

荧光 siRNA 产品使用说明

RN: R11077.2

产品简介

荧光标记的 siRNA 是检测转染效率、优化转染方法最常用的一种方法。荧光标记的 siRNA 转染细胞后，可以直接使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察，也可以通过流式细胞仪检测，确定是否有效转染及转染效率的高低。荧光标记的 siRNA 还可用作追踪 siRNA 在胞内的定位及分布的情况。

运输保存

产品以冻干粉的形式储存于**棕色管**中，**常温运输**。收到产品后，请于**-20℃~-80℃保存**，冻干粉可以稳定保存一年。使用前瞬时离心，用 **RNase-free Water** 配制成 **20μM** 储存液，分装避光保存，**避免反复冻融（不超过 5 次）**。

表 1 20μM 储存液的配置参考

siRNA(nmol)	1	5	10
溶解体积(μl)	50	250	500

注：所有过程请注意避光！

使用前须知

1) 我们提供三种荧光基团标记的 siRNA，进行实验前请先了解检测仪器的配置和参数，选择合适的荧光标记。

表 2 锐博生物荧光标记 siRNA 可选荧光

荧光染料	最大激发波长	最大发射波长
FAM	492 nm	518 nm
Cy3	550 nm	565 nm
Cy5	649 nm	680 nm

2) 请先熟悉转染操作，以快速准确的完成荧光标记 siRNA 的转染。

3) 储存、使用过程中及检测过程中请注意避光。

4) 检测前请先熟悉检测仪器的操作，若使用荧光显微镜或激光共聚焦检测，检测时不宜同一位置曝光时间过长，应对好焦后马上拍照，防止曝光时间过长而荧光淬灭。

使用方法

1, 转染

具体操作请参考使用的转染试剂说明，最好设置合适的转染试剂浓度及荧光标记 siRNA 浓度梯度，综合考虑转染率及转染试剂副作用，以选择合适的浓度进行 RNAi 实验。

以下为以 *riboFECT*TM CP Reagent 转染 siRNA 于 24 孔板，转染浓度为 50nM 为例，其他规格容器的试剂用量请参考表 3，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

- a. 稀释 siRNA：用 30μl 1X *riboFECT*TM CP Buffer (v2) 稀释 1.25μl 20μM siRNA 储存液 (v3)，轻轻混匀。
- b. 混合液制备：加入 3μl *riboFECT*TM CP Reagent (v4)，轻轻吹打混匀，室温孵育 0~15min，制备成转染复合物。

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*TM CP 混合液加入到 465.75μl 无双抗完全培养基 (v1) 中，轻轻混匀。

注：*riboFECT*TM CP 转染复合物加入至原细胞培养基中一般无需移除或更换，但亦可依据具体实验情况进行优化。

- d. 将细胞置于培养箱中正常培养。

表 3 使用 *riboFECT*TM CP 转染 siRNA 用量参考

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

	siRNA 终浓度	每孔体积	培养基 (v1)	Buffer (v2)	siRNA (v3)	Reagent (v4)
96-well	100nM	100μl	92.90μl	6μl	0.5μl	0.6μl
	50nM	100μl	93.15μl	6μl	0.25μl	0.6μl
	30nM	100μl	93.25μl	6μl	0.15μl	0.6μl
	20nM	100μl	93.30μl	6μl	0.1μl	0.6μl
	10nM	100μl	93.35μl	6μl	0.05μl	0.6μl
24-well	100nM	500μl	464.50μl	30μl	2.5μl	3μl
	*	50nM	500μl	465.75μl	30μl	3μl
	30nM	500μl	466.25μl	30μl	0.75μl	3μl
	20nM	500μl	466.50μl	30μl	0.5μl	3μl
	10nM	500μl	466.75μl	30μl	0.25μl	3μl
12-well	100nM	1ml	929.00μl	60μl	5μl	6μl
	50nM	1ml	931.50μl	60μl	2.5μl	6μl
	30nM	1ml	932.50μl	60μl	1.5μl	6μl
	20nM	1ml	933.00μl	60μl	1μl	6μl
	10nM	1ml	933.50μl	60μl	0.5μl	6μl
6-well	100nM	2ml	1858.00μl	120μl	10μl	12μl
	50nM	2ml	1863.00μl	120μl	5μl	12μl
	30nM	2ml	1865.00μl	120μl	3μl	12μl

