

PolyBooster RNAi Transfection Reagent {siRNA/miRNA 细胞转染试剂}

货号: BRK9017

规格: 1000 µl

◆ 产品描述

PolyBooster RNAi 转染试剂是一种基于阳离子高分子聚合物开发的新型转染试剂, 能够将 siRNA/miRNA 高效递送至细胞内并迅速释放, 实现目的基因的高效沉默。本产品经过配方优化升级, 能在多数贴壁、悬浮细胞中实现高效转染, 具有操作便捷、细胞毒性低、细胞兼容性强、沉默效率高等优点。

◆ 产品组分

产品编号	产品名称	组分体积	保存条件
BRK9017-A	PolyBooster RNAi Transfection Reagent	1000 µl	-20℃
BRK9017-B	Enhancer Reagent	3×1000 µl	-20℃

◆ 保质期

冰袋运输, 2 ~ 8℃保存, 有效期 1 年。由于组分溶剂略微具有挥发性, 长期不使用建议放置于-20℃保存 (有效期 1 年)。

◆ 产品应用

适用于 siRNA/miRNA 转染, 实现靶基因沉默。

◆ 注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用。
2. 本产品需恢复至室温后, 涡旋、瞬离后再使用。
3. 特别注意, 请务必严格按照产品使用操作流程的加样顺序配制转染复合物, 切勿将 siRNA 先与 Opti-MEM 或 PolyBooster RNAi 转染试剂混合, 以免影响最终实验结果。
4. 建议最终配制转染复合物最小体积为 30 µl, 以免因吸取转染试剂量过少影响复合效果。
5. mRNA 水平的检测一般在转染后 24~48 h, 蛋白水平的检测一般在 48~72 h。不同基因的半衰期不同, 建议多设几个时间点进行检测, 并根据实际情况合理调整检测时间。

◆ 实验流程

细胞转染实验操作流程 (以 24 孔板, 贴壁细胞为例)

1. 细胞铺板接种

转染前一天细胞用胰酶消化、铺板 (含血清不含抗生素的完全培养基), 使转染时孔板中细胞密度达到

60%~80%，并确保铺板接种时细胞活率大于 90%。

2. siRNA 转染复合物的制备

(1) 在 1.5 ml 无菌离心管中加入 1 μ l 的 siRNA 储存母液（浓度为 20 μ M）和 5 μ l 的 Enhancer Reagent，使用移液器轻柔吹打混匀后，再加入 2 μ l 的 PolyBooster RNAi 转染试剂，使用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。

注：本产品需恢复至室温，涡旋、瞬离后再使用。

(2) 往 (1) 步骤中的混合物中加入 12 μ l 的 Opti-MEM 溶液以稀释转染复合物，使用移液器轻柔吹打混匀，形成 20 μ l 的 siRNA 转染复合物。

3. 细胞转染

(1) 将 20 μ l 的 siRNA 转染复合物滴加至 24 孔板的一个孔中，轻轻晃动细胞培养板使其均匀分散。

(2) 转染 24~72 h。如果转染后需要更换新鲜的完全培养基，请在加入 siRNA 转染复合物 8 h 左右换液。

(3) 收取细胞，进行后续实验。

4. 附表

1. 常用细胞培养装置转染前一天细胞接种的推荐数量和培养液体积

细胞培养装置	接种细胞数量	细胞培养液体积
96 孔板	$1-3 \times 10^4$	0.1 ml
24 孔板	$0.5-2 \times 10^5$	0.5 ml
12 孔板	$2-3 \times 10^5$	1 ml
6 孔板	$0.5-1 \times 10^6$	2 ml
60 mm 培养皿	$1-2 \times 10^6$	5 ml
100 mm 培养皿	$2-4 \times 10^6$	10 ml

