

## 4. 哺乳动物细胞 siRNA 转染

### 4.1 转染方法:

将制备好的 siRNA、siRNA 表达载体或表达框架转导至真核细胞中的方法主要有以下几种：磷酸钙共沉淀；电穿孔法；DEAE-葡聚糖和 polybrene；机械法；阳离子脂质体试剂。目前用的最多的是阳离子脂质体法。

#### 4.1.1 磷酸钙共沉淀

将氯化钙，RNA(或 DNA)和磷酸缓冲液混合，沉淀形成包含 DNA 且极小的不溶的磷酸钙颗粒。磷酸钙-DNA 复合物粘附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质。沉淀物的大小和质量对于磷酸钙转染的成功至关重要。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准，保证质量，因为甚至偏离最优条件十分之一 pH 都会导致磷酸钙转染的失败。

#### 4.1.2 电穿孔法

电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子。将细胞悬浮液置于电场中会诱导沿细胞膜的电压差异，据认为这种电压差异会导致细胞膜暂时穿孔。电脉冲和场强的优化对于成功的转染非常重要，因为过高的场强和过长的电脉冲时间会不可逆地伤害细胞膜而裂解细胞。一般，成功的电穿孔过程都伴随高水平（50%或更高）的毒性。

#### 4.1.3 DEAE-葡聚糖和 polybrene

带正电的 DEAE-葡聚糖或 polybrene 多聚体复合物和带负电的 DNA 分子使得 DNA 可以结合在细胞表面。通过使用 DMSO 或甘油获得的渗透休克将 DNA 复合体导入。两种试剂都已成功用于转染。DEAE-葡聚糖仅限于瞬时转染。

#### 4.1.4 机械法

转染技术也包括使用机械的方法，比如显微注射和基因枪 (biolistic particle)。显微注射使用一根细针头将 DNA，RNA 或蛋白直接转入细胞质或细胞核。基因枪使用高压 microprojectile 将大分子导入细胞。

#### 4.1.5 阳离子脂质体试剂

在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时，其可以形成微小的（平均大小约 100-400nm）单层脂质体。这些脂质体带正电，可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面。因此使用阳离子脂质体转染的原理与以前利用中性脂质体转染的原理不同。使用阳离子脂质体试剂，DNA 并没有预先包埋在脂质体中，而是带负电的 DNA 自动结合到带正电的脂质体上，形成 DNA-阳离子脂质体复合物。据称，一个约 5kb 的质粒会结合 2-4 个脂质体。被俘获的 DNA 就会被导入培养的细胞。现存对 DNA 转导原理的证据来源于内吞体和溶酶体。

## 4.2 转染步骤:

### 4.2.1. 转染的一般性指导 (以 Invitrogen 的 Lipofectamine™ 2000 为例)

- 1) 为了获得最佳基因阻断结果,每一种细胞系转染 siRNA 的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系,推荐尝试使用几个 Lipofectamine™ 2000 的浓度,并在 20-100nM 范围内改变 siRNA 的浓度,以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件。高浓度的 siRNA 可能具有细胞系依赖性。(注:我们推荐开始时使用 40nM siRNA。)
- 2) 在 30-50%细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72 小时进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间更长的间隙更长,从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性,高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。
- 3) 不要在转染时的培养基中加入抗生素,因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。
- 4) 为了获得更好的结果,可以使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释 Lipofectamine™ 2000 和 siRNA。
- 5) 可以使用荧光标记的 siRNA 帮助优化细胞系的转染条件\*。一旦确定了用来转染的最佳条件,可以在每一次实验都包括荧光标记 siRNA,作为转染效率的指示剂。

\*化学合成荧光标记 siRNA 的种类(对应的页码和目录号)

### 4.2.2 常规瞬时转染(以 24 孔板为例)

#### 1) siRNA/shRNA 表达载体的转染

##### I. 准备细胞:

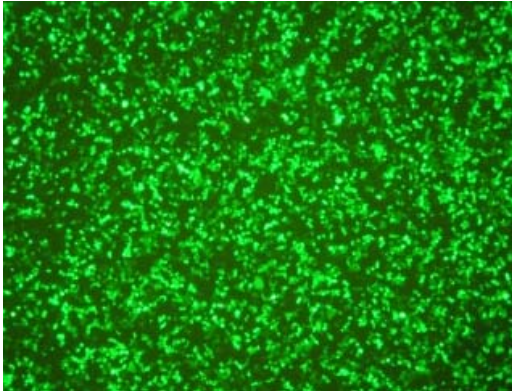
贴壁细胞:转染前 24 hrs,在 500  $\mu$ L 无抗完全培养基中接种  $0.5-2 \times 10^5$  个细胞,转染时细胞融合度为 80 - 90%。(注:铺板时要将细胞消化完全混匀,避免细胞堆积生长。)

