

# AccuRef 转染试剂

## AccuRef Transfection Reagent

### AC0411

## 产品信息

产品名称	产品货号	规格
AccuRef Transfection Reagent	AC0411S	0.5 mL
	AC0411M	1 mL
	AC0411L	1.5 mL

## 保存条件

运输：常温

储存：2-8℃保存一年；-20℃保存二年以上。

## 产品介绍

AccuRef 转染试剂由可生物降解的聚阳离子与其它成分按特定比例配制而成，适用于 DNA、RNA 的转染。AccuRef 转染试剂与传统的脂质体转染剂相比无论在稳定性、转染效果和实验操作上都有明显的优势。AccuRef 转染试剂对绝大多数贴壁细胞有较高的转染效率，重复性好，操作简单。转染试剂和外源 DNA、RNA 可以形成纳米复合物。形成的纳米复合物可以直接加入完全细胞培养液中，不需要通过更换培养液来去掉转染试剂和 DNA/RNA 纳米复合物来降低转染剂的细胞毒性。通过对照实验发现，本制品的转染效果不受培养液中血清和抗生素的影响，可以通过简单地调整转染试剂和外源 DNA、RNA 的比例来获得最佳的转染效率。

## 产品特点

- 具有极高的转染效率；
- 细胞毒性小，且转染稳定；
- 操作简单；

## 操作步骤

**所需其它试剂：**无血清培养基、0.15M NaCl（双蒸水配制，高压或过滤灭菌）均可作为转染剂和 DNA/RNA 的稀释剂。

## DNA 转染方法

**使用方法**（以 24 孔细胞板转染实验为例）

- 转染细胞的准备**
- 贴壁细胞：转染前一天（24 小时），**24 孔板中，每孔接种  $1\sim 2\times 10^5$  个细胞，1ml 完全培养基，使之转染时能够达到 70-90%汇合度。

注：贴壁细胞也可以在传代后直接按悬浮细胞方法进行转染。也可以在传代后细胞贴壁基本完成时（如 HeLa 细胞传代后通常在 2 小时内就完全贴壁）开始转染。但这些简便方法实施的前提是传代时的细胞状态要非常好，不能用过度培养的细胞。此外，接种细胞的培养液在进行转染时已经 24 小时了，如果已经发黄，最好在转染时更换为新鲜培养基。

**悬浮细胞：**离心收集悬浮细胞，用新鲜的培养基重悬细胞并按每孔  $1\sim 2\times 10^5$  个细胞，1ml 完全培养基接种到 24 孔板中。

### 3. 转染复合物的准备

对大部分细胞而言，质粒 DNA ( $\mu\text{g}$ ) 和转染剂 AccuRef ( $\mu\text{l}$ ) 的比例大致为 1:3- 1:5。在两个无菌的离心管里分别加入 50 $\mu\text{l}$  无血清培养基，其中一个管中加入质粒 DNA，轻柔混匀，制成 DNA 稀释液。另一个离心管里加入 AccuRef 轻柔混匀，制成 AccuRef 稀释液。

注：DNA 和转染试剂的最适用量需要根据不同细胞和不同培养基来优化。对 24 孔板而言，每孔中两者的用量一般不超出 1~2 $\mu\text{g}$  和 3~5 $\mu\text{l}$  范围。相同转染效率条件下，尽可能降低转染剂用量。

- 将 50 $\mu\text{l}$  AccuRef 稀释液滴加到 50  $\mu\text{l}$  DNA 稀释液中，用吸头轻轻吹打混匀。室温放置 5 分钟，从而获得 100  $\mu\text{l}$  转染复合物。
- 将制备好的转染复合物直接加入到细胞培养基中，轻摇细胞板以混匀。转染复合物可直接加入含血清的细胞培养基中。
- 将细胞板移至 37°C，5% CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养，24-72 小时后可进行下游实验。
- 如果要筛选稳定细胞株，转染 24 小时后将细胞按照 1:10 或更高的比例稀释，传代到其它的培养板中，次日添加合适浓度的药物（如 G418, Zeocin 等）进行筛选。

### 转染过程的优化：

不同细胞培养器皿的表面积比较

培养皿	96 well	48 well	24 well	12 well	6 well	35mm	60mm	100mm
面积 (cm <sup>2</sup> )	0.3	0.7	2	4	10	10	20	60
与 24 well 面积比值	0.2	0.4	1	2	5	5	10	30

### RNA 转染方法

- 转染时细胞能够达到 60-80%汇合度。
- 使用无血清培养基如：Opti-MEM 稀释 AccuRef 转染试剂。
- 使用无血清培养基如：Opti-MEM 稀释 siRNA。
- 将稀释的 AccuRef 转染试剂加入到稀释的 siRNA 中(1:1 比例)。
- 室温孵育 5min。
- 将 siRNA 转染复合物加入到细胞中，37°C培养 1-3 天。
- 分析转染细胞。

转染试剂转染 siRNA 体系推荐：

制备的混合物足以进行三孔(96 孔细胞板)、两孔(24 孔细胞板)和单孔(6 孔细胞板)转染，并考虑移液变化。

组分	96-well	24-well	6-well
Cells	$1-4 \times 10^4$	$0.5-2 \times 10^5$	$0.25-1 \times 10^6$
Opti-MEM	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
AccuRef	1.5 $\mu$ L	3 $\mu$ L	9 $\mu$ L
Opti-MEM	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
siRNA (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L (5 pmol)	1 $\mu$ L (10 pmol)	3 $\mu$ L (30 pmol)
共稀释 siRNA 体积	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
共稀释 AccuRef 体积	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L
混合后室温孵育 5 分钟。			

组分	96-well	24-well	6-well
siRNA 转染复合物/每孔	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L
siRNA 使用量/每孔	1 pmol	5 pmol	25 pmol
AccuRef 使用量/每孔	0.3 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L
将 siRNA 转染复合物加入到细胞中，37°C 培养 1-3 天。然后，分析转染细胞。			

## 注意事项

### 1. 质粒 DNA 与 siRNA 的共转染

每 1  $\mu$ g DNA 加入 30 pmol (~0.6  $\mu$ g) siRNA，同时转染质粒 DNA 和 siRNA。

2. miRNA 转染方法可参考 siRNA 转染方法。

3. mRNA 或 shRNA 转染：使用 AccuRef 将 mRNA 或长链 shRNA 转染到 24 孔板中，每孔加入 0.5-1  $\mu$ g 的 mRNA 或长链 shRNA。

### 4. 问题和解决方法

问题	解决方法
转染效率低	1. 质粒浓度太低-建议：使用最适量的质粒。
	2. 质粒纯度太低-建议：使用高质量的质粒(OD260/OD280 $\geq$ 1.8)。
	3. 细胞生长状态欠佳-建议：保证细胞密度和形态是最佳的。
	4. 减半转染时培养液体积（转染 4 小时后再补加足量培养液）。
	5. 设立阳性对照，例如混入转染质粒总量 1/10 量的表达 EGFP 的质粒。
细胞毒性太大	1. 接种前，细胞的生长状况直接影响细胞活性。

	2. 转染时细胞密度不能过低。
	3. 增加转染时培养液体积，或保持 AccuRef/DNA 或 RNA 比率的同时减少 AccuRef 的用量。
	4. 对于敏感细胞株，转染 4 小时后去除含转染复合物的培养液，更换新鲜的完全培养液。
	5. 确定基因产物是否有毒性。