

荧光标记 RNA 产品使用说明

产品简介

芊陌生物可以定制合成各种荧光标记的 siRNA/ASO/miRNA mimic/ inhibitor/agomir/antagomir/RNA/DNA 探针等。荧光标记的 RNA/DNA 是用于检测转染效率的常用方法。荧光标记的 siRNA/miRNA 产品转染细胞后,可直接用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等观察,也可通过流式细胞仪检测,来确定细胞转染效率,优化转染条件; 荧光标记的 siRNA/miRNA 产品还可用作 siRNA 胞内定位及分布的检测, 并且荧光标记的动物用 siRNA/miRNA 产品还可用于动物体内的 siRNA/miRNA 定位及分布的活体成像检测等用途。

使用前须知

产品形式及包装: 荧光标记的 siRNA/miRNA 产品以冻干粉的形式储存于棕色管中。(由于影响结晶形态的因素很多, 产品外观有些差异, 甚至形态无法用肉眼可见, 此为正常现象)

运输条件: 常温运输

储存条件: 请于-20℃ ~ -80℃条件下存放, 冻干粉可以稳定保存一年(避光保存)。

注意事项 1: 荧光 siRNA/miRNA 产品在操作过程中, 需注意避免(核酸酶 RNAase, 温度, 极端 PH 等)可能导致的产品降解。请遵循 RNA 操作规范, 带手套操作, ep 管, 移液枪和枪头等都要避免污染, 实验过程中, 产品最好于冰上放置。

注意事项 2: 使用前瞬时离心(在最大转速约为 4,000g 的低速条件下离心装有荧光 siRNA/miRNA 产品的 EP 管, 让 siRNA 聚集在试管的底部)轻轻的打开管盖, 用 DEPC 水或者 RNase free water 配制成 20μmol/L 的荧光 siRNA/miRNA 产品储存液, 柔和地用移液枪吹打充分混匀荧光 siRNA/miRNA 储存液。分装保存于-20℃~-80℃(避光保存), 避免反复冻融(不超过 5 次)。

注意事项 3: 荧光 siRNA/miRNA 产品的储存, 使用, 检测的过程都需要注意避光操作。

荧光标记 siRNA/miRNA 产品	3nmol	5nmol
DEPC 水	150ul	250ul

表 1 20μmol/L 的荧光标记 siRNA/miRNA 产品储存液的配置参考

注: 若搭配 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂不得使用 PBS 或培养基稀释荧光标记 siRNA/miRNA

常见的荧光染料类型	激发波长	发射波长	颜色
FAM标记	495 nm	520 nm	Green/yellow
Cy3标记	550 nm	570 nm	Darkpink/Red
Cy5标记	650 nm	670 nm	Far red

表 2 常见的几种荧光标记的 siRNA/miRNA 产品

转染步骤示例:

以芊陌生物的 QM-RNA Transfection 转染试剂(转染试剂组成见表 3) 转染 荧光标记 siRNA (6 孔板, siRNA 转染终浓度为 40nmol/L) 为例, 其他规格容器的试剂用量请参考表 4, 若使用其它转染试剂, 请参考对应转染试剂说明书。

芊陌生物的 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂

QM-RNA Transfection Kit 转染试剂是一种专门用于小片段 RNA (siRNA /ASO / miRNA mimic/ miRNA inhibitor /piRNA / tRNA 等) 的高效低毒转染试剂(不建议转染质粒), 极具生物相容性, 转染效率优异, 细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便, 快捷, 高效。

QM-RNA Transfection Kit 组成	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Reagent	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Buffer	1ml	5ml	10ml

表 3 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂成分组成及规格

注) QM-RNA Transfection Kit 转染试剂为常温运输, 长期储存为 2~8℃ 保存, 可稳定保存一年, 不可冷冻, 冷冻后会破坏 Reagent 组分的结构和性状, 会极大的影响细胞转染效果。

1、细胞接种:

贴壁细胞: 以 293T 细胞为例, 接种 $\sim 0.4 \times 10^6$ 个细胞到含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中, 使细胞转染时达到 50~80% 细胞密度。

悬浮细胞: 以 THP-1 细胞为例, 接种 $\sim 0.5 \times 10^6$ 个细胞至含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中。

注) 1: 不同细胞初始接种数量依据不同的细胞大小, 细胞类型和细胞生长速度, 培养时间, 实验目的相应调整, 每个孔接种的细胞数量尽可能相同, 且细胞均匀分布。

2、荧光标记 siRNA 转染

注意事项: 注意整个实验过程要尽量避免光, 建议转染时室内和超净台内不要开灯; 保持荧光标记 siRNA/miRNA 管外有锡纸包裹, 在静置 siRNA-转染试剂转染复合物过程中尽量避免光, 转染操作尽量快, 操作时间尽量短, 操作完毕请尽快将培养板放到培养箱。

siRNA 预混液制备: 取无菌无酶 EP 管一支, 加入 46ul 的 QM-RNA Buffer 和 4ul 的 20umol/L 的 siRNA 储存液, 吹打混匀。

siRNA-QM 转染复合物制备: 取 8uL 的 QM-RNA Reagent 加入到 siRNA 预混液的 EP 管中, 移液枪充分吹打混匀 20 次以上, 或者旋涡 2-3s。

注: a) 转染复合物在室温下可稳定存放 8 小时, 请勿将 siRNA-QM 转染复合物置于冷冻条件。

b) RNA/QM-RNA Reagent 的比例是 QM-RNA Transfection 转染试剂包封的关键因素, 如需增减每孔 siRNA 用量, 您可以按比例增加或减少加入细胞的 **siRNA-QM 转染复合物** 的体积。

