

RNATrans™ RNA 专用转染试剂操作说明

Version 1.0

产品编号	产品名称	规格	保存条件
PZ-RTS1000	RNATrans™ RNA 专用转染试剂	1ml	4℃保存, 一年有效 (避免反复冻融)
PZ-RTS3000	RNATrans™ RNA 专用转染试剂	3ml	4℃保存, 一年有效 (避免反复冻融)
PZ-RTS5000	RNATrans™ RNA 专用转染试剂	5ml	4℃保存, 一年有效 (避免反复冻融)

❖ RNA Trans™ 简介

RNATrans 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 RNATrans 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 RNATrans 转染 siRNA, 也可以观察到超过 80% 的转染效率。

❖ RNA Trans™ 优点

- 转染效率高, 重复性好, 操作简单。
- 无明显细胞毒性, 对于大多数细胞 72 小时内不更换培养液无明显细胞毒性。
- 对于贴壁细胞和悬浮细胞都适用。

❖ 贴壁细胞转染说明

1. 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。

2. 细胞转染

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

培养板规格	siRNA/mimics 终浓度	siRNA/mimics 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	RNATrans 体积
96-well	10-100nM	2-20pmol /0.032-0.32ug	150 ul	50ul	200ul	0.1-1ul	0.2-3ul
24-well	10-100nM	5-50 pmol /0.08-0.8ug	400ul	100ul	500ul	0.25-2.5ul	0.5-7.5ul
12-well	10-100nM	10-100 pmol /0.16-1.6ug	800ul	200ul	1ml	0.5-5ul	1-15ul
6-well	10-100nM	20-200 pmol /0.32-3.2ug	1.8ml	200ul	2ml	1-10ul	2-30ul
6cm	10-100nM	50-500 pmol /0.8-8ug	4.6ml	400ul	5ml	2-20ul	4-60ul
10cm	10-100nM	125-1250pmol /2-20ug	9.5ml	500ul	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，配置体系可参考下表。

siRNA/mimics(nmol)	2.5	5	10	50
RNase-free H ₂ O(ul)	125	250	500	2500

注：10D=2.5nmols=40μg

2.2 转染操作（以 24 孔板转染 10nM 的 siRNA 为参考）

- 1) 取 0.25ul 20uM 的 siRNA 母液加入到 100μl 无血清培养基或 Opti-MEM 中，轻轻吹打 3~5 次混匀。
- 2) 向上述 100μl 混合物中加入 2μl 的 RNATrans，并立即涡旋振荡 10s 进行混匀。
- 3) 室温孵育 10min，使 siRNA 和 RNATrans 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 100μl 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 或 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

❖ 悬浮细胞转染说明

1. 悬浮细胞接种

为了获得最佳的转染效果, 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, 可参考下表。

培养板规格	接种细胞数量	接种细胞悬液体积
96-well	$1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$	50ul
24-well	$1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$	150ul
12-well	$2 \times 10^5 - 4 \times 10^5$	300ul
6-well	$5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$	800ul

2. 悬浮细胞转染

针对悬浮细胞, 建议使用 20nM-100nM 浓度的 siRNA/miRNA 浓度范围进行转染摸索, 同时适当提高转染试剂 RNATrans 的使用量。可参考下表。

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	RNATrans 体积	6h 后补液体积
96-well	20-100nM	2-10pmol / 0.032-0.16ug	50ul	50ul	100ul	0.1-0.5ul	0.2-1.5ul	100ul
24-well	20-100nM	5-25 pmol / 0.08-0.40ug	150ul	100ul	250ul	0.25-1.25ul	0.5-3.75 ul	250ul
12-well	20-100nM	10-50 pmol / 0.16-0.8ug	300ul	200ul	500ul	0.5-2.5ul	1-7.5 ul	500ul
6-well	20-100nM	20-100 pmol / 0.32-1.6ug	800ul	200ul	1ml	1-5ul	2-15 ul	1ml
6cm	20-100nM	50-250 pmol / 0.8-4ug	2ml	500ul	2.5ml	2.5-12.5ul	2.5-37.5 ul	2.5ml

2.1 转染操作 (以 24 孔板转染 100nM 的 siRNA 为参考)

1) 取 2.5ul 20uM 的 siRNA 双链加入到 100ul 无血清培养基或 Opti-MEM 中, 轻轻吹打 3~5 次混匀。

- 2) 向上述 100 μ l 混合物中加入 5 μ l 的 RNATrans，并立即涡旋振荡 10s 进行混匀。
- 3) 室温孵育 10min 使双链 siRNA 和 RNATrans 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，6h 后补液 250 μ l，siRNA 终浓度为 100nM。
- 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 进行补齐后换液。

❖ 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 RNATrans 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 RNATrans/ siRNA 复合物与细胞的孵育时间
	减少转染试验中使用的 RNATrans 的体积
	核实沉默靶基因后是否影响细胞活力