

荧光标记 siRNA 操作说明

产品信息

产品名称	荧光标记 siRNA
存储及运输条件	常温运输；-20℃保存。
有效期	冻干粉-20℃保存，可以稳定保存一年。

产品简介

荧光标记 siRNA（常用荧光基团包括 CY3、CY5 及 FAM）在转染细胞后，可通过荧光显微镜或激光共聚焦显微镜对转染效率进行定性及定量评估，亦可借助流式细胞术对转染阳性细胞进行分选富集。此外，该类荧光标记探针还可用于 siRNA 的胞内定位追踪及稳定性分析，并支持与靶蛋白特异性抗体共染，开展双标记实验，从而将成功摄入 siRNA 的细胞群体与靶蛋白表达下调现象建立直接关联。

本产品为化学合成的 21~23 nt 双链小分子 RNA，以冻干粉形式供应，开瓶即溶，无需预配制。

运输保存

产品使用棕色避光管以冻干粉的形式常温运输。收到产品后，请于-20℃保存，冻干粉可以稳定保存一年。

使用前瞬时低速离心（建议速率 1000rpm），用 RNase-free H₂O 或灭菌 ddH₂O 配制成 20μM 储存液，分装避光（如锡纸包裹）保存，避免反复冻融（建议不超过 5 次）。

表 1. 20μM 储存液的配置方法

siRNA(nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积(μl)	125	250	500	2500

使用须知

▲荧光标记 siRNA 以极薄的干膜状态贴附于管壁。开启管盖前，请务必先进行瞬时离心，随后小心开盖，向管内加入足量 RNase-free 水或灭菌 ddH₂O，盖紧管盖后涡旋振荡，使粉末充分溶解。

▲为确保产品活性，避免核酸酶、极端 pH 或温度等因素引起的降解，所有操作须严格遵循 RNA 实验规范。实验过程中，建议将产品始终置于冰上操作，用毕立即转移至-20℃环境下密封保存。

▲荧光标记 siRNA 由于荧光易淬灭，使用过程中一定要注意避光操作。

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，质因生物建议：

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

转染浓度

▲为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染荧光 siRNA 的量都需要经过实验确定，如果您是首次转染您的细胞系，推荐尝试使用不同浓度的 RNA 转染试剂，并在 10-100nM 范围内改变荧光 siRNA 的浓度，以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件，高浓度的荧光 siRNA 可能具有细胞系依赖性。

▲建议在细胞汇合度达到 30%~50% 时进行转染。基因沉默效果的检测通常在转染后 24 至 72 小时进行。采用较低的细胞密度进行转染，可延长转染与检测之间的时间窗口，从而降低细胞过度生长对细胞活性的负面影响。然而，针对某些特定的靶基因，高密度转染条件下的细胞状态可能更适于实验条件的优化，具体需根据靶基因的特性而定。

▲不要在转染时的培养基中加入抗生素，因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。

▲为了获得更好的结果，可以使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释 RNA 转染试剂和荧光 siRNA。可以使用发光标记的荧光 siRNA control 帮助优化细胞系的转染条件，一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验都包括荧光标记荧光 siRNA control 作为转染效率的指示剂。

转染(以质因生物 ZY FectEasy RNA 转染试剂为例)

1. 接种细胞

转染前一天将细胞接种至相应规格的培养板中，使转染当日细胞汇合度达到 30%~50%，具体参见表 2。对于悬浮细胞，为确保 RNA 转染试剂的转染效果，建议在转染当天采用减少培养基体积的方式接种细胞（即半液转染法），各规格培养板的推荐接种密度及培养基体积详见表 3。

表 2. 转染前一天推荐接种细胞数（贴壁细胞）

	接种细胞数量	每孔表面积	培养基体积
96-well	5 000 ± 2 500	0.3 cm ²	0.2 mL
24-well	25 000 ± 10 000	0.9 cm ²	0.5 mL
12-well	50 000 ± 20 000	3.8 cm ²	1 mL
6-well	150 000 ± 50 000	9.4 cm ²	2 mL
6 cm 培养皿 / 25cm ² 培养瓶	400 000 ± 100 000	25-28 cm ²	5 mL
10 cm 培养皿 / 75cm ² 培养瓶	1 × 10 ⁵ ± 250 000	75-78.5 cm ²	10 mL
14 cm 培养皿 / 175 cm ² 培养瓶	2 × 10 ⁶ - 5 × 10 ⁶	153-175 cm ²	20 mL

