

K109A01 RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 操作说明 (适用于原代免疫细胞 mRNA 转染)

1. 产品概述

RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 是一款新型即用型脂质纳米粒 (LNP) 产品, 适用于 mRNA 体外转染。

2. 产品特点

- ◆ 简便: 无需包封设备, 可一步实现对 mRNA 的 LNP 包封。
- ◆ 高效: 仅需 5 min 可完成 LNP 包封, 包封率可达 80% 以上, 转染效率。
- ◆ 安全: 此产品不含乙醇, 均采用新型生物可降解脂质材料, 对细胞具有极低毒性。

3. 产品组成

货号	产品名称	组份	规格	保存条件
K109A01	RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (<i>In Vitro</i>)	LNP 纳米混悬液	1.5 mL	2-8 °C
		Buffer	8.0 mL	2-8 °C
		eGFP	10 µg	-80 °C
		转染增强剂	70 µL	-80 °C

4. 体外转染操作流程以及不同培养容器中每孔 mRNA 和纳米混悬液用量 (适用于原代免疫细胞 mRNA 转染)

1) 体外转染操作流程

- 40 ng/µL mRNA 预混液制备: 取适量 Buffer 稀释所需 mRNA 至 40 ng/µL, 混匀。
- mRNA-LNP 复合物制备: 向上述 mRNA 预混液中, 加入等体积的 LNP 纳米混悬液, 用移液枪轻轻吹打混合均匀。

注: mRNA-LNP 复合物在室温下可稳定存放时间不应超过 2 小时。

- 加入细胞: 将 mRNA-LNP 复合物加入细胞, 并向细胞中加入 1 µg/µL mRNA 的转染增强剂, 轻轻晃

动使均匀分散，培养 24-48 h。

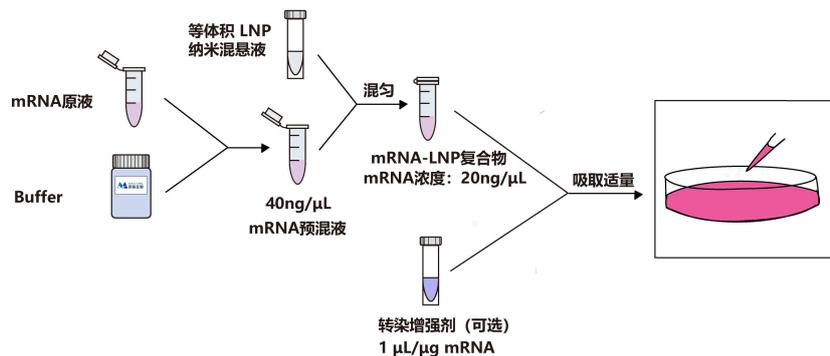


图 1. RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 操作流程

2) 不同培养容器中每孔 mRNA 和纳米混悬液用量 (适用于原代免疫细胞 mRNA 转染)

表 1 不同培养容器中每孔 mRNA 和纳米混悬液用量

步骤	试剂	培养容器规格		
		96 孔板	24 孔板	6 孔板
1) 40 ng/μL mRNA 预混液制备	Buffer (以 mRNA 原液浓度 1μg/μL 为例)	2.4 μL	12 μL	60 μL
	mRNA	0.1 μg	0.5 μg	2.5 μg
	LNP 纳米混悬液	2.5 μL	12.5 μL	62.5 μL
2) mRNA-LNP 复合物制备	mRNA 预混液	2.5 μL	12.5 μL	62.5 μL
	mRNA-LNP 复合物	5 μL	25 μL	125 μL
3) 加入细胞	转染增强剂	0.1 μL	0.5 μL	2.5 μL

5. 运输和保存

eGFP 和染增强剂请-80 °C 保存; 其余组分请 2-8 °C 保存, 不可冷冻, 有效期 12 个月。

6. 注意事项

- 1) 请在洁净环境中进行复合物制备相关操作, 并保证操作过程所用耗材无菌无酶。
- 2) 请确保 mRNA 原液中溶剂为 RNase-free water, 且 mRNA 的浓度不低于 200 ng/μL, 以便获得更好的转染效果。
- 3) 请务必使用本试剂盒中的 Buffer 稀释 mRNA 原液, 不得使用 PBS 或培养基替代, 请确保稀释得到的 mRNA 预混液浓度为 40 ng/μL。

