

团 体 标 准

T/CZRX XXXX—2024

siRNA 转染试剂性能分级标准

Performance classification standard of siRNA transfection reagents

2024-xx-xx 发布

2024-xx-xx 实施

常州市软件协会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 试剂和材料	2
6 器材和设备	2
7 转染效率测定及评分	2
7.1 细胞转染	2
7.2 RNA 提取	3
7.3 RT-qPCR 检测	3
7.4 转染效率计算	3
7.5 转染效率评分	4
8 细胞死亡率测定及评分	4
8.1 计数用细胞悬液制备	4
8.2 细胞染色	4
8.3 细胞计数	4
8.4 细胞死亡率计算	4
8.5 细胞死亡率评分	4
9 转染性能计算与评分	5
10 转染性能分级	5
参考文献	6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由常州百代生物科技股份有限公司提出。

本文件由常州市软件协会归口。

本文件起草单位：常州百代生物科技股份有限公司、XXX、XXX。

本文件主要起草人：夏国庆、胡安琪、马喆璇、沈佳鑫、XXX、XXX。

本文件为首次制定。

siRNA 转染试剂性能分级标准

1 范围

本文件规定了 siRNA 转染试剂性能的试验方法和分级标准。
本文件适用于 siRNA 转染试剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 35519 化学品 稳定转染人雌激素受体转录活性试验 雌激素激动活性法

3 术语和定义

GB/T 35519 界定的及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞转染 cell transfection

将外源分子如 DNA、RNA 等导入真核细胞的技术。

3.2

转染性能 transfection performance

使用转染试剂转染后，转染效率和细胞死亡率的综合表现。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

表 1 缩略语

缩略语	中文全称	英文全称
DMEM	杜氏改良 Eagle 培养基	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	脱氧核糖核酸	Deoxyribonucleic acid
HeLa	一种永生的人宫颈细胞系	An immortal human cervical cell line
RNA	核糖核酸	Ribonucleic acid
RPMI	洛斯基·帕克纪念研究所	Roswell Park memorial institute
PCR	聚合酶链式反应	Polymerase chain reaction
RT-qPCR	逆转录实时定量聚合酶链式反应	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
siRNA	小干扰核糖核酸	Small interfering ribonucleic acid
SSB-siRNA	单链结合蛋白小干扰核糖核酸	Single-stranded binding protein small interfering ribonucleic acid

5 试剂和材料

- 5.1 HeLa 细胞。
- 5.2 SSB-siRNA。
- 5.3 转染试剂。
- 5.4 转染增强剂。
- 5.5 DMEM-高糖培养基。
- 5.6 胎牛血清。
- 5.7 吸附柱法细胞 RNA 提取试剂盒。
- 5.8 一步法 RT-qPCR 试剂盒。
- 5.9 胰蛋白酶溶液。
- 5.10 台盼蓝染液。
- 5.11 70%乙醇。

6 器材和设备

- 6.1 24 孔细胞培养板。
- 6.2 细胞培养箱。
- 6.3 荧光定量 PCR 仪。
- 6.4 灭菌洁净离心管。
- 6.5 移液器。
- 6.6 灭菌滴管。
- 6.7 盖玻片。
- 6.8 细胞计数板。
- 6.9 光学显微镜。

7 转染效率测定及评分

7.1 细胞转染

7.1.1 细胞培养板选择

用 24 孔细胞培养板进行转染，特殊情况下如果不使用 24 孔细胞培养板进行细胞培养和转染，按表 2 进行细胞培养板规格的选择。

表 2 用于各种细胞培养板的 siRNA 转染试剂规格

培养容器	表面积/孔 (cm ²)	生长培养基含量 (μL)	Trans Enhancer (转 染增强剂) 含量 (μL)	siRNA 含量 (pmol)	转染试剂含量 (μL)
96 孔细胞培养板	0.3	120	2×6	3	0.4
48 孔细胞培养板	0.8	250	2×13	6	0.8
24 孔细胞培养板	2	500	2×25	12	1.5
12 孔细胞培养板	4	1000	2×50	24	3
6 孔细胞培养板	10	2500	2×125	60	7.5

7.1.2 细胞接种

转染前一天，将 HeLa 细胞接种到 24 孔细胞培养板中，每孔细胞接种数为 4×10^4 个，每孔含 500 μL DMEM-高糖培养基（添加 10% 胎牛血清，不使用抗生素），然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱内培养。

7.1.3 转染复合物准备

- 取灭菌洁净离心管 1 支，加入 25 μL RPMI-1640、DMEM 或试剂盒自配的 Trans Enhancer，再加入 12 pmol SSB-siRNA，轻轻混匀；
- 取灭菌洁净离心管 1 支，加入 25 μL RPMI-1640、DMEM 或试剂盒自配的 Trans Enhancer，再加入 1.5 μL 转染试剂，轻轻混匀，室温孵育 5 min，立即执行下一步操作；
- 将 siRNA 稀释液用移液器加入转染试剂稀释液，轻轻混匀，室温孵育 15 min。

