至进行基因敲低检测。

4.3 不同培养格式的缩放比例

根据实验需求，可按以下表格调整 RNAiMAX、siRNA、细胞和培养基的用量，以适应不同规格的培养容器。

细胞类型	培养容器	相对表面积	铺板培养基体积	每孔接种细胞数	每孔接种细胞数可接受范围	反向转染稀释培养基体积 (μ l)	正向转染稀释培养基体积 (μ l)	siRNA 推荐用量 (pmol)	RNAiMAX 推荐用量 (μ l)
贴壁细胞	96 孔板	0.2	100 μ l	10,000	7,500-15,000	20	2 \times 10	0.12-6	0.1-0.3
贴壁细胞	48 孔板	0.4	200 μ l	20,000	1,500-30,000	40	2 \times 20	0.24-12	0.2-0.6
贴壁细胞	24 孔板	1	500 μ l	50,000	4,000-75,000	100	2 \times 50	0.6-30(6)	0.5-1.5 (1)
贴壁细胞	6 孔板	5	2.5ml	250,000	200,000-375,000	500	2 \times 250	3-150(30)	2.5-7.5 (5)
贴壁细胞	60mm 培养皿	10	5ml	-	400,000-750,000	1ml	2 \times 500	6-300	5月15日
贴壁细胞	100mm 培养皿	30	10ml	-	800,000-1,500,000	2ml	2 \times 1ml	12-600	15-35
悬浮细胞	1ml 管	-	1ml	-	40,000-100,000	0.2ml	0.2ml	1.2-60	1.5-3.5
悬浮细胞	10ml 管	-	10ml	-	400,000-1,000,000	2ml	2ml	12-600	15-35

5. 注意事项

- **细胞类型选择:** 对于易于转染的细胞系，正向和反向转染均可使用；对于难转染的细胞系（如 HepG2），推荐使用反向转染。
- **抗生素使用:** 转染过程中不要在培养基中添加抗生素，以免导致细胞死亡。
- **转染试剂活性范围:** RNAiMAX 在较宽的细胞密度和转染试剂体积范围内均有较好的活性，具体可参考“最大活性可接受范围”（第 3 页）。
- **细胞汇合度控制:** 确保转染时细胞汇合度在 30%-50%，以保证转染效率和细胞健康。
- **复合物孵育时间:** siRNA 与 RNAiMAX 的复合物需在室温下孵育 10-20 分钟，以确保充分形成。
- **培养基更换:** 正向转染后 4-6 小时可更换培养基，以减少转染试剂对细胞的潜在毒性。

6. 实验记录

实验过程中应详细记录以下信息：

- 实验日期、操作人员。
- 细胞类型、来源及代数。
- 转染方法（正向或反向）。
- 使用的 siRNA 序列、浓度及供应商。
- 转染试剂用量、培养条件（温度、CO₂浓度等）。
- 转染后细胞培养时间及基因敲低检测方法和结果。