- 4) mRNA-LNP 复合物在室温条件下可稳定存放 8 小时, 请勿将 mRNA-LNP 复合物置于冷冻条件。
- 5) 请注意 mRNA/LNP 的比例是 LNP 包封的关键因素, 如需增减每孔 mRNA 用量, 请按比例增加或减少加入细胞的每孔 mRNA-LNP 复合物的体积。
- 5) 请勿将 mRNA-LNP 复合物置于冷冻条件。
- 6) 本产品仅供研究使用。

K109A01 RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 操作说明

(适用于原代免疫细胞 siRNA 转染)

1. 产品概述

RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 是一款新型即用型脂质纳米粒 (LNP) 产品, 适用于 siRNA 体外转染。

2. 产品特点

- ◆ 简便: 无需包封设备, 可一步实现对 siRNA 的 LNP 包封。
- ◆ 高效: 仅需 5 min 可完成 LNP 包封, 包封率可达 80% 以上, 转染效率。
- ◆ 安全: 此产品不含乙醇, 均采用新型生物可降解脂质材料, 对细胞具有极低毒性。

3. 产品组成

货号	产品名称	组份	规格	保存条件
K109A01	RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (<i>In Vitro</i>)	LNP 纳米混悬液	1.5 mL	2-8 °C
		Buffer	8.0 mL	2-8 °C
		eGFP	10 µg	-80 °C
		转染增强剂	70 µL	-80 °C

4. 体外转染操作流程以及不同培养容器中每孔 siRNA 和纳米混悬液用量 (适用于原代免疫细胞 siRNA 转染)

1) 体外转染操作流程

- 3 pmol/µL siRNA 预混液制备: 取适量 Buffer 稀释所需 mRNA 至 3 pmol/µL (即 3µM), 混匀。
- siRNA-LNP 复合物制备: 向上述 siRNA 预混液中, 加入等体积的 LNP 纳米混悬液, 用移液枪轻轻吹打混合均匀。
- 加入细胞: 将 siRNA-LNP 复合物加入细胞, 并向细胞中加入 1 µL/75 pmol siRNA 的转染增强剂, 轻轻晃动使均匀分散。

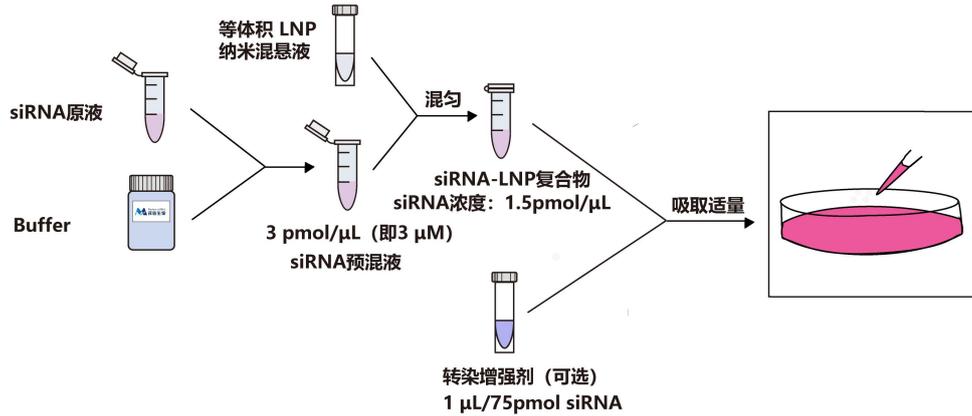


图 1.RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 操作流程

3) 不同培养容器中每孔 siRNA 和纳米混悬液用量 (适用于原代免疫细胞 siRNA 转染)

