

NO.HBRG-RF-004

RNAFit

RNA专用转染试剂操作说明

HANBIO  **汉恒生物**

RNAFit RNA 专用转染试剂操作说明

介绍: RNAFit 是一种功能强大的 siRNA / miRNA 转染试剂, 可确保多种小RNA在哺乳动物细胞中进行高效的转染, 并具有高重复性。在绝大多数细胞 (如 HeLa, MCF7 或 NIH-3T3) 中使用 RNAFit 转染低浓度的 siRNA, 就可以达到超过 90% 的转染效率; 对于难以转染的悬浮细胞如 K562、THP-1 细胞等, 使用 RNAFit 转染 siRNA, 也可以观察到超过 80% 的转染效率。

一、贴壁细胞转染操作步骤

1. 贴壁细胞接种

转染前一天将细胞接种到相应的培养板中, 以转染时细胞汇合度达到 30-50% 为宜, 见表 1。

表1. 转染前一天推荐接种的细胞数

培养板规格	接种细胞数量	每孔表面积	培养基体积
96-well	$0.5 \times 10^4 \pm 0.25 \times 10^4$	0.3cm ²	0.2 ml
24-well	$2.5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	1.9 cm ²	0.5 ml
12-well	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$	3.8 cm ²	1 ml
6-well / 3.5 cm	$1.5 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$	9.4 cm ²	2ml
6 cm 培养皿 / T25 瓶	$4 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$	25 - 28 cm ²	5ml
10 cm 培养皿 / T75 瓶	$1 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$	75 - 78.5 cm ²	10ml
14 cm 培养皿 / T175 瓶	$2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$	153 - 175 cm ²	20 ml

2. 贴壁细胞转染

为了提高转染效率, 建议 siRNA / miRNA 浓度范围为 10nM 至 100nM, RNAFit 用量与 siRNA / miRNA 浓度和培养皿规格进行匹配, 见表 2。

表2. 贴壁细胞推荐转染条件

培养板规格	siRNA/miRNA 终浓度	siRNA/miRNA 物质的量/质量	完全培养基体积	无血清培养基	培养基总体积	20uM 母液使用量	RNAFit 体积 ul
96-well	10-100nM	2-20pmol /0.032-0.32ug	150 ul	50 μl	200ul	0.1-1ul	0.2- 3ul
24-well	10-100nM	5-50 pmol /0.08-0.8ug	400 ul	100 μl	500ul	0.25-2.5 ul	0.5-7.5ul
12-well	10-100nM	10-100 pmol /0.16-1.6ug	800 ul	200 μl	1ml	0.5-5 ul	1-15ul
6-well	10-100nM	20-200 pmol /0.32-3.2ug	1.8 ml	200 μl	2ml	1-10 ul	2-30ul
6 cm	10-100nM	50-500 pmol /0.8-8ug	4.6 ml	400 μl	5ml	2.5-25 ul	5-75ul
10 cm	10-100nM	100-1000pmol /1.6-16ug	9.5 ml	500 μl	10ml	5-50ul	10-150ul

2.1 siRNA/miRNA配置

将siRNA/miRNA用RNase-free H₂O配制成20uM储存液以供后续使用，配置体系见表3。

表3. 20uM siRNA/miRNA储存液的配置方法

siRNA/miRNA(nmoL)	2.5	5	10	50
RNase-free H ₂ O (uL)	125	250	500	2500

注：10D=2.5nmols=40 μg

2.2 转染操作（以24孔板转染10nM的siRNA为参考）

- 1) 将0.25ul 20uM的siRNA双链加入到100 μl无血清培养基或Opti-MEM中，用移液枪轻轻吹打3~5次混匀。
- 2) 向上述100 μl混合物中加入0.75μl的 RNAFit，并立即涡旋振荡10s进行混匀。
- 3) 室温孵育10min使双链 siRNA和 RNAFit形成转染复合物，孵育时间不要超过30min。
- 4) 与此同时，吸弃培养皿中的原培养液，换成0.4 ml预热的新鲜含血清的完全培养基。
- 5) 将步骤3中孵育好的100 μl转染复合物加入到换液后的待转染孔中，一字法轻摇细胞板混匀。每孔中培养基的最终体积为500 μl，siRNA终浓度为10nM。
- 6) 转染后细胞放置于培养箱中正常培养。
- 7) 24~72 h后，qPCR及Western Blot检测siRNA干扰效果。

