

# RNAFit-RNA 专用转染试剂操作说明



Version: HBRG-RF-004

## 产品信息

产品名称	RNAFit-RNA 专用转染试剂
货号	HB-RF-1000
存储及运输条件	4°C保存，冰袋运输
规格	1mL
有效期	1 年

## 产品简介

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。

## 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	$0.5 \times 10^4 \pm 0.25 \times 10^4$	$0.3 \text{ cm}^2$	0.2 ml
24-well	$2.5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$1.9 \text{ cm}^2$	0.5 ml
12-well	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$	$3.8 \text{ cm}^2$	1 ml
6-well / 3.5 cm	$1.5 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$	$9.4 \text{ cm}^2$	2ml
6 cm 培养皿 / T25 瓶	$4 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$	$25 - 28 \text{ cm}^2$	5ml
10 cm 培养皿 / T75 瓶	$1 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$	$75 - 78.5 \text{ cm}^2$	10ml
14 cm 培养皿 / T175 瓶	$2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$	$153 - 175 \text{ cm}^2$	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 $\mu$ l	200ul	0.1-1ul	0.2- 3ul
24-well	10-100nM	5-50 pmol /0.08-0.8ug	400 ul	100 $\mu$ l	500ul	0.25-2.5 ul	0.5-7.5ul
12-well	10-100nM	10-100 pmol /0.16-1.6ug	800 ul	200 $\mu$ l	1ml	0.5-5 ul	1-15ul
6-well	10-100nM	20-200 pmol /0.32-3.2ug	1.8 ml	200 $\mu$ l	2ml	1-10 ul	2-30ul
6 cm	10-100nM	50-500 pmol /0.8-8ug	4.6 ml	400 $\mu$ l	5ml	2.5-25 ul	5-75ul
10 cm	10-100nM	100-1000pmol /1.6-16ug	9.5 ml	500 $\mu$ l	10ml	5-50ul	10-150ul

### 2.1 siRNA/miRNA 配置

将 siRNA/miRNA 用 RNase-free H<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> O (uL)	125	250	500	2500

注：10D=2.5nmols=40 $\mu$ g

### 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 混合物中加入 0.75 $\mu$ 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) 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l，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

## 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	$1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$	50 $\mu$ l
24-well	$1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$	150 $\mu$ l
12-well	$2 \times 10^5 - 4 \times 10^5$	300 $\mu$ l
6-well / 3.5 cm	$5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$	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 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100ul	0.1-0.5ul	0.2-1.5ul	100 $\mu$ l
24-well	20-100nM	5-25 pmol /0.08-0.4ug	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	250ul	0.25-1.25ul	0.5-3.75ul	250ul
12-well	20-100nM	10-50 pmol /0.16-0.8ug	300 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500ul	0.5-2.5 ul	1-7.5ul	500ul
6-well	20-100nM	20-100 pmol /0.32-1.6ug	800ul	200 $\mu$ l	1ml	1-5ul	2-15ul	1ml
6 cm	20-100nM	50-250 pmol /0.8-4ug	2ml	500 $\mu$ 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 1.25ul 20uM 的 siRNA 双链加入到 100ul 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 100ul 混合物中加入 3.75ul 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 ul 转染复合物加入到 150ul 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 250ul，siRNA 终浓度为 100nM，6h 后补液 250ul。
- 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。

### 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。
细胞毒性大	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。
	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。