

细胞转染实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
Opti-MEM	Gibco	31985-070
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-019
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
Real-time PCR 检测仪	罗氏	LC96
微量核酸测定仪	杭州奥盛	Nano-100
超低温冰箱	Thermo	905- μ ITS (490L)
台式离心机	Thermo	Pico17
CO2 培养箱	Thermo	3111

三、实验方法

- 1、细胞正常培养，并将细胞以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中；
- 2、待细胞融合度为 50-60%时进行转染，参考 lip2000 说明书，以 6 孔板为例，详细转染步骤如下：
 - (1) 用 250 μ L Opti-MEM 分别稀释 siRNA 和质粒，轻轻吹吸 3-5 次混匀。
 - (2) 轻轻颠倒混匀转染试剂，用 250 μ L Opti-MEM 稀释 5 μ L Lipofectamine 2000，轻轻吹吸 3-5 次混匀，室温下静置 5min。
 - (3) 混合转染试剂和 siRNA/质粒稀释液，轻轻吹吸 3-5 次混匀，室温下静置 20min。
 - (4) 转染复合物加入到 6 孔板中，并补齐新鲜完全培养基，再前后轻摇细胞板混合均匀。
 - (5) 细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO2 培养箱中培养。
 - (6) 根据实验目的在转染后规定的时间进行相关检测。

转染体系见下表：

RNA 转染体系：通常 inhibitor 和 siRNA 转染细胞的终浓度选择 100nM，mimics 转染细胞的终浓度选择 50nM。

孔板	RNA 终浓度	20 μ M siRNA 量/孔	RNA 稀释体积 (Opti-MEM)	转染试剂量/孔 (Lipo2000)	Lipo2000 稀释体积 (Opti-MEM)	每孔中总体积 (V1+V2)
96-well	100nM	0.5 μ L*5	25 μ L	0.25 μ L*5	25 μ L	每孔 10ul
	50 nM	0.25 μ L*5	25 μ L	0.25 μ L*5	25 μ L	每孔 10ul

24-well	100nM	2.5 μ L	50 μ L	1 μ L	50 μ L	500 μ L (400 μ L+100 μ L)
	50 nM	1.25 μ L	50 μ L	1 μ L	50 μ L	500 μ L (400 μ L+100 μ L)
12-well	100nM	5 μ L	100 μ L	2 μ L	100 μ L	1mL (800 μ L+200 μ L)
	50 nM	2.5 μ L	100 μ L	2 μ L	100 μ L	1mL (800 μ L+200 μ L)
6-well	100nM	10 μ L	250 μ L	5 μ L	250 μ L	2mL (1500 μ L+500 μ L)
	50 nM	5 μ L	250 μ L	5 μ L	250 μ L	2mL (1500 μ L+500 μ L)

质粒转染体系：24孔板一般转染 0.5ug/孔，6孔板转染 2.5ug/孔。

孔板	质粒	质粒稀释体积 (Opti-MEM)	转染试剂量/ 孔(Lipo2000)	Lipo2000 稀释体积 (Opti-MEM)	每孔中总体积 (V1+V2)
96 孔板	0.5-1ug (5个孔)	25 μ L	1.25 μ L (5个孔)	25 μ L	100 μ L (5个孔, 各加 10ul)
24 孔板	0.5-1ug	50 μ L	1 μ L	50 μ L	500 μ L
12 孔板	1-1.5ug	100 μ L	2 μ L	100 μ L	1mL
6 孔板	2-3ug	250 μ L	5 μ L	250 μ L	2mL