



## GSPure® Circ-eGFP

### 产品简介

吉赛生物已建成 circRNA 原液生产体系，预制的 circRNA 标准品采用自主知识产权技术，完整性好、纯度高，可作为实验探索的阳性对照，用于翻译表达验证、转染递送评估、工艺流程优化等领域。

Circ-eGFP 是编码增强型绿色荧光蛋白基因（eGFP）的 circRNA，翻译表达后，可通过荧光显微镜观察到绿色荧光。

### 产品规格

产品名称	货号	性状	规格	浓度	溶剂
GSPure® Circ-eGFP	R0701	液态	100µg	1µg/µL	RNase-Free ddH <sub>2</sub> O
	R0702		500µg	1µg/µL	
	R0703		1mg	1µg/µL	
	R0704		10mg	1µg/µL	

### 运输与保存

产品干冰运输。-80°C超低温保存，可以稳定存放一年。

### 注意事项

1. 请严格遵循 RNA 操作规则，实验过程中请戴好手套和口罩，避免外界因素导致产品降解；
2. 首次使用时，请将产品瞬时离心，可按需分装-80°C保存，尽可能避免多次反复冻融；
3. 实验过程中，请将本产品置于冰上使用。

### 使用方法

本实验方法以使用 Lipo8000™转染试剂于 24 孔板转染 1µg/µL circRNA 至 293T 细胞为例，其它规格转染体系请参考下表，使用其它转染试剂请参考具体转染试剂说明书。

#### 1. 细胞铺板

转染前一天进行铺板，使每孔细胞汇合度达 30 ~ 40%，保证第二天细胞汇合度达 70 ~ 80%。

注：具体细胞数量根据细胞类型、大小及细胞生长速度等而定。



## 2. circRNA 转染

- (1) 转染前，用显微镜观察细胞汇合度达到 70 ~ 80% 时进行转染；  
注：有些细胞在密度偏低时，容易出现细胞毒性，过稀或过密都可能影响转染效率；
- (2) 转染前，把培养有细胞的 24 孔板，每孔更换为 0.5mL 新鲜培养液（含有血清和抗生素的完全培养液）；  
注：对于 Lipo8000™ 转染试剂，抗生素的存在不会影响转染效率，也不会导致细胞毒性；
- (3) 转染前，circRNA 需进行恒温 70°C 变性 3min（PCR 仪），立即冰浴 2min；
- (4) 参考表 1，取一个洁净无菌 EP 管，对于待转染的 24 孔板中每一个孔的细胞，依次加入 60μL Opti-MEM™、0.5μg 已变性 circRNA，再加入 1.2μL Lipo8000™ 转染试剂，用枪头轻轻吹打混匀；最后室温孵育 5 ~ 10min；  
注：此步骤操作速度尽量快，请注意不可旋涡或离心；

表 1: 转染试剂参考用量

	细胞量	培养液	Opti-MEM™	circRNA 总量	Lipo8000™
96-well	0.3 ~ 0.5×10 <sup>5</sup> 个/孔	0.1mL	10μL	0.1μg	0.3μL
24-well	1.2 ~ 1.4×10 <sup>5</sup> 个/孔	0.5mL	60μL	0.5μg	1.2μL
12-well	1.5 ~ 2.0×10 <sup>5</sup> 个/孔	1mL	120μL	1.0μg	2.4μL
6-well	2.0 ~ 3.0×10 <sup>5</sup> 个/孔	2mL	240μL	2.0μg	4.8μL

- 注：①尽可能现配现用，4°C 冰箱过夜会导致 RNA 降解，效果减弱；  
②实际操作可视细胞状况做出适当用量调整；

- (5) 按照 24 孔板每孔 1.2μL Lipo8000™ 转染试剂-circRNA 混合物的用量，均匀滴加到整个孔内，来回轻柔摇晃细胞培养板，每孔 circRNA 终浓度约为 1μg/mL；
- (6) 将细胞置于 37°C 含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 注意事项

1. 转染前细胞必须处于良好的生长状态；
2. 转染前 circRNA 需进行恒温 70°C 变性 3min（PCR 仪），立即冰浴 2min；
3. 转染混合物加样顺序：先加 Opti-MEM™，再加 circRNA，最后加 Lipo8000™，三者加完后用枪轻轻吹打混匀或轻弹混匀；
4. 转染混合物必须孵育 5 ~ 10min；
5. 转染混合物均匀滴加到每孔细胞；
6. 若转染后细胞培养天数大于 3 天，培养基颜色改变时请及时换液；
7. 转染 RNA 后，对于贴壁细胞不建议用胰酶消化/传代，一旦细胞经过胰酶消化，对荧光酶报告基因的检测有一定影响，仅换液即可；
8. 本方案只针对 Lipo8000™，不同的转染试剂按照对应的说明书执行。



## 实例

Circ-eGFP 能够在真核细胞中高效进行 eGFP 蛋白翻译。下图为使用制备的 Circ-eGFP 转染 293T 细胞的案例。

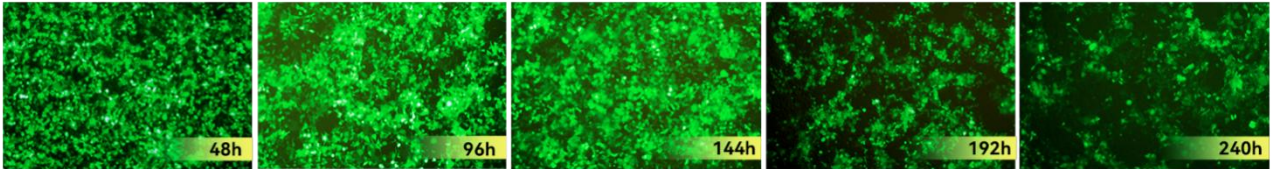


图 1: Circ-eGFP 转染 293T 细胞后荧光检测结果，放大倍数：100×。