表 3. 在转染当天接种的悬浮细胞数量

	接种细胞数量	培养基体积
96-well	1 000 - 20 000	50 μ l
24-well	100 000 - 200 000	150 μ l
12-well	50 000 - 400 000	300 μ l
6-well / 3.5 cm	500 000 - 2×10^5	800 μ l

2. 转染步骤

注意: 荧光 siRNA 转染过程注意避光, 建议关闭室内和超净台的灯光, 整个操作过程要尽量快速完成。

① 贴壁细胞

建议荧光 siRNA 的转染浓度范围为 10 nM 至 100 nM, RNA 转染试剂的用量需根据荧光 siRNA 浓度及培养板规格进行相应调整。以 24 孔板、转染浓度为 10 nM 为例, 具体操作如下, 其他规格培养板的转染参数详见见表 4。

- 将 0.25 μ l 20 μ M 的荧光 siRNA 双链体稀释到 100 μ l 无血清培养基中或 Opti-MEM 中, 用移液枪轻轻吹打 3-5 次混匀。
- 向上述 100 μ l 荧光 siRNA 的培养基中加入 0.75 μ l RNA 转染试剂 t。加入后立即涡旋振荡 10 秒钟, 进行混匀。
- 在室温下孵育 10 分钟, 使荧光 siRNA 双链体和 RNA 转染试剂形成转染复合物, 孵育时间不要超过 30 分钟。
- 在转染复合物形成期间, 吸弃培养皿中原有的培养基, 并从每孔中重新加入 0.4 mL 预热的新鲜含血清的完全培养基
- 将步骤 C 中孵育好的 100 μ l 转染复合物加入到换液后的待转染孔中, 一字法轻摇细胞板混合均匀每孔中培养基的最终体积为 500 μ l, 荧光 siRNA 终浓度为 10 nM。
- 转染后细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。
- 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot (针对靶基因) 进行荧光 siRNA 效果检测。

注: 针对比较敏感的细胞, 建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 4. 贴壁细胞的推荐转染条件

培养板规格	siRNA 终浓度	siRNA 物质的量/质量	完全培养基体积	无血清培养基体积	培养基总体积	20 μ M 母液使用量	RNA 转染试剂体积
96-well	10-100 nM	2-20 pmol/0.032-0.32 μ g	150 μ l	50 μ l	200 μ l	0.1-1 μ l	0.2-3 μ l
24-well	10-100 nM	5-50 pmol/0.08-0.8 μ g	400 μ l	100 μ l	500 μ l	0.25-2.5 μ l	0.5-7.5 μ l
12-well	10-100 nM	10-100 pmol/0.16-1.6 μ g	800 μ l	200 μ l	1 mL	0.5-5 μ l	1-15 μ l
6-well	10-100 nM	20-100 pmol/0.32-3.2 μ g	1.8 mL	200 μ l	2 mL	1-10 μ l	2-30 μ l
6 cm	10-100 nM	50-500 pmol/0.8-8 μ g	4.6 mL	400 μ l	5 mL	2.5-25 μ l	5-75 μ l
10 cm	10-100 nM	100-1000 pmol/1.6-16 μ g	9.5 mL	500 μ l	10 mL	5-50 μ l	10-150 μ l

② 悬浮细胞

针对悬浮细胞，为了达到较高的转染效率，建议使用 20 nM-100 nM 的高荧光 siRNA 浓度范围进行转染摸索，同时适当提高 RNA 转染试剂的使用量：各指标参考数据见表 5。以下步骤用于在 24 孔板转染 100nM 荧光 siRNA 双链体。

