

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 保存一年，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和基因的稳定性。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。