

Attractene 转染试剂简易操作说明

用户需自备的装置和试剂

培养基

感兴趣的 DNA 和 siRNA (我们的网站 www.qiagen.com/geneglobe 可以帮你设计针对人，小鼠，大鼠任意基因的 siRNA)

感兴趣的细胞

开始实验前的重要注意事项

针对不同的细胞系及 DNA-siRNA，要获得最佳的转染效果，DNA 和 Attractene 转染试剂的用量可能需要优化。表 1 给出了 24 孔板条件下 DNA-siRNA 共转染细胞时优化条件推荐用的 Attractene 试剂用量。我们推荐以 0.4 μ g DNA，6 pmol 阴性对照 siRNA，以及 1.5 μ l 转染试剂作为初始实验条件（表 1 中以粗体字表示）。

根据表 1 优化实验条件后，用 6 pmol 的待检测 siRNA 替代阴性对照 siRNA，与 DNA 及 Attractene 试剂共转染，检测基因下调表达率。

Table 1. Pipetting scheme for optimizing DNA-siRNA cotransfection in one well of a 24-well plate

Amount of DNA	0.2 μ g	0.2 μ g	0.2 μ g
Amount of negative control siRNA	6 pmol	6 pmol	6 pmol
Volume of Attractene Reagent	0.5 μ l	0.75 μ l	1.5 μ l
Amount of DNA	0.4 μ g	0.4 μg	0.4 μ g
Amount of negative control siRNA	6 pmol	6 pmol	6 pmol
Volume of Attractene Reagent	1 μ l	1.5 μl	3 μ l
Amount of DNA	0.6 μ g	0.6 μ g	0.6 μ g
Amount of negative control siRNA	6 pmol	6 pmol	6 pmol
Volume of Attractene Reagent	1.5 μ l	2.25 μ l	4.5 μ l

The recommended starting point for transfection is shown in bold.

在实验中有可能需要增加待测siRNA 用量(比如增加到12 pmol)以达到更为有效的基因沉默效率 ($\geq 70\%$)。在这种情况下，阴性对照组中的siRNA用量也必须和实验组保持一致。

增加siRNA用量的同时可能也需要增加Attractene试剂用量以优化实验条件。

实验流程

- 1、 在0.4 μg 质粒DNA (溶于pH 7-8的TE缓冲液) 中加入无血清培养基，使得终体积为60 μl 。初始质粒DNA的浓度至少要到达0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

举例来说，如果DNA的浓度是 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，需将0.4 μl DNA稀释与59.6 μl 培养基中。

- 2、 加入6 pmol 的siRNA。这样siRNA的最终工作浓度为10 nM。

举例来说，如果siRNA贮存液浓度是20 μM ，则需加入0.28 μl 。

- 3、 加入1.5 μl Attractene试剂，吹打或涡旋振荡混匀。如果管盖上沾有液体，可离心数秒使液体流下。

- 4、 将样品在室温 (15–25°C) 孵育10-15 min以使转染复合物形成。在孵育过程中进行下面的步骤5和6。

- 5、 用胰酶消化并收集细胞，用含有血清及抗生素的培养基重悬细胞。

注意：细胞必须状态良好并处于对数生长期。

- 6、 进行细胞计数，将细胞密度调整至0.4-1.6 $\times 10^5$ 细胞/500 μl 培养基。最优细胞密度与细胞系本身相关。

注：此操作流程中在种细胞的同时进行转染，种板的细胞密度需要比传统方式的转染前一天种板高2-3倍。

- 7、 按每孔500 μl 细胞悬液将细胞植入24孔板。然后将转染复合物加入相应孔。吹打2次混匀。

- 8、 以常规条件培养含有转染复合物的细胞 (通常为37°C , 5% CO_2) 。

在大多数情况下，不必移去转染复合物。但如果发现有细胞毒性，可在转染后6-18小时进行换液。

- 9、 培养适当的时间后检测基因下调情况。

在培养于 24 孔板的贴壁细胞中使用 Attractene 共转染 DNA 和 siRNA（传统流程）

此流程适用于敏感细胞系。

实验流程

- 1、 转染前一天，以 $2-8 \times 10^4$ 细胞/500 μ l 培养基的密度种板，培养基可包含血清和抗生素。
 - 2、 以常规培养条件（通常为 37°C，5% CO₂）孵育细胞过夜。细胞在转染当天需达到 40-80% 的覆盖度。
 - 3、 转染当天，在 0.4 μ g 质粒 DNA（溶于 pH 7-8 的 TE 缓冲液）中加入无血清培养基，使得终体积为 60 μ l。初始质粒 DNA 的浓度至少要到达 0.1 μ g/ μ l。
 - 4、 加入 6 pmol 的 siRNA。这样 siRNA 的最终工作浓度为 10 nM。
 - 5、 加入 1.5 μ l Attractene 试剂，吹打或涡旋振荡混匀。如果管盖上沾有液体，可离心数秒使液体流下。
 - 6、 将样品在室温（15–25°C）孵育 10-15 min 以使转染复合物形成。在孵育的时间内进行下面的步骤 7。
 - 7、 轻轻吸取细胞培养基，并加入 500 μ l 新鲜的完全培养基（含有血清和抗生素）。
 - 8、 将转染复合物滴入细胞，轻晃培养板以混匀。
 - 9、 以常规条件培养含有转染复合物的细胞（通常为 37°C，5% CO₂）。
- 在大多数情况下，不必移去转染复合物。但如果发现有细胞毒性，可在转染后 6-18 小时进行换液。
- 10、 培养适当的时间后检测基因下调情况。