ribo*FECT*™ CP 转染试剂使用说明

RN：R10035.3

产品简介

ribo*FECT*™ CP 是一种专门用于核酸分子的转染试剂，极具生物相容性，转染效率高，细胞毒性小，适合各种核酸分子（如 siRNA、miRNA、质粒）的转染实验。该转染试剂转染时无需进行培养基更换操作，尤其适合各种高通量细胞筛选实验，方便，快速，高效。

表 1 试剂盒成分组成

ribo*FECT*™ CP Transfection Kit	Concentration	C10511-03	C10511-05	C10511-1	C10511-2
ribo*FECT*™ CP Reagent	NA	0.3ml	0.5ml	1ml	2 × 1ml
ribo*FECT*™ CP Buffer（10X）	10X solution	0.3ml	0.5ml	1ml	2 × 1ml

运输保存

室温运输，4℃保存，可以稳定保存一年。

使用方法

使用前须知

1）采用 PBS 稀释 ribo*FECT*™ CP Buffer（10X），制备 ribo*FECT*™ CP Buffer（1X）。

2）取出 ribo*FECT*™ CP Reagent 后，在漩涡振荡器中充分振荡后，室温放置，使之恢复到室温后使用。

转染方法

以ribo*FECT*™ CP Reagent 转染siRNA于24孔板，转染浓度为50nM为例，其他规格容器转染请参考表2。

1. 接种细胞

a. 贴壁细胞：转染前一天，接种1×10^5细胞至含有适量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到50~80%。

注：1）不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量需要依据经验而定；2）每孔接种的细胞数量尽量相同，使细胞均匀分布于培养基表面。

b. 悬浮细胞：接种1×10^5~5×10^5个细胞至含有适量完全培养基的24孔板。

2. 转染步骤

对于每个转染样品，请按以下步骤准备：

a. 稀释 siRNA：用 30μl 1X ribo*FECT*™ CP Buffer（**v1**）稀释 1.25μl 20μM siRNA 储存液（**v2**），轻轻混匀，室温孵育 5min。

b. 混合液制备：加入 3μl ribo*FECT*™ CP Reagent（**v3**），轻轻吹打混匀，室温孵育 0～15min。

注：1）请不要振荡，溶液可能会有浑浊，但不会影响转染；2）混合液可室温放置一段时间，但不宜超过 24h。

c. 将 ribo*FECT*™ CP 混合液加入到 465.75μl 细胞培养基（**v4**）中，轻轻混匀。

注：混合液加入原细胞培养基，无需移除或更换。

d. （可选）进行其他必要的特殊处理（如加药处理）；

e. 将培养板置于 37℃的 CO_2 培养箱中培养 24~96h（培养时间与实验目的相关）。

表 2 使用 ribo*FECT*™ CP 转染 siRNA 用量参考

v1: ribo*FECT*™ CP Buffer (1X)； **v2**: 20μM siRNA； **v3**: ribo*FECT*™ CP Reagent； **v4**: 细胞培养基

	siRNA 终浓度	每孔体积	Buffer (v1)	siRNA (v2)	Reagent(v3)	培养基(v4)
96-well	100nM	100μl	6μl	0.5μl	0.6μl	92.90μl
	50nM	100μl	6μl	0.25μl	0.6μl	93.15μl
	30nM	100μl	6μl	0.15μl	0.6μl	93.25μl
	20nM	100μl	6μl	0.1μl	0.6μl	93.30μl
	10nM	100μl	6μl	0.05μl	0.6μl	93.35μl
24-well	100nM	500μl	30μl	2.5μl	3μl	464.50μl

*	50nM	500μl	30μl	1.25μl	3μl	465.75μl
	30nM	500μl	30μl	0.75μl	3μl	466.25μl
	20nM	500μl	30μl	0.5μl	3μl	466.50μl
	10nM	500μl	30μl	0.25μl	3μl	466.75μl
12-well	100nM	1ml	60μl	5μl	6μl	929.00μl
	50nM	1ml	60μl	2.5μl	6μl	931.50μl
	30nM	1ml	60μl	1.5μl	6μl	932.50μl
	20nM	1ml	60μl	1μl	6μl	933.00μl
	10nM	1ml	60μl	0.5μl	6μl	933.50μl
6-well	100nM	2ml	120μl	10μl	12μl	1858.00μl
	50nM	2ml	120μl	5μl	12μl	1863.00μl
	30nM	2ml	120μl	3μl	12μl	1865.00μl
	20nM	2ml	120μl	2μl	12μl	1866.00μl
	10nM	2ml	120μl	1μl	12μl	1867.00μl

注：1）*为实验参考用量，对于部分细胞类型需要进一步优化； 2）转染质粒时的转染试剂用量可优化至1μl（24孔板）。

3. 效果检测

转染完成后 24~72 小时均可进行 siRNA 沉默效果检测，最佳检测时间与细胞类型，转染试剂，检测目的等相关。

1）RNA 水平的检测：mRNA 是检测 siRNA 沉默效率的最佳指标，siRNA 转染后 24~72h 即可检测到靶基因 mRNA 表达明显降低，检测方法宜采用 qPCR 检测方法。

注：引物设计质量很重要，需要确保检测引物有效性。

2）蛋白水平的检测：蛋白是 RNAi 沉默效率的重要指标，其检测手段主要为 Western Blot 等。检测时间受细胞内蛋白质表达量、半衰期等因素的影响，一般为 48~96h，甚至更长时间之后多点采样。

3）功能筛选：应用 EdU 细胞增殖，EdUTP 细胞凋亡等方法进行 siRNA 对细胞功能的直接筛选。