

Chemifect-R

(siRNA 转染试剂)

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
FR-02	Chemifect-R	1 mL	4 °C, 3 年
	说明书	1 份	

一、运输与存储。

本产品低温（冰袋）运输，4 °C 保存，有效期 3 年。

二、注意事项（实验前阅读）。

1. 请利用对数生长期细胞做 siRNA 转染实验，一般在细胞传代后 24 -36 h，转染 siRNA，可以保证转染效率。
2. 细胞密度对转染效率也具有很大的影响，请选择汇合度为 50-70%的对数生长期细胞进行 siRNA 转染实验，可以取得较高的转染效率。细胞密度过高或过低则降低转染效率。
3. siRNA 干粉溶解后请分装，并保存在-80 °C，避免反复冻融而降解。
4. siRNA 与 Chemifect-R 混合后孵育时间不宜太短，建议 15-30 min（30 min 转染效果会更好），以免转染复合体形成减少，降低转染效率。
5. 表 1 中提供的 Chemifect-R 用量能够有效进行 siRNA 的转染，不改变 Chemifect-R 用量的情况下，增加 siRNA 的用量，可以提高 siRNA 转染效率，以及基因敲低效果。
6. 悬浮细胞转染 siRNA 时，siRNA 进入细胞较慢，转染 24 h 左右方可达到较好的效果。
7. 贴壁细胞转染荧光标记的 siRNA（如 siRNA-FAM）6 h 后，荧光显微镜下可以观察到荧光，12 h 时达到高峰，并开始下降，24 -48 h，荧光降低，直至消失。因此，检测靶基因的敲低效率时，可以收集转染后 24 h-36 h 的细胞样品并检测。
8. 与绿色荧光蛋白（GFP）相比，荧光标记的 siRNA（如 siRNA-FAM）在荧光显微镜下显示的荧光点较小，亮度较低，提高激发光的强度，可以增强转染 siRNA 的荧光强度和检测效率。
9. 本试剂 4 °C 保存，严禁冻存。冻存后的 Chemifect-R 转染效率降低，甚至完全消失。

三、产品简介。

Chemifect-R 是一款专门用于 siRNA 转染的试剂，转染效率高，细胞毒性低，在多种细胞系及原代细胞中都表现出良好的转染效果。

四、特点与优势。

1. 转染效率高。本产品与 Lipofectamine 2000 或 RNAi Max 等转染试剂的转染效率类似。
2. 细胞毒性低。本产品在多种细胞系和原代细胞的 siRNA 转染实验中没有细胞毒性。
3. 使用方便。本产品不受血清和抗生素的影响，转染前不用更换细胞培养液。

五、使用说明。

1. 以 6 孔细胞培养板培养的贴壁细胞为实验体系，siRNA 转染实验流程如下：
2. 细胞培养。胰酶消化法收集细胞并计数，接种到 6 孔细胞培养板，培养 24 h 后细胞密度达到 50%-70%。
3. siRNA 制备。利用 RNase-free ddH₂O 溶解 siRNA 干粉，终浓度为 20 μ M，即利用 125 μ L 的 RNase-free ddH₂O 溶解 1 OD (33 μ g 或 2.5 nM) siRNA 干粉，震荡 (Vortex) 使其溶解。
4. 转染复合体制备。准备 2 个无菌 EP 管，各加入 100 μ L OPTI-MEM 培养液 (Gibco)，其中一管加入 5 μ L Chemifect-R，混合 10 次，室温静置 5 min。另外一管加入 6 μ L siRNA (20 μ M) 溶液，混匀。将 Chemifect-R 溶液滴加到 siRNA 溶液中，混匀，室温静置 30 min (15-30 min，但孵育 30 min 转染效果更好)，制备转染复合体。
5. 细胞转染。吸取转染复合体 (不可反复吹打混匀，以免破坏复合体结构)，滴加入细胞培养液中，轻摇混匀，转入 CO₂ 培养箱中继续培养。
6. 换液。转染 6-12 h，更换成新鲜的细胞培养液。若无明显细胞毒性，也可不用换液。
7. 转染 6 h 后，荧光显微镜下可以检测到细胞内的荧光标记的 siRNA (如 FAM, FITC 标记的 siRNA)，而转染 24-36 h，可以利用 QPCR 检测目的基因的 mRNA 表达水平，或利用 Western Blot 检测目的蛋白的表达水平。

表 1. Chemifect-R 与 siRNA 用量表

培养器皿	20 μ M siRNA (μ L)	Chemifect-R (μ L)	OPTI-MEM (μ L)
24 孔板	2-5	0.75-1.5	50
6 孔板	4-10	3-5	100
Φ 35 mm 培养皿	4-10	3-5	100
Φ 60 mm 培养皿	8-20	6-10	200