将 **siRNA-QM 转染复合物** 加入到待转染的孔板的细胞培养基中, 轻轻混匀。

将培养板置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养。

试剂	孔板			
	96 孔(ul)	24 孔(ul)	12 孔板	6 孔(ul)
QM-RNA Buffer	2.3	11.5	23	46
20umol/L siRNA 储存液	0.2	1	2	4
QM-RNA Reagent	0.38 或 0.75	1.9 或 3.8	3.8 或 7.5	7.5 或 15

表 4 终浓度 40nmol/L siRNA 不同培养皿的推荐转染用量

注) 提供 2 种不同的 QM-RNA Reagent 转染浓度, 具体浓度可根据不同的细胞摸索选择, 对于多数细胞通常按照低剂量 QM-RNA Reagent 用量即可达到理想的转染效果。

3、观察与检测

3.1 检测方法: 荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪

3.2 荧光显微镜观察注意事项 (流式细胞仪或激光共聚焦显微镜检测请参照仪器说明书):

(1) FAM 是一种绿色荧光基团, 由蓝光激发, 激发波长 480nm, 发射波长 520nm。

(2) 使用 QM-RNA Transfection Kit 转染后 6 小时就可以检测, 检测前细胞处理等操作都必须避光!

对于检测的时间要求相对不是特别严格，成功转染的细胞如果没有受到强光刺激的话，荧光一般不会消失，我们建议尽量在转染后 6~24 小时内完成检测。

(3) 确保熟悉荧光显微镜操作。建议检测时，可以先使光路先对准没有转染 FAM -siRNA 的孔，调好焦距打开激发光，一切准备就绪后再进行观察（一般情况下可以马上看到荧光）。

(4) 若使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜检测，检测时不宜同一位置过长时间曝光，应对好焦后马上拍照，防止曝光时间过长导致荧光淬灭。观察时间不宜过长，尽量避免荧光被猝灭，光路对准转染孔，马上观察和拍照。拍完荧光照片后，最好在视野中拍下明场的细胞照片。

(5) 只有成功转染的细胞才能看到 FAM 绿色荧光，与绿色荧光蛋白 GFP 的荧光不太一样，FAM 的荧光比较弱，通常散在分布在细胞质中。

(6) 由于荧光容易猝灭，应用计数的方法计算转染效率效果不好，最好用流式细胞仪检测。

(7) 如果您对我们 FAM-siRNA 质量有任何质疑的话，您可以从中吸取少量（2~5 μ l）FAM-siRNA 储存液，加在载玻片上，盖上盖玻片，直接于荧光显微镜下观察。注意保证 FAM-siRNA 的保存和使用方法无误，另外，所有操作都必须在避光条件下进行。

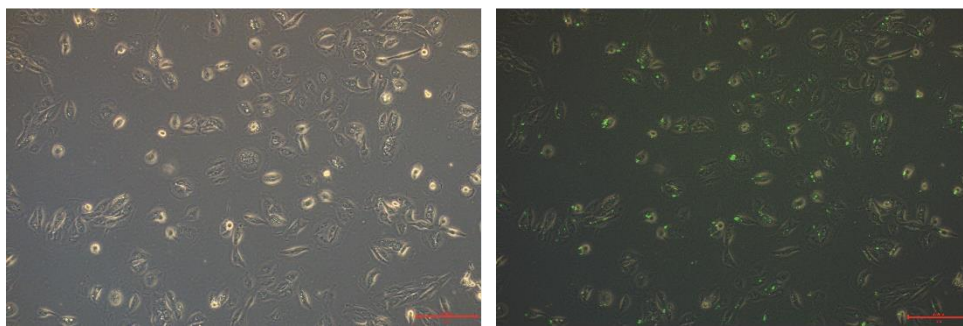


图 1 使用 FAM 标记的 siRNA 转染 A498 细胞后进行荧光显微镜拍照的示例图

常见问题

1. 转染率如何计算？

通过同视野明场图和荧光图进行 merge 或者对比，来确定被标记上荧光的细胞占整个视野细胞的百分比，从而确定细胞的转染效率大概为百分之多少。

某些细胞对荧光染料的粘附比较严重，且 Cy3、Cy5 为脂溶性染料，可能会造成假阳性结果，所以通过激光共聚焦显微镜成像的方式检测会更好一些，并依靠经验判断真假阳性信号。所以对于细胞的转染效率检测一般建议用 FAM 标记的 RNA 来进行检测。

2. 目的 siRNA/miRNA 标记荧光，同时检测转染效率 and 作用效果可以吗？

为尽量避免对目的 siRNA/miRNA 作用效率的影响，通常建议选择用荧光标记的 siRNA NC，miRNAmimic/inhibitor NC 来检测转染效率。也可以对目的 siRNA/miRNA mimic/inhibitor 标记荧光，同时检测转染效率 and 作用效果，但可能会有标记后 siRNA/miRNA mimic/inhibitor 失效的风险。

3. 荧光标记的 NC 的转染效率检测能否代表目的 siRNA/miRNA 的转染效率？是否每次实验都必须设置荧光对照组？

转染效率的高低主要由细胞自身及所选择的转染试剂和转染方法等相关，同等实验条件下，siRNA 的转染效率是相近的，荧光标记的 NC 转染效率可以近似认为等同于目的 siRNA/miRNA。在具体的实验中，荧光对照不一定需要每次实验都做。但如果每次实验都做一个荧光对照组/阳性对照组，将会更加便于排除一些实验问题。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源，QianMoBio Co. Ltd, shanghai, China，上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper，联系销售或者本公司，可获取对应的科研奖励金。