

## 产品简介

锐博生物的报告基因系列预制 mRNA 产品，包括 EGFP mRNA、RFP mRNA、Firefly luciferase mRNA、Renilla luciferase mRNA 等，使用了 Ribo-Cap1 帽结构类似物以共转录的方式合成，具有完整的 mRNA 结构，包括 Cap1 帽子、ORF 序列，5'UTR 和 3'UTR 序列，以及 polyA 结构，且按哺乳动物的密码子偏好性等进行了 ORF 序列的优化，提高了 mRNA 的稳定性及翻译效率，可在细胞内或体内高效的表达出有活性的蛋白。部分报告基因 mRNA 还使用了 N1-Me-pseudoU 修饰核苷酸，修饰核苷酸 N1-Me-pseudoU 的添加可以减少 mRNA 的先天免疫原性。

表 1 报告基因 mRNA 产品信息

产品编号	mRNA	规格	浓度	体积	碱基修饰
C12004-1	Ribo Cap1 EGFP mRNA	20 µg	1 µg/µL	20 µL	无
C12005-1	Ribo Cap1 EGFP mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU
C12006-1	Ribo Cap1 RFP mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU
C12007-1	Ribo Cap1 Firefly Luciferase mRNA	20 µg	1 µg/µL	20 µL	无
C12008-1	Ribo Cap1 Firefly Luciferase mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU
C12009-1	Ribo Cap1 Renilla luciferase mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU

## 运输保存

产品为低温运输。

收到产品后，请于-80°C 保存，可以稳定保存半年，避免反复冻融（不超过 5 次）。

## 使用前须知

1) 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，所有操作需严格遵循 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-80°C 小心保存。

- 2) 开盖前瞬时离心，轻柔开盖。
- 3) 首次使用时可根据后续使用计划对产品进行分装，每个分装管冻融不超过 5 次。
- 4) 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。
- 5) 本试剂仅供科研使用，不可用于体外诊断或治疗。

## 材料及仪器准备

1) 细胞转染系统，譬如 riboFECT mRNA Transfection Reagent (货号 C11055-1)，或者其它转染系统、递送系统、显微注射系统等，以及相关配套试剂。

- 2) 荧光显微镜、共聚焦显微镜等荧光检测系统。
- 3) 萤火虫萤光素酶底物，海肾萤光素酶底物、多功能酶标仪、小动物活体成像系统等荧光检测系统。

# 使用方法

以下以使用riboFECT™ mRNA Transfection Reagent于24孔板转染500 ng Ribo Cap1 EGFP mRNA为例，其他规格转染体系请参考表2，亦可根据实际实验需求另行调整。其它报告基因mRNA的使用方法可参考Ribo Cap1 EGFP mRNA。使用其它转染试剂请参考具体转染试剂说明书。

## 1 接种细胞

转染前18-24小时，取适量对数生长期细胞接种于24孔板中，实验前细胞密度达到约70%为宜。

注：①不同细胞生长速度不同，接种细胞的数量，转染时的细胞密度需要依据细胞类型，培养时间，转染方法，实验目的等而定，一般情况下以控制到检测时细胞接近长满为宜；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

2.1 取 25  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基（Thermo Fisher Scientific 产品），加入 0.75  $\mu\text{L}$  riboFECT mRNA Transfection Reagent 转染试剂，轻柔混匀后室温孵育 10 分钟。

2.2 另取一份 25  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基，加入 0.5  $\mu\text{L}$  Ribo Cap1 EGFP mRNA（1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ），轻柔混匀。

2.3 制备转染复合物，将 2.1 稀释的转染试剂溶液与 2.2 配制的 Ribo Cap1 EGFP mRNA 溶液混合到一起，室温孵育 5 分钟。

2.4 将 2.3 配制的转染复合物逐滴加入到含 450  $\mu\text{L}$  完全培养基的细胞中，轻轻混匀，继续培养 24~48 小时。

注：riboFECT™ mRNA 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；其它规格培养板可参考表 2 进行调整，并根据具体实验情况进行优化。

## 3 检测

使用荧光显微镜的绿色荧光通道进行成像检测。

注：其它检测系统可根据EGFP的光谱信息选择合适的检测通道进行检测，EGFP及其它报告基因光谱/底物信息请参考表3。

表2 使用 riboFECT mRNA Transfection Reagent 转染 mRNA 用量参考

组分	96-well	24-well	6-well
细胞完全培养基	90 $\mu\text{L}$	450 $\mu\text{L}$	2250 $\mu\text{L}$
细胞培养基调整到对应体积			
Opti-MEM Medium	5 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$
riboFECT mRNA Transfection Reagent	0.15 $\mu\text{L}$	0.75 $\mu\text{L}$	3.75 $\mu\text{L}$
稀释的 riboFECT mRNA Transfection Reagent 置于室温孵育 10 分钟。			
Opti-MEM Medium	5 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$
Ribo Cap1 EGFP mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	0.1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$
制备好后，与稀释的 riboFECT mRNA Transfection Reagent 混合，室温孵育 5 分钟，孵育结束后加入细胞中。			

注：实验参考用量示例，对于部分细胞类型需要进一步优化，譬如增加 Transfection Reagent 至二倍用量，调整 mRNA 用量等。

表3 报告基因光谱/底物信息

产品编号	报告基因	最大激发波长或底物	最大发射波长
C12004-1/C12005-1	EGFP	488 nm	507 nm
C12006-1	RFP	558 nm	591 nm
C12007-1/C12008-1	Firefly luciferase	D-萤光素	560 nm
C12009-1	Renilla luciferase	腔肠素	480 nm