7.1.4 将转染复合物加到培养的细胞内

将 50 μL 转染复合物加入到 24 孔细胞培养板的培养孔内，并轻轻晃动细胞培养板使转染复合物与 HeLa 细胞混匀，然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内培养 24 h。

注：可按 7.1 进行 siRNA 细胞转染操作，也可按每种 siRNA 转染试剂的操作说明书进行操作。

7.2 RNA 提取

细胞转染完成后，使用专业的吸附柱法细胞 RNA 提取试剂盒，按照使用说明书进行细胞 RNA 提取。

7.3 RT-qPCR 检测

RNA 提取完成后，使用一步法 RT-qPCR 试剂盒，按照其使用说明书配制反应体系，将配制好的反应管放于荧光定量 PCR 仪上，按照一步法 RT-qPCR 试剂盒使用说明书设置 PCR 反应条件，然后进行基因特异性定量。

7.4 转染效率计算

使用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 方法计算转染效率（siRNA 敲除效率），计算公式见式（3）：

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_2 - \text{CT}_1 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ΔCT ——靶基因和内参基因的 CT 值差异；

CT_1 ——内参基因循环阈值；

CT_2 ——靶基因循环阈值。

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_2 - \Delta\text{CT}_1 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$\Delta\Delta\text{CT}$ ——靶基因和内参基因的 CT 值差异；

ΔCT_1 ——对照组中 ΔCT 值；

ΔCT_2 ——实验组中 ΔCT 值。

$$\eta = (1 - 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}) \times 100 \% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

η ——转染效率。

7.5 转染效率评分

根据转染效率测定结果进行评分，评分结果记为 S_a ，评分方法见表 3。

表 3 转染效率评分表

转染效率（siRNA 敲除效率）	分值
$\eta \geq 85\%$	100
$75\% \leq \eta < 85\%$	90
$65\% \leq \eta < 75\%$	80
$55\% \leq \eta < 65\%$	70
$\eta < 55\%$	0

8 细胞死亡率测定及评分

8.1 计数用细胞悬液制备

使用 0.25%胰蛋白酶溶液（含乙二胺四乙酸）消化细胞，充分吹打，随后吸入到灭菌洁净离心管中，充分振荡使细胞完全分散，无肉眼可见细胞团。

8.2 细胞染色

用灭菌滴管吸取 0.4%台盼蓝染液，按 1:1 比例加入细胞悬液中，轻轻吹打混匀。

8.3 细胞计数

8.3.1 取细胞计数板一块，使用 70%乙醇将盖玻片和细胞计数板清洁、晾干，再将晾干的盖玻片轻轻覆盖至细胞计数板上。

8.3.2 将细胞悬液滴于盖玻片边缘，使之充满细胞计数板和盖玻片之间的空隙。静置片刻，将细胞计数板放在光学显微镜上，在低倍镜下（10×10 倍）观察，分别记录细胞计数板四角四个大方格内的染色和未染色细胞数。

8.4 细胞死亡率计算

计算细胞死亡率，计算公式见式（4）：

$$M = \frac{X}{X+Y} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

M——细胞死亡率；

X——染色细胞数；

Y——未染色细胞数。

8.5 细胞死亡率评分

根据细胞死亡率测定结果进行评分，评分结果记为 S_b ，评分方法见表 4。

表 4 细胞死亡率评分表

细胞死亡率	分值
$M \leq 10\%$	100
$10\% < M \leq 15\%$	90
$15\% < M \leq 20\%$	80
$20\% < M \leq 25\%$	70
$M > 25\%$	0

9 转染性能计算与评分

转染试剂的转染性能取决于转染效率与细胞死亡率的综合表现，计算公式见式（5）：

$$P = 0.55 S_a + 0.45 S_b \dots\dots\dots (5)$$

式中：

P——转染性能对应的分值；

S_a ——转染效率对应的分值；

S_b ——细胞死亡率对应的分值。

10 转染性能分级

本文件将 siRNA 转染试剂性能等级分为五级，其中 A 级代表最高转染性能等级，各级别对应的指标水平如下：

表 5 siRNA 转染试剂性能等级

等级划分	A 级	B 级	C 级	D 级	E 级
转染性能对应的 分值 (P)	$P \geq 93\%$	$85\% \leq P < 93\%$	$77\% \leq P < 85\%$	$69\% \leq P < 77\%$	$P < 69\%$

参 考 文 献

- [1] GB/T 27531 病毒性脑病和视网膜病病原逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）检测方法
 - [2] GB/T 36757 M-MLV 反转录酶
 - [3] GB/T 36820 甘蔗条纹花叶病毒实时荧光反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）检测方法
 - [4] 孙林春, 孙海波, 沈波, 等. 3种转染试剂介导 siRNA 转染蚊细胞的比较研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(05):353-355+360.
 - [5] 饶云, 彭捷, 吴昊澎, 等. 细胞穿透肽 Tat-LK15 介导 siRNA 的转染效率和细胞毒性研究[J]. 生命科学研究, 2014, 18(06):505-510.
 - [6] 赵广伟, 杨小玲, 张孟奇, 等. 不同转染方法应用于体细胞转基因效率的研究[J]. 家畜生态学报, 2024, 45(02):13-18.
-