注：针对比较敏感细胞，建议转染后4-6h进行一次换液

二、悬浮细胞转染

1. 悬浮细胞接种

为了使用RNAFit转染悬浮细胞取得最佳的转染效果，与常规培养条件相比，应在转染当天减少培养基体积接种细胞，可以使用半液转染法。对于不同规格的培养板，建议接种的细胞数量及完全培养基体积，见表4。

表4. 转染当天悬浮细胞接种量

培养板规格	接种细胞数量	接种细胞悬液体积
96-well	1 x 10 ⁴ - 2 x 10 ⁴	50 μl
24-well	1 x 10 ⁵ - 2 x 10 ⁵	150 μl
12-well	2 x 10 ⁵ - 4 x 10 ⁵	300 μl
6-well / 3.5 cm	5 x 10 ⁵ - 2 x 10 ⁶	800ul

2. 悬浮细胞转染

针对悬浮细胞，为了达到较高的转染效率，建议使用20 nM-100nM的高 siRNA/miRNA浓度范围进行转染摸索，同时适当提高转染试剂 RNAfit 的使用量：具体各指标参考数据见表5。

表5. 悬浮细胞推荐转染条件

培养板规格	siRNA/miRNA 终浓度	siRNA/miRNA 物质的量/质量	细胞悬液 体积	无血清 培养基	转染 总体积	20uM 母液使用量	RNAFit 体积	6h 后 补液体 积
96-well	20-100nM	2-10pmol /0.032-0.16ug	50 μ l	50 μ l	100 μ l	0.1-0.5ul	0.2-1.5ul	100 μ l
24-well	20-100nM	5-25 pmol /0.08-0.4ug	150 μ l	100 μ l	250 μ l	0.25-1.25ul	0.5-3.75ul	250 μ l
12-well	20-100nM	10-50 pmol /0.16-0.8ug	300 μ l	200 μ l	500 μ l	0.5-2.5 ul	1-7.5ul	500 μ l
6-well	20-100nM	20-100 pmol /0.32-1.6ug	800 μ l	200 μ l	1ml	1-5ul	2-15ul	1ml
6 cm	20-100nM	50-250 pmol /0.8-4ug	2ml	500 μ l	2.5ml	2.5-12.5 ul	5-37.5ul	2.5ml

3、转染操作（以24孔板转染100nM的siRNA为参考）

- 1) 将1.25 μ l 20uM 的siRNA 双链加入到 100 μ l 无血清培养基或 Opti-MEM 中, 用移液枪轻轻吹打 3~5 次混匀。
- 2) 向上述 100 μ l 混合物中加入3.75 μ l 的 RNAFit, 并立即涡旋振荡10s进行混匀。
- 3) 室温孵育10min使双链 siRNA和 RNAFit形成转染复合物, 孵育时间不要超过 30min。
- 4) 将步骤 3 中孵育好的 100 μ l 转染复合物加入到 150 μ l 含血清完全培养基的细胞悬液待转染孔中, 一字法轻摇细胞板混匀。每孔中培养基的最终体积为 250 μ l, siRNA 终浓度为 100nM, 6h 后补液 250 μ l。
- 5) 转染后细胞放置于培养箱中正常培养。
- 6) 24~72 h 后, qPCR 及 Western Blot 检测 siRNA 干扰效果。

注: 针对比较敏感细胞, 建议转染后4-6h进行一次换液。

三、疑难解答

问题	解决建议
转染效率低	增加每孔中siRNA浓度。
	增加每孔中RNAFit的量。
	检测转染24h~96h的不同时间点的沉默效率。
	用opti-MEM稀释siRNA。
	确保贴壁细胞在转染当天汇合度达到30-50%。对于小细胞和生长缓慢的细胞类型，每孔中接种约2倍数量的细胞以达到足够的汇合度。
	确认所有试剂是否不含RNase。
	确保 siRNA是高质量的（PAGE 纯化和脱盐）
	确认siRNA双链体的浓度和退火条件。
	将转染期间的培养基体积减少一半并低速离心培养板（180g，5 分钟）4小时后，加入0.5毫升培养基。
细胞毒性大	通过在转染后4至6小时更换培养基或简单地向培养基中添加新鲜培养基，减少RNAFit/ siRNA复合物与细胞的孵育时间。
	减少转染试验中使用的RNAFit的体积。
	核实沉默靶基因后是否影响细胞活力。