悬浮细胞:转染前 24 小时,在 500  $\mu$ L 无抗完全培养基中接种  $0.5-2 \times 10^5$  个细胞,转染时细胞数量应在  $4 - 8 \times 10^5$ /孔。

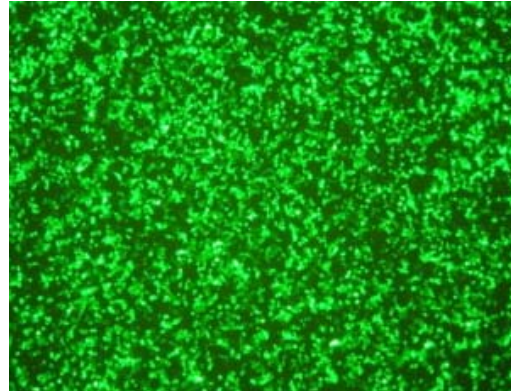
##### II. 对于每个转染样品,按下面的方法准备:

- 用 50  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 0.8  $\mu$ g 质粒 DNA,轻轻吹吸 3 - 5 次混匀。
- 轻轻颠倒混匀转染试剂,用 50  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 2.0  $\mu$ L Lipofectamine™ 2000,轻轻吹吸 3 - 5 次混匀,室温下静置 5 min。
- 混合转染试剂和质粒 DNA 稀释液,轻轻吹吸 3 - 5 次混匀,室温下静置 20 min。
- 转染复合物加入到 24 孔细胞板中,100  $\mu$ L/孔,前后轻摇细胞板混合均匀。
- 将细胞板置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18 - 48 hrs。转染 4 - 6 hrs 后可换新鲜培养基。

A



B



a: pRNAi-U6H1/Neo 质粒转染 BGC-823 细胞 48h 后 GFP 表达荧光图

b: PRNAI-CMV3.1/Neo 质粒转染 HeLa 细胞 48h 后 GFP 表达荧光图

## 2) siRNA 的转染 (24 孔板为例)

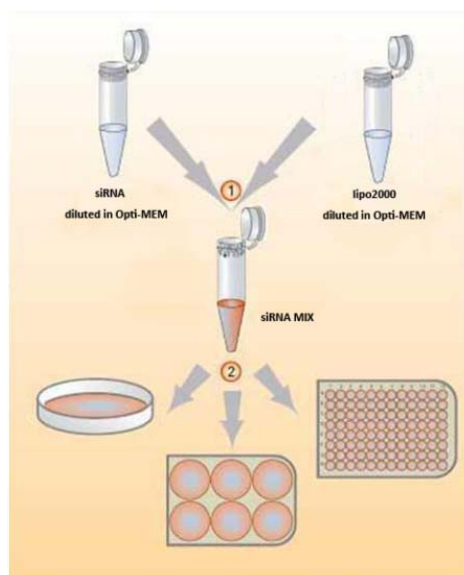
### I. 准备细胞:

贴壁细胞: 转染前 24 hrs, 在 500  $\mu$ L 无抗培养基中接种  $0.5 - 2 \times 10^5$  个细胞, 转染时细胞融合度为 30 - 50 %。(注: 铺板时要将细胞消化完全混匀, 避免细胞堆积生长。)

悬浮细胞: 转染前 24 hrs, 在 500  $\mu$ L 无抗培养基中接种  $0.5 - 2 \times 10^5$  个细胞, 转染时细胞数量应在  $4 - 8 \times 10^5$ /孔。

### II. 对于每个转染样品, 按下面的方法准备:

- 用 50  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 siRNA (转染细胞的终浓度为 33 nM), 轻轻吹吸 3 - 5 次混匀。
- 轻轻颠倒混匀转染试剂, 用 50  $\mu$ L Opti-MEM 稀释 1.0  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 轻轻吹吸 3 - 5 次混匀, 室温下静置 5 min。
- 混合转染试剂和 siRNA 稀释液, 轻轻吹吸 3 - 5 次混匀, 室温下静置 20 min。
- 转染复合物加入到 24 孔细胞板中, 100  $\mu$ L/孔, 前后轻摇细胞板混合均匀。
- 细胞板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18 - 48 hrs。转染 4 - 6 hrs 后可换新鲜培养基。



