

Ribo™ IncRNA Smart Silencer 产品使用说明

RN: R11062.1

产品简介

Ribo™ IncRNA Smart Silencer 是 IncRNA 特异性 RNA 抑制剂，即用型。

运输保存

产品以冻干粉的形式，常温运输。收到产品后，请于-20℃以下低温保存，冻干粉可以稳定保存一年。使用前需瞬时离心，用 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O，配制成 20μM 储存液，分装保存，避免反复冻融（不超过 5 次）。

表 1 Ribo™ IncRNA Smart Silencer 20μM 储存液的配置参考

Silencer (nmol)	0.25	0.5	1	2	5	20
溶解体积(μl)	12.5	25	50	100	250	1000

使用前须知

为避免外界因素（包括酶，极端 pH 或者温度条件等）导致产品降解，所有操作请严格遵循 RNA 操作规则。实验过程中，产品最好于冰上放置，使用完毕后请于-20℃以下低温保存。

细胞实验方法

为了降低细胞密度、试剂用量，转染效率等因素导致的孔间差异，保证实验的可靠性和可重复性，一般建议：

- 1) 转染实验中每个转染样品至少设置3个复孔；
- 2) 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，且细胞在各孔的表面平均分布。

1. 转染浓度：

Ribo™ IncRNA Smart Silencer 产品最佳工作浓度因不同的细胞类型及研究目的而异。锐博生物推荐的初始转染浓度为 100nM，转染后检测时间为 24~72h。最佳转染效率一般通过设置时间曲线和浓度梯度进行优化，浓度梯度范围建议为 50~200nM。

2. 转染步骤：

以 riboFECT™ CP Reagent 转染 Ribo™ IncRNA Smart Silencer 于 24 孔板，转染浓度为 100nM 为例，其他规格容器的试剂用量请参考表 2。

1) 接种细胞

- a. 贴壁细胞：以 HeLa 细胞为例，接种 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞至含有适量完全培养基 (v1) 的 24 孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到 30~50%。
- b. 悬浮细胞：以 THP1 细胞为例，接种 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞至含有适量完全培养基 (v1) 的 24 孔板培养孔中。

注：1) 不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量，细胞密度需要依据细胞类型，培养时间，实验目的而定；2) 每孔接种的细胞数量应尽量相同，使细胞均匀分布。

2) 转染步骤

对于每个转染样品，请按以下步骤准备：

- a. 稀释 Ribo™ IncRNA Smart Silencer：用 30μl 1X riboFECT™ CP Buffer (v2) 稀释 2.5μl 20μM Ribo™ IncRNA Smart Silencer 储存液 (v3)，轻轻混匀。
- b. 混合液制备：加入 3μl riboFECT™ CP Reagent (v4)，轻轻吹打混匀，室温孵育 0~15min。
注：1) 请勿振荡，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 riboFECT™ CP 混合液加入到 464.50μl 细胞培养基 (v1) 中，轻轻混匀。
注：混合液加入至原细胞培养基，一般无需移除或更换，但需依据客户具体实验情况而定。
- 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 CO₂ 培养箱中培养 24~96h（培养时间与实验目的相关）。

表 2 使用 riboFECT™ CP 转染 Ribo™ IncRNA Smart Silencer 用量参考

v1: 细胞培养基; v2: 1X riboFECT™ CP Buffer; v3: 20μM Ribo™ IncRNA Smart Silencer; v4: riboFECT™ CP Reagent

	Silencer 终浓度	每孔体积	培养基 (v1)	Buffer (v2)	Silencer (v3)	Reagent (v4)
96-well	200nM	100μl	92.40μl	6μl	1.0μl	0.6μl
	100nM	100μl	92.90μl	6μl	0.5μl	0.6μl
	50nM	100μl	93.15μl	6μl	0.25μl	0.6μl
24-well	200nM	500μl	462.00μl	30μl	5.0μl	3μl
*	100nM	500μl	464.50μl	30μl	2.5μl	3μl
	50nM	500μl	465.75μl	30μl	1.25μl	3μl
12-well	200nM	1ml	924.00μl	60μl	10μl	6μl
	100nM	1ml	929.00μl	60μl	5μl	6μl
	50nM	1ml	931.50μl	60μl	2.5μl	6μl
6-well	200nM	2ml	1848.00μl	120μl	20μl	12μl
	100nM	2ml	1858.00μl	120μl	10μl	12μl
	50nM	2ml	1863.00μl	120μl	5μl	12μl

注: *为实验参考用量示例, 对于部分细胞类型需要进一步优化。

3) 效果检测:

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

- a. RNA 水平的检测: RNA 是检测 IncRNA 抑制效率的最佳指标, 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。
- b. 功能检测: 应用 EdU 细胞增殖、EdUTP 细胞凋亡等检测方法进行 Ribo™ IncRNA Smart Silencer 对细胞功能的直接筛选。