

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:

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。

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。

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.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。

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。

6. 腺病毒载体

腺病毒由于其基因结构、功能清楚; 易于制备、纯化、浓缩; 宿主范围广; 感染率高; 理化性质稳定; 不整合宿主基因组; 遗传毒性和免疫毒性低的特点, 成为最新 RNA 干扰实验研究中重要的基因载体系统。Ad2 和 Ad5 是目前应用最广的两种腺病毒血清型。

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。为得到高纯度的 siRNA，推荐用玻璃纤维结合，洗脱或通过 15-20% 丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸，小的寡核苷酸，蛋白和盐离子。注意：化学合成的 RNA 通常需要跑胶电泳纯化（即 PAGE 胶纯化）。

2. 避免 RNA 酶污染

微量的 RNA 酶将导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNA 酶普遍存在，如皮肤，头发，所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等，此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。

3. 健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

通常，健康的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验，推荐用 50 代以下的转染细胞，否则细胞转染效率会随时间明显下降。

4. 避免使用抗生素

Ambion 公司推荐从细胞种植到转染后 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。有些细胞和转染试剂在 siRNA 转染时需要无血清的条件。这种情况下，可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验，以得到最佳转染效果。

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（同样适合实验靶 siRNA），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。过多的 siRNA 将导致细胞毒性以至死亡。

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。标记的 siRNA 还可用作 siRNA 胞内定位及双标记实验（配合标记抗体）来追踪转染过程中导入了 siRNA 的细胞，将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。