转染示意图:

① 将 siRNA/DNA 和转染试剂分别用 Opti-MEM 稀释, 5min 后混合, 室温放置 20min

② 将混合好的 siRNA Mix 加入培养液中转染

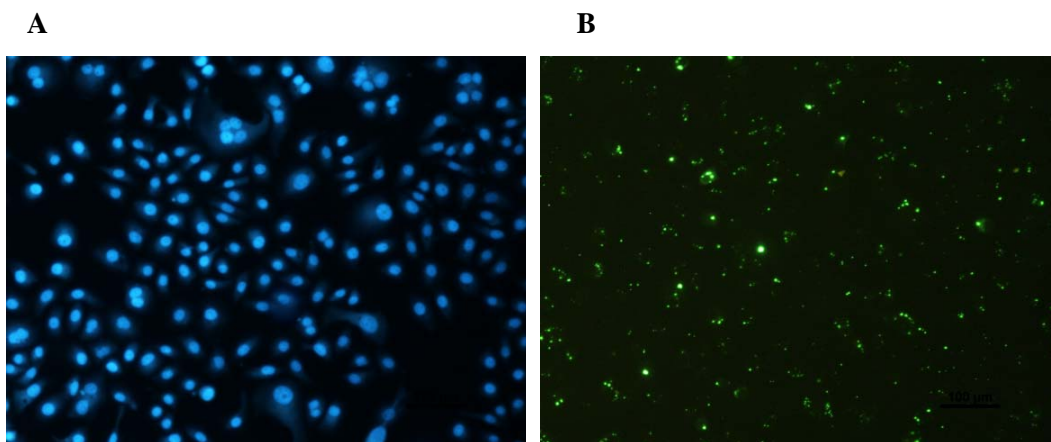
附表：各种细胞培养板转染推荐用量

培养容器	培养面积	共用试剂		DNA 转染		RNA 转染	
		铺板培养基	稀释培养基	DNA	转染试剂	RNA	转染试剂
96 孔板	0.3 cm <sup>2</sup>	100 μL	2×25 μL	0.2 μg	0.5 μL	5 pmol	0.25 μL
24 孔板	2 cm <sup>2</sup>	500 μL	2×50 μL	0.8 μg	2.0 μL	20 pmol	1.0 μL
12 孔板	4 cm <sup>2</sup>	1 mL	2×100 μL	1.6 μg	4.0 μL	40 pmol	2.0 μL
6 孔板	10 cm <sup>2</sup>	2 mL	2×250 μL	4.0 μg	10 μL	100 pmol	5.0 μL
60 mm 板	20 cm <sup>2</sup>	5 mL	2×0.50 mL	8.0 μg	20 μL	200 pmol	10.0 μL
10 cm 板	60 cm <sup>2</sup>	15 mL	2×1.50 mL	24 μg	60 μL	600 pmol	30.0 μL

### 4.3 转染优化及注意事项：

为了达到高的转染效率，在转染实验过程中，需要注意以下几点：

- 1) 纯化 siRNA：**在转染前要确认 siRNA 的大小和纯度。注意：化学合成的 siRNA 至少需要 PAGE 纯化，最好是 HPLC 纯化。
- 2) 避免 RNase 污染：**微量 RNase 就会导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNase 普遍存在，如皮肤，头发，暴露在空气中的物品等。需要使用 DEPC 处理过的耗材及试剂，保证实验每个步骤不受 RNase 污染非常重要
- 3) 健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性：**生长状态良好的对数生长期的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验稳定性。
- 4) 避免使用抗生素：**推荐从细胞接种到转染后 72 小时期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素。
- 5) 选择合适的转染试剂：**针对 siRNA 制备方法以及靶细胞类型的不同，选择好的转染试剂和优化的操作对 siRNA 实验的成功至关重要。
- 6) 通过合适的阳性对照\*优化转染和检测条件：**对大多数细胞，看家基因（House Keeping Gene）是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的 siRNA 转入靶细胞，转染 48 小时后统计对照蛋白或 mRNA 相对于未转染细胞的降低水平。  
\*我们公司的阳性对照的种类（目录及页码）
- 7) 通过标记 siRNA 来优化实验：**荧光标记的 siRNA 能用来分析 siRNA 稳定性和转染效率。



图：荧光标记的 siRNA 阴对照转染细胞转染效率图

A: Hoechst 染色图

B: FAM-siRNA 转染结果图