

## siRNA 转染 PC3 细胞

### 一、准备工作

PC3 细胞、12 孔板、无血清 (FBS) 的 F12 培养基、含 10% 血清的 F12 培养基、Opti-MEM 培养基、PBS、20 $\mu$ M 的 siRNA 储液、lipofectamin2000

### 二、操作步骤

1、转染前一天，12 孔板每孔接种  $8 \times 10^4$  个细胞，每孔加 1ml 含 FBS 不含双抗的 F12 培养基；

注意：选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。转染时用的细胞应该用不含双抗的培养基培养，否则会影响转染效率。种板时可以前后左右依次摇晃培养板，使细胞均匀铺在孔底，不能转圈摇晃培养板，细胞密度不均匀会影响转染效率。

2、24h 后细胞密度达到 50%~60%，此时进行转染效果会比较好；

注意：细胞密度过低会导致转染的 siRNA 量过少，而细胞过密会导致转染效率降低。不同细胞转染效率最高时要求的细胞密度不同。本实验中用到的是人前列腺癌细胞 PC3，经摸索后发现细胞密度达到 50%~60% 时转染效率最高。

3、转染前半小时将 12 孔板中细胞的培养基换成无血清培养基，放于 CO<sub>2</sub> 培养箱中；

注意：饥饿处理可以提高细胞摄取外源 siRNA/lipofectamin2000 复合物的效率。

4、用 50 $\mu$ L Opti-MEM 培养基稀释 20 $\mu$ M 的 siRNA 储液 1 $\mu$ L (即 25pmol 的 siRNA)，加入细胞中的 siRNA 终浓度为 50nM，轻柔地混匀；

注意：用到的 EP 管应为高压灭菌后的 RNase-free 的 EP 管，吸取 siRNA 时应该用 RNase-free 的枪头。

5、混匀 lipofectamin2000 试剂，用 50 $\mu$ L Opti-MEM 培养基稀释 1 $\mu$ L lipofectamin2000 试剂，轻柔混匀，室温放置 5min；

注意：对于不同的细胞和培养板，转染效率最佳时 lipofectamin2000 和 siRNA 的用量会有所不同。就 12 孔板来说，加入 2  $\mu$ L lipofectamin2000 时，siRNA 的用量在 1  $\mu$ L ~5 $\mu$ L 范围内均有很好的效果，可根据实验需求自行调整。对于 PC3 细胞来说，加入 2  $\mu$ L lipofectamin2000 和 2.5  $\mu$ L siRNA 时转染效果最好。

6、将稀释好的 siRNA 和稀释好的 lipofectamin2000 试剂混合，轻柔混匀，室温放置 20 min，以便形成 siRNA/lipofectamin2000 复合物；将 100  $\mu$ L siRNA/lipofectamin2000 复合物加到转染前饥饿处理的细胞中，前后左右轻轻摇晃培养板；

注意：稀释好的 lipofectamin2000 应该在 25min 之内和稀释好的 siRNA 混合，如果放置时间过长，会导致 lipofectamin2000 活性的降低。

7、转染 6h 后将孔中的培养上清吸去，加入 1ml 含 10%FBS 的无双抗 F12 培养基，放回 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养，根据细胞状态决定在检测转染效果前细胞是否换液。

注意：加培养基时应将培养板倾斜，将培养基沿着孔壁缓慢加入，因为转染后的细胞比较脆弱，所以要将操作时对细胞的损伤可能降到最低。

8、一般情况下，细胞在转染后 48h~72h，可以进行 siRNA 沉默效果检测；如果转染的是带有荧光标记的 siRNA，转染后 4~6h 内可在荧光显微镜下检测转染效果。

注意：不同细胞的最佳检测时间不同。对 PC3 细胞来说，转染后 72h 收取细胞，提 RNA 用 Real time PCR 定量检测细胞 mRNA 水平的变化；转染后 96h 收取细胞，提蛋白用 Western 检测蛋白表达量的变化。

### 三、相关溶液的配制和说明

1. 21 bp 长的 siRNA，换算关系为：1 OD duplex = 3.0 nmols = 40 ug；用 150  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 重悬 1OD 的 siRNA，溶解后即为 20  $\mu$ M 的储液。
2. siRNA 的保存：siRNA 的干粉放于 -80 $^{\circ}$ C 保存，干粉可以保存一年以上。使用时用附送的 RNase-free H<sub>2</sub>O 或灭菌的 ddH<sub>2</sub>O，配制成 20 $\mu$ M 储液，分装保存，每支尽量在 3 次内用完。所有接触到 siRNA 的枪头均应用 RNase-free 的进口枪头，实验过程中，应该将 siRNA 放于冰上，使用完后放于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
3. lipofectamin2000 放于 4  $^{\circ}$ C 保存。操作前应将 siRNA 和 lipofectamin2000 放置在冰上，带入细胞房操作。

### 四、备注

不同厂家的培养板对转染 PC3 细胞也有影响，实验发现用 Corning 的板子转染 PC3 细胞效果比较好，不会发生细胞大量死亡的现象，建议大家以后转染 PC3 细胞时尽量用 Corning 的细胞培养板。