表 1 不同培养容器中每孔 siRNA 和纳米混悬液用量

步骤	试剂	培养容器规格		
		96 孔板	24 孔板	6 孔板
1) 3 pmol/μL siRNA 预混液制备(即 3 μM)	Buffer (以 siRNA 原液浓度 10 μM 为例)	0.7 μL	3.5 μL	17.5 μL
	siRNA	3 pmol	15 pmol	75 pmol
2) 向 siRNA-LNP 复合物制备	LNP 纳米混悬液	1 μL	5 μL	25 μL
	siRNA 预混液	1 μL	5 μL	25 μL
3) 加入细胞	siRNA-LNP 复合物	2 μL	10 μL	50 μL
	转染增强剂	0.04 μL	0.2 μL	1 μL

5. 运输和保存

eGFP 和染增强剂请-80 °C 保存; 其余组分请 2-8 °C 保存, 不可冷冻, 有效期 12 个月。

6. 注意事项

- 1) 请在洁净环境中进行复合物制备相关操作, 并保证操作过程所用耗材无菌无酶。
- 2) 请确保 siRNA 原液中溶剂为 RNase-free water, 且 siRNA 的浓度不低于 10 μM, 以便获得更好的转染效果。
- 3) 请务必使用本试剂盒中的 Buffer 稀释 siRNA 原液, 不得使用 PBS 或培养基替代, 请确保稀释得到的 siRNA 预混液浓度为 3 pmol/μL (即 3 μM)。

- 4) siRNA-LNP 复合物在室温条件下可稳定存放 8 小时, 请勿将 siRNA-LNP 复合物置于冷冻条件。
- 5) 请注意 siRNA/LNP 的比例是 LNP 包封的关键因素, 如需增减每孔 siRNA 用量, 请按比例增加或减少加入细胞的每孔 siRNA-LNP 复合物的体积。
- 6) 本产品仅供研究使用。

K109A01 RNA 原代免疫细胞转染试剂盒 (*In Vitro*) 操作说明

(适用于原代免疫细胞)

附件一：人原代 T 细胞培养方案时间步骤详细步骤说明

时间	步骤	详细步骤	说明
Day 0	1. 复苏人原代 T 细胞	1) 在温水浴中快速解冻冻存的人原代 T 细胞; 2) 将复苏的细胞加入含有 9mL1640 完全培养基的离心管中; 3) 以 300g 离心 5min, 弃去上清液, 加入 1mL T 细胞无血清培养基 (如: STEMCELLTM) 吹打均匀; 4) 转移至 6 孔板中, 再加入 4mL T 细胞无血清培养基混匀; 5) 放入 CO ₂ 培养箱中。	1) 可使用直接从外周血分离的人原代 T 细胞; 2) 建议分离或解冻 T 细胞后立即活化。
Day 1	2. T 细胞活化、扩增	1) 将 T 细胞吹匀后计数, 并将培养基换成 T 细胞无血清培养基+1%双抗+300IU IL-2; 2) 按照细胞数量加入对应比例的 CD3/CD28 磁珠活化; 3) T 细胞扩增时间可根据实验所需细胞数量进行调整, 一般建议 T 细胞活化后 3 天; 4) 细胞培养期间, 必要时使用培养基 (T 细胞无血清培养基+1%双抗+300IU IL-2) 进行补液或半换液。	细胞活化也可使用 T 细胞激活剂 (如: ImmunoCult TM Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator) 。
Day 4	3. T 细胞转染	1) 将扩增的 T 细胞吹匀, 计数, 转移到合适的孔板中; 2) 按照 K109A01 操作说明制备 RNA-LNP 复合物, 并加入细胞; 3) 将细胞放入 CO ₂ 培养箱中, 根据实验方案培养 24 小时或适宜时间点。	转染前有活力的 T 细胞表面 CD25 表达应不低于 80%时, 对 RNA-LNP 复合物成功递送到 T 细胞至关重要。

注意事项

- 请尽量在 T 细胞活化后一周内完成细胞转染实验。
- 如使用 T 细胞激活剂活化人原代 T 细胞, 具体活化方案请参考所用 T 细胞激活剂说明书。
- 使用 24 孔板进行原代 T 细胞转染时, 推荐的细胞密度为 $2-5 \times 10^5$ cells/孔。