



GenXion 即用型冻干粉

货号：GXF002

常规化学合成 GenXion 为 21~23nt 的双链小分子 RNA，产品为冻干粉形式的即用型试剂。

运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收到产品后，请于-20°C~-80°C 保存,冻干粉可以稳定保存一年。

使用前瞬时离心，用 DEPC H₂O 配制成 20uM 储存液，分装保存，避免反复冻融（建议不超过 5 次）。

表 1. 20uM 储存液的配置方法

| | | | | |
|---------------|-----|-----|-----|------|
| GenXion(nmol) | 2.5 | 5 | 10 | 50 |
| 溶解体积(uL) | 125 | 250 | 500 | 2500 |

注：1OD=2.5nmol=40ug

使用须知：

1) GenXion 呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先离心，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量 DEPC H₂O 后盖上管盖,震荡溶解。

2) 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，所有操作请严格遵循 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-20°C~-80°C 小心保存。

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，我们建议：

- 1) 转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；
- 2) 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。

1. 转染浓度：

1) 为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染 GenXion 的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系，推荐尝试使用几个 Lipofectamine™ 2000 的浓度，并在 20-100nM 范围内改变 GenXion 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 GenXion 可能具有细胞系依赖性。

2) 在 30-50%细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72h 进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间更长的间隙更长，从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性，高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。

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

4) 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 Lipofectamine™ 2000 和 GenXion。 可以使用荧光标记 GenXion 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转染荧光标记 GenXion, 作为转染效率的指示剂。

2. 转染步骤:

以 Lipofectamine™ 2000 转染 GenXion 于 24 孔板, 转染浓度为 50nM 为例,其他规格容器转染请参考表 2。

1) 接种细胞

贴壁细胞: 转染前 24h, 在 400ul 无抗培养基中接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞, 转染时细胞融合度为 30-50%。

(注: 铺板时要将细胞消化完全混匀, 避免细胞堆积生长。)

悬浮细胞: 转染前 24h, 在 400ul 无抗培养基中接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞, 转染时细胞数量应在 $4-8 \times 10^5$ /孔。

2) 转染步骤

A. 用 50ul Opti-MEM 稀释 GenXion (转染细胞的终浓度为 50nM), 轻轻吹吸 3-5 次混匀。

B. 轻轻颠倒混匀转染试剂, 用 50ul Opti-MEM 稀释 1.0 ul Lipofectamine™ 2000, 轻轻吹吸 3-5 次混匀, 室温下静置 5min。

C. 混合转染试剂和 GenXion 稀释液, 轻轻吹吸 3-5 次混匀, 室温下静置 20min。

D. 转染复合物加入到 24 孔细胞板中, 100ul/孔, 前后轻摇细胞板混合均匀。

E. 细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 18-48h。转染 4-6h 后可换新鲜培养基。

表 2.使用 Lipofectamine2000 (Invitrogen) 转染 GenXion 产品用量参考
VI: 完全或不完全培养基; V2: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素, 转染专用)

| | 每孔中总体积 (V1+V2+V2) | 终浓度 | GenXion产品 | lipo2000/孔 |
|---------|-----------------------------|-------|-----------|------------|
| 96-well | 100uL (50 uL +25 uL +25uL) | 100nM | 0.5uL | 0.25uL |
| | 100uL (50 uL +25uL+25uL) | 50nM | 0.25uL | 0.25uL |
| | 100uL (50uL+25uL+25uL) | 30nM | 0.15uL | 0.25uL |
| | 100uL (50nL+25uL+25uL) | 20nM | 0.1uL | 0.25uL |
| | 100uL (50uL+25uL+25uL) | 10nM | 0.05uL | 0.25uL |
| 48-well | 500uL (400uL+50UL+50uL) | 100nM | 2.5uL | 1uL |
| | 500uL (400uL+50UL+50uL) | 50nM | 1.25uL | 1uL |
| | 500uL (400uL+50UL+50uL) | 30nM | 0.75uL | 1uL |
| | 500uL (400uL+50UL+50uL) | 20nM | 0.5uL | 1uL |
| | 500uL (400uL+50UL+50uL) | 10nM | 0.25uL | 1uL |
| 12-well | 1mL (800uL+100uL+100uL) | 100nM | 5.L | 2uL |
| | 1mL (800uL+100uL+100uL) | 50nM | 2.5uL | 2uL |
| | 1mL (800uL+100uL+100uL) | 30nM | 1.5uL | 2uL |
| | 1mL (800uL+100uL+100uL) | 20nM | 1.0uL | 2uL |
| | 1mL (800uL+100uL+100uL) | 10nM | 0.5 uL | 2uL |
| 6-well | 2mL (1500uL+250uL+250uL) | 100nM | 10ul | 5uL |
| | 2mL (1500uL+250uL+250uL) | 50nM | 5uL | 5uL |
| | 2mL (1500uL+250uL+250uL) | 30nM | 3uL | 5uL |
| | 2mL (1500uL+250uL+250uL) | 20nM | 2uL | 5uL |
| | 2mL (1500uL+250uL+250uL) | 10nM | 1UL | 5uL |

注:表中数据仅供参考,对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化。

3) 效果检测:

转染完成后 24-72h 均可进行 GenXion 沉默效果检测,最佳检测时间与细胞类型,转染试剂,检测目的等相关。

A. RNA 水平的检测: mRNA 检测 GenXion 沉默效率的最佳指标, GenXion 转染后 24-72h 即可检测到靶基因 mRNA 表达明显降低,检测方法宜采用 QPCR 检测方法。注:引物设计质量很重要,需要确保检测引物有效性。

B. 蛋白水平的检测:蛋白是 RNAi 沉默效率的重要指标,其检测手段主要为 Western Blot 等。检测时间受细胞内蛋白质表达量、半衰期等因素的影响,一般为 48-96h。

功能筛选:应用 EdU 细胞增殖、EdUTP 细胞凋亡等方法进行细胞功能筛选。

官方网址: <http://www.genesion.com.cn>

订货热线: 4006169114、020-84224925

Email:whiga22@126.com

