

YALEPIC[®] siRNA 转染试剂-LFSR

YALEPIC[®] siRNA Transfection Reagent-LFSR

产品货号

产品货号	YJ52004-01	YJ52004-02
规格	1 ml	5 × 1 ml

产品保存及运输条件

常温运输, 2 ~ 8°C 保存, 不可冷冻。

产品概述

YALEPIC[®] siRNA Transfection Reagent-LFSR 是一款新型、性能稳定的 siRNA 专用转染试剂, 能够高效地将 siRNA 转染到真核细胞中, 而不被核酸酶降解。可适用于众多原代培养和转化细胞株的 siRNA 转染, 沉默效率高且性能稳定, 且不受血清影响, 转染前后无需更换培养基。具有毒性低、稳定性好、耐血清能力强、操作简单易行、重复性好等优点。

适用范围

适用于众多原代培养和转化细胞株的 siRNA 转染。

自备试剂及仪器

1. 细胞接种: 细胞培养基, FBS, 胰酶, 血球计数板, 细胞培养板等;
2. 转染复合物的形成: Opti-MEM 或其它无血清、无双抗细胞培养基, EP 管等;
3. 其他: PBS, 移液器, 移液管, 15 ml 离心管, T-75 细胞培养瓶, CO₂ 细胞培养箱等。

实验准备及注意事项

1. 操作环境及操作过程中使用的试剂、耗材均需无菌, 无 RNase 污染, 以免影响正常的转染效果。
2. 确保实验中使用的 siRNA 具有较高的纯度和浓度。
3. 每次使用之前务必颠倒混匀试剂, 观察试剂为澄清即可用。
4. 可通过改变细胞密度、siRNA 浓度以及转染试剂用量对转染进行优化。

5. 转染时尽量选用同样的接种比例，以提高实验重复性。（注：不同细胞系的细胞密度不同，细胞密度会直接决定转染效率，建议在细胞融合度达到 60 ~ 70% 时进行转染）
6. 应避免转染复合物形成的反应体系中存在血清。
7. 转染实验全程缓慢轻柔操作，尤其在试剂稀释及混合的操作时，使用移液器轻轻吹打 10 ~ 20 次，确保充分混匀。
8. 建议进行 siRNA 转染时，LFSR (μl) : siRNA (pmol) 可以在 0.04 : 1 和 0.12 : 1 之间调整。

实验流程

● siRNA 转染

以 24 孔板为例，步骤如下：



细胞接种： 转染前 24 h 左右对细胞进行接种，接种密度约为 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/well，过夜培养（12 ~ 24 h）。

质粒稀释：

- 1) 在 1.5 ml 无菌 EP 管中加入 10 μl Opti-MEM，并添加适量的 DNA（表 1），用移液器轻轻混匀。
- 2) 在 1.5 ml 无菌离心管中加 10 μl Opti-MEM 无血清培养基，并添加适量的 LFSR（表 1），用移液器轻轻混匀，静置 5 min。

复合物制备: 将 **LFSR-Opti-MEM** 滴加至 **siRNA-Opti-MEM** 中, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 20 min 后可用于转染。注: 形成的转染复合物溶液尽量在 30 min 内使用。

细胞转染:

- 1) 将转染复合物混合液滴加至培养基中, 轻轻晃动培养皿, 均匀分散。一般情况下无需更换培养基。
注: 如有特殊需要, 可在转染开始之前更换新鲜的完全培养基, 避免转染后培养细胞密度过大、营养不足导致细胞死亡。
- 2) 37°C 过夜培养 18 ~ 48 h。一般情况下无需更换培养基。如转染后需要更换新鲜培养基, 请在培养 6 ~ 12 h 后更换。
- 3) 收取细胞进行后续实验。

● siRNA 转染优化方案

为达到高转染效率和低细胞毒性的最佳效果, 可通过改变细胞密度、siRNA 浓度以及转染试剂浓度对转染进行优化, 保证细胞融合度在 60 ~ 80% 以上。LFSR (μl) : siRNA (pmol) 剂量可以在 0.04 : 1 和 0.12 : 1 之间进行调整。

细胞培养板	单孔面积	培养基用量		siRNA 转染	
		接种培养基用量	稀释培养基用量 Opti-MEM	siRNA	LFSR
96-well	0.3 cm ²	100 μl	2 x 5 μl	7.5 pmol	0.5 μl
24-well	2.0 cm ²	500 μl	2 x 10 μl	15 pmol	1 μl
12-well	4.0 cm ²	1 ml	2 x 20 μl	30 pmol	2 μl
6-well	10 cm ²	2 ml	2 x 50 μl	60 pmol	4 μl
60 mm	20 cm ²	5 ml	2 x 100 μl	100 pmol	10 μl
10 cm	60 cm ²	15 ml	2 x 300 μl	300 pmol	30 μl
T25	25 cm ²	6 ml	2 x 150 μl	125 pmol	12.5 μl
T75	75 cm ²	20 ml	2 x 300 ml	400 pmol	40 μl

表 1: siRNA 转染优化推荐表

常见问题与解决方案

1. LFSR 与 siRNA 的比例不合适。

LFSR (μl) : siRNA (pmol) 剂量可以在 0.04 : 1 和 0.12 : 1 之间进行调整。

2. 转染时细胞密度不合适。

细胞密度过低导致细胞生长缓慢, 对外来刺激变得较为敏感, 使得转染毒性增高。细胞密度过高, 会导致细胞发生接触抑制, 加快细胞凋亡。细胞融合度达到 60 ~ 70% 时, 转染可以取得较高的转染效率。可预实验优化细胞转染密度。

3. 转染体系中存在抑制因素。

当转染体系中存在多聚阴离子聚合物时 (例如: 硫酸葡聚糖、肝素等), 转染将无法正常进行, 因此应避免上述物质存在于细胞转染体系中。

4. 细胞状态差。

应尽量使用适度传代接种的细胞系, 并尽量在平行实验时保持细胞传代次数的一致性, 同时需避免细胞培养时间过长。

5. 细胞毒性高。

导致转染时细胞毒性大的因素有很多, 例如 RNA 的用量过大、转染试剂的用量过大、转染时细胞状态较差以及培养基中抗生素的加入等。建议严格按照所选择转染试剂的说明书进行操作, 以避免细胞毒性大的问题。

6. 内吞效率很高, 但蛋白表达低

内吞效率高说明基因可以被高效的吞入细胞, 证明复合比例、试剂及基因的用量是没有问题的。蛋白表达量低分析可能有如下 2 个原因: 1) 使用的 RNA 本身蛋白表达量偏低, 这个可能与 RNA 的合成序列有关。2) 使用的细胞属于难转细胞, 基因在细胞内无法高效表达。

7. 转染效果不稳定

转染效果稳定性取决于转染试剂的稳定性和基因的稳定性的。转染试剂应按照说明书建议的保存温度及条件进行保存。基因如短时间内连续使用, 可放置于 4°C 保存。若超过 10 天不使用, 建议置于 -20°C 或 -80°C 长期储存以降低核酸的降解速度。