	20nM	2ml	1866.00μl	120μl	2μl	12μl
	10nM	2ml	1867.00μl	120μl	1μl	12μl

2, 检测

可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪检测，使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜可获得图像以分辨假阳性，使用流式细胞仪检测可快速得到转染率，减少多次拍照和计数的操作。

检测时间点：按转染试剂要求弃掉转染液更换为新鲜培养基的时间点上检测，或者其它合适的时间点。

注：由于 Cy3 和 Cy5 为脂溶性，可能粘附于细胞表面影响观察，推荐使用激光共聚焦显微镜进行检测。

以下为 MHCC97H 细胞分别转染 FAM、Cy3、Cy5 标记的 siRNA 激光共聚焦显微镜拍照的结果。

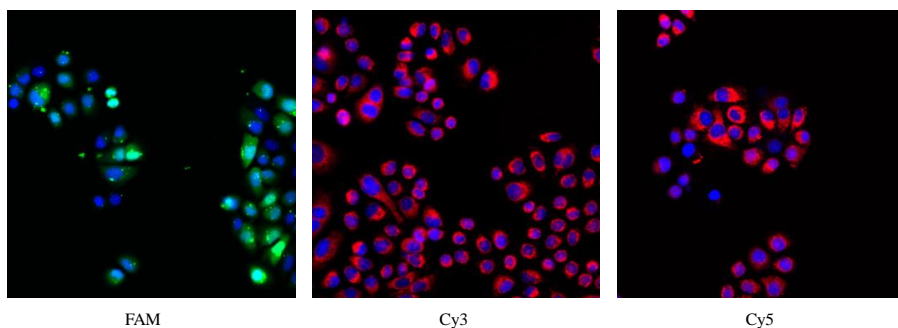


图 1 分别使用 FAM、Cy3、Cy5 标记的 siRNA 转染 MHCC97H 细胞后进行激光共聚焦显微镜拍照

相关产品

产品编号	产品名称
C10511-05	riboFECT™ CP Transfection Kit(166T)
C10511-1	riboFECT™ CP Transfection Kit(333T)
C10410-1	riboMONITOR™ Transfection Indicator Kit(Green),20T
C10410-2	riboMONITOR™ Transfection Indicator Kit(Green),40T
C10410-5	riboMONITOR™ Transfection Indicator Kit(Green),100T

1. 转染率如何检测？

转染率可通过转染带荧光标记的 RNA oligo 进行检测，一般可以转染后在荧光显微镜下检测计算阳性比例，或者通过流式细胞仪检测阳性率。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。另外，我们推荐使用转染指示剂 riboMONITOR™ 进行转染率检测，由于成功转染进细胞中的 RNA oligo 会富集定位于核内，可与粘附于细胞膜上的假信号显著区分，可以更准确的判断转染率。

2. 我想在目的 siRNA 标记荧光，同时检测转染效率和作用效果，这样做可以吗？

为尽量避免对目的 siRNA 作用效率的影响，通常选择用转染对照来检测转染效率，用无荧光标记的目的 siRNA 来检测作用效果。当然也可以尝试对目的基因 siRNA 标记荧光，同时检测转染效率和作用效果，但可能会有标记后 siRNA 失效的风险。

3. 转染对照转进去了就能代表目的 siRNA 转进去了吗？是不是每次实验都必须做？

转染效率的高低主要与细胞自身及所选择的转染试剂和转染方法相关，同等实验条件下，siRNA 的转染效率应该是相近的，如果荧光对照能成功进入细胞，可以间接代表目的 siRNA 也成功进入细胞。在具体的实验中，荧光对照不一定要求每次实验都做。但如果每次实验都做一个荧光对照组，将会更加便于排除一些实验问题。

4. 我该选择什么标记的荧光标记？标记在 siRNA 双链的哪条链、哪端？

- 1) 一般细胞水平检测转染效率偏向推荐 FAM/Cy3 标记，动物活体成像偏向推荐 Cy5/Cy7 标记；
- 2) 如果实验目的仅为检测转染效率，建议标记在非作用链 5'端；如果实验目的为示踪，则建议标记在作用链 3'端。