



GenePharma

吉玛基因
www.genepharma.com

荧光标记的siRNA使用说明

一、荧光标记的siRNA

转染效率的高低可以通过观察荧光标记(FAM、CY3、CY5)的siRNA转染细胞后的荧光强度判断。荧光标记的siRNA转染细胞后, 可以用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪等检测, 确定转染是否有效及转染条件。荧光标记的siRNA还可用作siRNA胞内定位及双标记实验(配合标记抗体)来追踪转染过程中导入了siRNA的细胞, 将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。

二、使用荧光标记的siRNA检测转染效率

荧光标记的siRNA的溶解及保存

1. 由于OligoRNA是很轻的干膜状附在管壁上, 打开时极易散失, 所以打开离心管前先离心, 10000 rpm, 2 min然后再慢慢打开管盖, 溶解时加适量DEPC水后盖上管盖, 振荡溶解。
2. 需要浓度20 μ M的样品, 如何计算重悬siRNA缓冲液的量?
1 OD的siRNA, 加入125 μ l附送的DEPC水, 溶解后终浓度为20 μ M。
3. 贮存和稳定性: -20 $^{\circ}$ C, 避光保存, 冻干粉或液体。液体(贮存浓度为20 μ M)避免反复冻融, GenePharma保证在上述条件下siRNA oligo冻干粉的稳定性可达到6个月, 液体状态下建议3个月内使用完。

转染

1. 使用lipo fectamin2000转染的步骤(以贴壁细胞为例, 仅供参考)
 - a. 以24孔培养板操作为例(其他孔板各种的试剂用量, 请参照“Lipofectamine2000 manual”), 转染前一天, 将 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞接种于培养板中, 每孔中加入约500 μ l含血清的完全培养基, 使转染时的细胞密度能够达到70%;
 - b. 取1 μ l/孔Lipo fectamine2000(使用前轻轻摇匀), 用50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium稀释。轻轻混和后在室温孵育5 min ;
 - c. 取2 μ l荧光-siRNA, 用50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium稀释, 轻轻混和均匀;
 - d. 稀释的Lipofectamine2000(步骤b)经过5min的孵育后, 与稀释荧光-siRNA(步骤c)轻轻混和, 室温静置20min, 以形成荧光-siRNA-转染试剂混和物, 如果溶液出现浑浊, 属于正常现象, 不会影响转染效果。

注意: 稀释的Lipo fectamine2000尽量在25min之内和稀释的荧光-siRNA混和, 如果放置时间过长, 可能导致转染试剂活性的降低;

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195

E-mail: support@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: szsupport@genepharma.com

http://www.genepharma.com



B007-V002-20180807



吉玛基因
www.genepharma.com

GenePharma

- e. 将荧光-siRNA-转染试剂混和液(d)加入含有细胞及培养液(约含400 μ l)的孔中, 轻轻摇晃孔板, 使混和;
- f. 在37 $^{\circ}$ C的CO₂培养箱中培养, 4-6h后可将培养基换为含血清的完全培养基(该步骤可以省略);
- g. 转染6h后即可检测转染效率: 流式细胞仪、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等。

转染操作注意事项

- 1. 荧光-siRNA的转染过程和普通siRNA是一样的, 注意整个实验过程要尽量避光, 建议转染时室内和超净台内不要开灯;
- 2. 保持荧光-siRNA管外有锡纸包裹, 在静置lipo-siRNA过程中尽量避光;
- 3. 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;
- 4. 一般来说, 使用Lipofectamine 2000作为转染试剂, 4-6h就可以保证siRNA转染进入细胞。因此转染效率的检测可以在转染后6h(转染过程完成)进行。

观察与检测

- 1. 检测方法: 荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪
- 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)
 - a. 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; CY3是一种红色荧光基团, 由绿光激发, 激发波长545nm, 发射波长568nm;
 - b. 使用Lipofectamine 2000转染后6h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24h内完成检测;
 - c. 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荧光-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);
 - d. 观察时间不宜过长, 尽量避免荧光被淬灭, 光路对准转染孔, 马上观察和拍照。拍完荧光照片后, 最好在单一视野中拍下明场的细胞照片;
 - e. 有成功转染的细胞才能看到荧光, 并散在分布在细胞中;
 - f. 由于荧光容易淬灭, 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;
 - g. 如果您对我们荧光-siRNA质量有任何质疑的话, 您可以从中吸取少量(2-5 μ l)荧光-siRNA, 加在载玻片上, 直接于荧光显微镜下观察。注意保证荧光-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。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195

E-mail: support@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>