2. 常用细胞培养装置细胞转染时，各组分推荐初始的使用剂量

细胞培养装置	siRNA(20 μ M)(μ l)	Enhancer Reagent(μ l)	PolyBooster RNAi(μ l)	Opti-MEM 稀释液(μ l)	每孔转染复合物(μ l)
96 孔板	0.2 (4 pmol)	1	0.4	2.4	4
24 孔板	1 (20 pmol)	5	2	12	20
12 孔板	2 (40 pmol)	10	4	24	40
6 孔板	4 (80 pmol)	20	8	48	80
60 mm 培养皿	8 (160 pmol)	40	16	96	160
100 mm 培养皿	20 (400 pmol)	100	40	240	400

注：①以上转染体系方案仅供参考，需根据具体细胞类型及其他实验条件进行合理的优化调整；②可根据实验的实际需求适当增加或减少 siRNA 的用量，以获得最佳沉默效率；③PolyBooster RNAi 转染试剂经过配方优化，使用比例可根据实际情况放大 2~3 倍用量，一般不会对细胞产生明显毒性。

◆ 常见问题与解决方案

1. 转染的阳性对照组 siRNA-FAM-NC，在显微镜下基本观察不到荧光信号或荧光信号微弱。

FAM 标记的荧光探针在转染之后会逐渐淬灭，因此最佳的观察时间一般在转染之后的 8 h 左右。同时，由

于 FAM 的荧光信号较为微弱，使用荧光显微镜可能存在无法有效观察到荧光信号的现象。

2. 荧光对照组有荧光信号，但目的基因检测结果均无敲低效果。

a. siRNA 设计或靶点问题： siRNA 本身无活性，或存在脱靶效应。建议使用至少 2-3 条针对同一个靶基因不同的 siRNA 序列。同时使用已验证过的阳性对照 siRNA（如 siRNA-GAPDH）来排除转染体系本身的问题。

b. siRNA 质量问题： siRNA 存在降解，或使用了未纯化/未修饰的廉价 siRNA。建议进行严谨的预实验验证，并使用高质量的、经过修饰的 siRNA 以确保其稳定性和特异性。同时需要注意 siRNA 储存的条件和时间。

3. RT-qPCR 结果显示基因表达水平敲低效果明显，Western blot 结果显示蛋白表达水平基本没有下调效果。

a. mRNA 水平的检测一般在转染后 24~48 h，蛋白水平的检测一般在转染后 48~72 h。不同基因的半衰期不同，因此，建议多设几个时间点进行检测，根据实际情况合理调整检测时间。

b. 目的蛋白半衰期：查找并确认检测的目的蛋白大致半衰期，如果半衰期较长，可能需要更长的沉默干扰时间才能检测到目的蛋白表达水平下调。

c. 翻译效率反馈性升高：存在当细胞内某个关键蛋白表达量减少时，细胞内稳态调控机制会启动负反馈调节作用，将剩余少量 mRNA 更高效地翻译成相对应的蛋白。因此，如果无法延长实验时间（mRNA 敲低效果只能维持几天时间），可以考虑尝试进行重复转染（在第一次转染后 3~4 天再次转染）来维持对细胞内相应 mRNA 水平的持续敲低。

d. 蛋白稳定性补偿：存在当某种蛋白表达量减少时，为维持内环境稳态，细胞会启动抑制该蛋白的降解通路（如抑制其泛素化降解等），导致蛋白分子的半衰期变长。因此，建议可以尝试结合蛋白质合成抑制剂（如 CHX 等）进行干预处理，但这通常只适用于相关机制的研究，不适用于常规基因敲低实验。

e. 样本制备问题：尽量使用同一批转染处理的细胞，或将总细胞裂解液分为两份：一份用于提取总细胞 RNA，一份用于提取细胞总蛋白，确保两组数据来源完全一致。

f. 抗体过载/信号饱和：显影曝光时间过长或蛋白上样量过大可能会导致 wb 条带信号达到饱和，导致目的条带微小差异被掩盖。可尝试将蛋白样品进行梯度稀释上样或缩短曝光时间，观察条带灰度值是否在线性范围内存在差异。