- 将 1.25 μ l 20M 的荧光 siRNA 双链体加入到 100 μ l 无血清培养基中或 Opti-MEM 中，移液枪轻轻吹打 3~5 次混匀。
- 向上述 100 μ l 含荧光 siRNA 的培养基中加入 3.75 μ l RNA 转染试剂。立即涡旋振荡 10 秒钟，进行混匀。
- 在室温下孵育 10 分钟，使荧光 siRNA 双链体和 RNA 转染试剂形成转染复合物，孵育时间不要超过 30 分钟。
- 将步骤 C 中的 100 μ l 转染复合物加入到 150 μ l 含血清完全培养基的细胞悬液待转染孔中，一字法轻摇细胞板混匀，前后轻摇细胞板混合均匀。每孔中培养基的最终体积为 250 μ l，荧光 siRNA 终浓度为 100 nM，6h 后补 250 μ l。
- 转染后细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。
- 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot（针对靶基因）进行荧光 siRNA 沉默效果检测。

注:针对比较敏感的细胞，建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 5.根据荧光 siRNA 浓度和培养板规格推荐使用的 RNA 转染试剂体积

培养板规格	siRNA 终浓度	siRNA 物质的量/质量	细胞悬液体积	无血清培养基体积	培养基总体积	20 μ M 母液使用量	RNA 转染试剂体积	6h 后补液体积
96-well	20-100 nM	2-10pmol/0.032-0.16 μ g	50 μ l	50 μ l	100 μ l	0.1-0.5 μ l	0.2-1.5 μ l	100 μ l
24-well	20-100 nM	5-25 pmol/0.08-0.4 μ g	150 μ l	100 μ l	250 μ l	0.25-1.25 μ l	0.5-3.75 μ l	250 μ l
12-well	20-100 nM	10-50pmol/0.16-0.8 μ g	300 μ l	200 μ l	500 μ l	0.5-2.5 μ l	1-7.5 μ l	500 μ l
6-well	20-100 nM	20-100 pmol/0.32-1.6 μ g	800 μ l	200 μ l	1mL	1-5 μ l	2-15 μ l	1mL
6 cm	20-100 nM	50-250 pmol/0.8-4 μ g	2mL	500 μ l	2.5mL	2.5-12.5 μ l	5-37.5 μ l	2.5mL

注意事项

- 涉及荧光 siRNA 的操作都要注意避光，对 20 μ M 储存液进行分装时分装管注意包裹锡纸。
- 不同荧光标记检测波长：CY3-红橙光：激发光 550nm，发射光 570nm；CY5-红光：激发光 650nm，发射光 670nm；FAM-绿光：激发光 492nm，发射光 518nm。
- 在使用荧光显微镜观察转染效率时，需要关闭室内灯光，先在明场下使用未转染荧光 siRNA 孔调整好焦距，然后切换目的转染孔针对同一视野分别进行明场和荧光条件下的图像采集；操作过程要尽量快，避免荧光淬灭。建议转染后 24h 内完成图像采集。
- 如果在使用过程对荧光效果有疑问，可直接吸取少量母液（如 2-5 μ l）于载玻片上，置于荧光显微镜下进行 siRNA 荧光效果的观察；如果 siRNA 本身的荧光效果没有问题，考虑使用过程是否严格避光。

及是否成功转染进细胞。

售后说明

如若购买质因生物 siRNA 三保一产品，首次提供的三条 siRNA 序列若无效果，质因生物可以免费提供售后服务一次，进行售后服务需要提供以下相关信息：

1) siRNA 溶解及保存方法；

2) siRNA 沉默分析实验步骤【详细列举细胞模型、siRNA 导入方法、用于确定转染效率的细胞荧光图、RNA 提取、定量 PCR（引物及探针序列、程序、原始数据等），Western Blot 检测（检测结果、抗体公司及货号等）】。

如若在质因生物定制 siRNA 产品，则我们只保证 siRNA 序列与您提供定制的序列一致，不予承诺干扰效果。

如您在收到 siRNA 产品后 1 个月内未提出异议，我司则视为合格产品，不再受理投诉事宜；如确定存在产品质量问题，可联系我们进行相关售后服务。