六、转染效果鉴定。

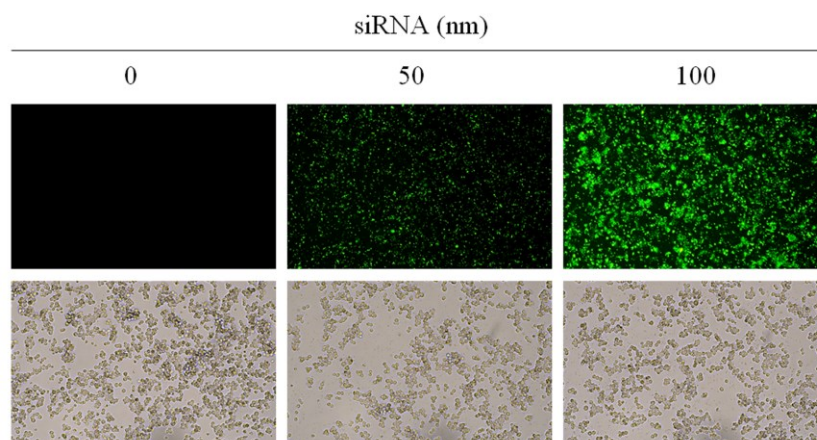


图 1. NALM-6 细胞转染 siRNA 效果鉴定

NALM-6 细胞传代后接种到 6 孔板，24 h 后细胞密度达到 50%左右，利用 Chemifect-R 转染 FAM（绿色荧光探针）标记的 Control siRNA，设置三组，分别是对照组（0 nm siRNA）、5 μ l Chemifect-R + 50 nm siRNA-FAM 组，以及 5 μ l Chemifect-R + 100 nm siRNA-FAM 组，转染 24 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光强度变化，并拍照。结果表明 Chemifect-R 可以有效的将 siRNA 转入细胞。

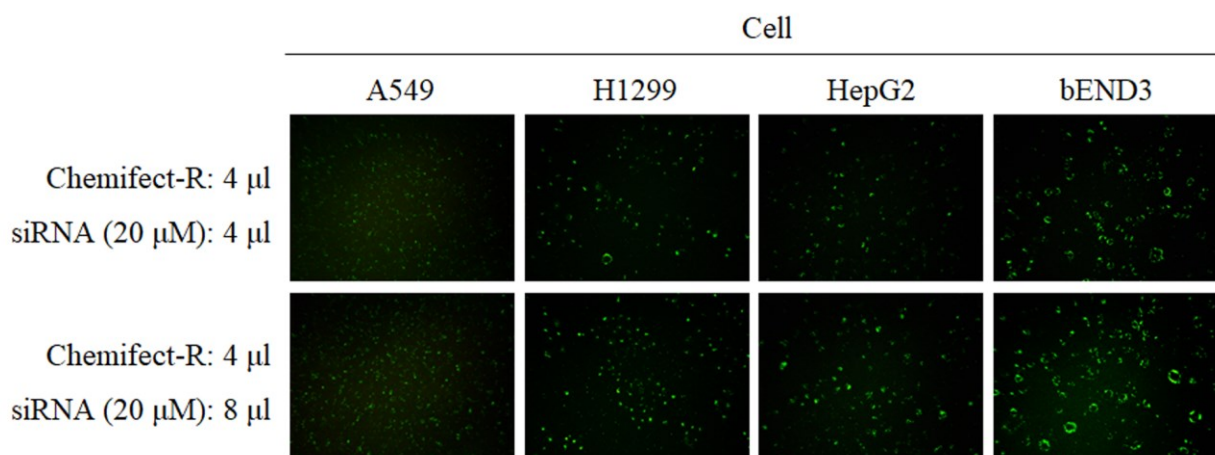


图 2. Chemifect-R 转染 siRNA 效果鉴定

A549、H1299、HepG2 和 bEND3 等细胞接种到 6 孔板，24 h 后密度达到 50%，利用 Chemifect-R 转染 FAM（绿色荧光探针）标记的 Control siRNA，设置 2 组，分别是 4 μ l Chemifect-R + 40 nm siRNA-FAM 组，以及 4 μ l Chemifect-R + 80 nm siRNA-FAM 组，转染 24 h 后荧光显微镜下观察并拍照。结果表明 Chemifect-R 可以有效的将 siRNA 转入细胞，且在 Chemifect-R 用量（4 μ l）固定的情况，转染效率随着 siRNA 浓度的升高而增加。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
目的基因敲低效率低	siRNA 效率较低。	重新设计并合成新的目的基因的 siRNA，或选择已经鉴定的高效 siRNA。
	siRNA 用量较少。	提高 siRNA 用量，其浓度在 100 nM 以内，都可以作为有效敲低剂量，不算脱靶效应。
	Chemifect-R 用量较少	提高 Chemifect-R 的用量。
	siRNA 与 Chemifect-R 的比例不合适。	请按照 Chemifect-R 与 siRNA (20 μ M)=1:1 的体积比混合，或在此基础上提高 siRNA 的用量。
	细胞密度不合适。	调整细胞密度，接种后 24 h，细胞密度在 50-70%之间，不可过低或过高。
	检测目的基因表达水平的 时间点不合适。	一般转染 24-36 h，收集细胞，检测目的基因的 mRNA 表达水平，而转染 36-48 h，检测目的蛋白的表达水平。
	转染复合体形成时间偏短。	siRNA 与 Chemifect-R 剧烈混合后，室温静置 30 min，保证转染复合体充分形成，且加入细胞培养液前禁止再混匀，以免破坏转染复合体。
	siRNA 降解。	选用 RNase-free 的 EP 管和枪尖，避免 RNA 酶污染，防止 siRNA 降解。同时，溶解 siRNA 后分装，保存在 -80 $^{\circ}$ C，用时取分装试剂，避免 siRNA 反复冻融而降解。
细胞毒性大	特定细胞株对 Chemifect-R 敏感。	减少 Chemifect 用量，转染后 6 h 换液。
	细胞密度偏低。	增加接种细胞密度，达到 50%以上。
	siRNA 纯度较低。	选用高纯度的 siRNA，如 PAGE 纯化的 siRNA。
	细胞状态较差。	提高细胞状态，或更换细胞。
	Chemifect-R 用量较大。	请按照表格中的规定用量使用 Chemifect-R，不要超过最大用量。