

荧光标记的siRNA (FAM-siRNA) 使用说明

一、荧光标记的siRNA

转染效率的高低可以通过荧光标记的siRNA (FAM-siRNA) 实现。

FAM-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, 确定是否有效转染和优化转染条件。FAM-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 (FAM-siRNA) 检测转染效率

1 FAM-siRNA的溶解及保存

1.1 由于OligoRNA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, 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。

1.2 需要浓度20uM的样品, 如何计算重悬siRNA缓冲液的量? 你购买了1OD的siRNA, 想溶解为20uM 的样品, 应该使用150ul附送的DEPC水去重悬1OD的siRNA, 溶解后为20uM的样品。

1.3 贮存和稳定性: -20℃, 避光保存, 冻干粉或液体。液体(贮存浓度为20μM)避免反复冻融, GenePharma保证在上述条件下siRNA oligo的稳定性可达到6个月。

2 转染

2.1 使用lipofectamin2000 转染的步骤(以贴壁细胞为例, 仅供参考)

(1)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 $0.5\sim 2\times 10^5$ 个细胞接种于培养板中, 每孔中加入约500ul无抗生素的培养基, 使转染时的细胞密度能够达到30~50%;

(2) 取1 μ l/孔 Lipofectamine2000(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**;

(3) 取2 μ l FAM-siRNA,用50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释,轻轻混和均匀;

(4) 稀释的Lipofectamine2000 (2) 经过5min 的孵育后,与稀释FAM-siRNA (3) 轻轻混和,室温静置**20min**,以形成FAM-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Lipofectamine2000 (2) 尽量在**25min** 之内,和稀释的FAM-siRNA 混和,如果放置时间过长,可能导致转染试剂活性的降低;

(5) 将FAM-siRNA-转染试剂混和液(4)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;

(6) 在37 $^{\circ}$ C的CO₂ 培养箱中培养,4-6 小时后可将培养基换为含血清的完全培养基(该步骤可以省略);

(7)转染6小时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(见后面)。

2.2 转染操作注意事项:

(1) FAM-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FAM-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,**4~6** 小时就可以保证siRNA 转染进入细胞。因此转染效率的检测可以在转染后6小时(转染过程完成)进行。

3、观察与检测

3.1 检测方法: 荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪

3.2 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):

(1) 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**。

(2) 使用Lipofectamine 2000 转染后6 小时就可以检测，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24 小时内完成检测。

(3) 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FAM-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）。

(4) 观察时间不宜过长，尽量避免荧光被猝灭，光路对准转染孔，马上观察和拍照。拍完荧光照片后，最好在上一视野中拍下明场的细胞照片。

(5) 只有成功转染的细胞才能看到FAM 绿色荧光，与绿色荧光蛋白GFP 的荧光不太一样，FAM 的荧光比较弱，散在分布在细胞质中。

(6) 由于荧光容易猝灭，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。

(7) 如果您对我们FAM-siRNA 质量有任何质疑的话，您可以从中吸取少量(2~5 μ l) FAM-siRNA，加在载玻片上，盖上盖玻片，直接于荧光显微镜下观察。注意保证FAM-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。