

GenFectin 基因转染试剂

(可做 250 次 6 孔板或 35mm 平皿转染)

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C102-01	0.5 mL
C102-02	1 mL

◆**储存条件:** GenFectin (1.0mg/ml) 在室温下运输, 4℃保存, 有效期 12 个月, 使用前请务必涡旋振荡混匀。

◆适用范围及特点:

1. 适应于众多原代培养细胞和转化细胞株的基因转染。
2. 适用于瞬时转染和稳定转染。
3. 适应于贴壁细胞和悬浮细胞转染。
4. 转染效率高且稳定, 在有无血清存在的细胞培养基中均能获得高效率转染。
5. 细胞毒性低。
6. 转染程序简单, 转染实验可以在半小时内完成。

◆产品介绍:

基因转染需要一定的转染试剂将带有目的基因的载体运送到细胞内。目前, 最常用的转染试剂是阳离子脂质体和阳离子聚合物, 它们的特点和病毒类似, 容易透过细胞膜。其中, 阳离子脂质体在体外基因转染中有很高的效率, 然而在体内, 它迅速被血清清除, 在肺组织内累积, 诱发强烈的抗炎反应, 这将导致高水平的毒性, 因此, 在很大程度上限制了其应用。由于阳离子脂质体的局限性, 阳离子聚合物转染试剂日益受到重视。

本试剂采用专利配方的阳离子聚合物为主要成分, 可以与 DNA 形成稳定的复合物, 保护 DNA 免受核酸酶的降解, 在增加核酸稳定性的同时, 提高转染试剂/DNA 复合体穿越细胞膜的效率, 这种独特设计, 显著提高了基因转染效率。此类试剂是目前非病毒介导方法中效率最高的转染试剂(不同种类细胞的转染效率可有明显差异)。此外 GenFectin 不被血清清除, 血清和抗生素不影响其转染效果, 转染试剂/DNA 复合物可以直接加入完全细胞培养基中。GenFectin 的细胞毒性很小, 在适宜的条件下, 根据推

荐用量使用 GenFectin 进行转染实验，细胞存活率高于 90%。每一批产品出厂前都要对其转染效率和毒性经过严格质检。

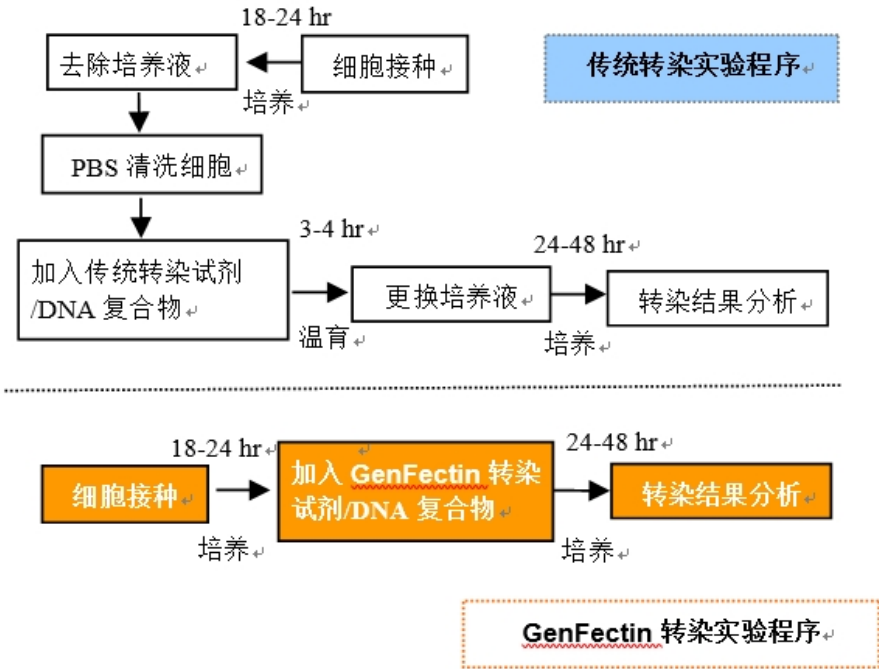


图 1. GenFectin 转染与传统转染实验程序比较

◆操作方法:

⇒ **所需其它试剂:** 使用者需准备 150 mM NaCl (超纯水配制, 高压或过滤灭菌)或注射用生理盐水作为 GenFectin 及 DNA 的稀释液, 和要转染的 DNA 溶液(高纯度, 浓度 0.1~2μg/μl)。

1. 细胞接种:

- 1) 为了获得最好的转染效率, 细胞密度应该 40-80%, 这因细胞株的不同而变化, 对最常用的细胞株建议细胞密度 50-60%。最理想条件是在转染前 18-24 小时, 接种适量细胞置 37℃, 5% CO₂ 培养。(推荐接种细胞数量见附表)
- 2) 转染前一个小时可以考虑更换一次新鲜的培养液, 体积可参考附表。然而, 对细胞毒性不敏感的细胞株可在细胞贴壁后(接种几小时后)即进行转染或者在细胞接种后立即进行转染也可以得到相近的结果。

2. 配制转染工作液: (6 孔板或 35 mm 平皿, 2 ml 培养液)

- 3) 取 5~8 μ g DNA(起始用量 5 μ g), 加入稀释液中至总体积为 100 μ l, 轻轻混匀, 室温放置。
 - 4) 先将 GenFectin 涡旋振荡混匀。取 GenFectin 1~4 μ l(起始用量 2 μ l), 加入稀释液中至总体积为 100 μ l, 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟。
 - 5) 将稀释的 GenFectin 逐滴加入稀释的 DNA 溶液中, 轻轻混匀, 所得的转染工作液在室温放置 15 分钟。
 - 6) 将转染工作液轻轻混匀, 逐滴加入 2 ml 培养液中, 轻轻混匀培养液, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养。
3. 细胞后续处理:
- 7) 24~48 小时后, 观察或收取细胞。
 - 8) 稳定转染时, 于转染后 24~48 小时消化细胞分至 3~5 个培养皿中, 加适当浓度的相应抗生素(如 G418)筛选。

◆建议的起始转染条件:

培养容器	转染前一天接种细胞数	转染时培养液体积	DNA 用量与稀释后体积	GenFectin 量与稀释后体积
96 孔板	1-1.5 $\times 10^4$ 个	0.1 ml	0.25 μ g/5 μ l	0.1 μ l/5 μ l
24 孔板	0.5-1 $\times 10^5$ 个	0.5 ml	1.25 μ g/25 μ l	0.5 μ l/25 μ l
6 孔板	2-4 $\times 10^5$ 个	2 ml	5 μ g/100 μ l	2 μ l/100 μ l
35mm 培养皿	2-4 $\times 10^5$ 个	2 ml	5 μ g/100 μ l	2 μ l/100 μ l
60mm 培养皿	4-6 $\times 10^5$ 个	4 ml	10 μ g/200 μ l	4 μ l/200 μ l

◆转染过程的优化: 影响转染效率的因素有很多, 细胞本身的特性和状态、转染试剂的用量、转染的 DNA 用量、转染试剂/DNA 复合物比例、形成的复合物的形态大小、细胞数/细胞密度、细胞和转染复合物接触孵育的时间等等都可能影响转染效果, 应该在具体实践中优化来确定最佳转染条件。优化后, 对于同一细胞株, 以后按照同样条件进行。

◆注意事项:

1. 少量使用 GenFectin 时, 可取精确量的 GenFectin 用无菌超纯水稀释一定倍数, 以便精确取样量。该稀释液可在 4 $^{\circ}$ C 保存 1 月左右。
2. 细胞的生长状态是转染效率的一个主要决定因素。在实验条件许可的情况下, 使用高质量的培养液、优质血清等, 可能会明显提高转染效率。
3. GenFectin 在转染中不受血清影响, 所以 GenFectin/ DNA 复合物能直接加到含血清

的培养基中，但稀释 GenFectin 和 DNA 的缓冲液不能混有血清，因为 GenFectin 在制备 GenFectin/DNA 复合物之前可能会与血清中的蛋白质反应，影响转染效率。

4. 如果细胞株很敏感，孵育 2-4 小时后除去转染复合物并加入含血清的新鲜培养基。

◆问题与解决方法:

问题	评论与建议
转染效率低	<ol style="list-style-type: none"> 1. 质粒浓度太低-建议: 使用最适宜的质粒数量。 2. 质粒纯度太低-建议: 使用高质量的质粒(OD260/280>1.8)。 3. 细胞生长状态欠佳-建议: 保证细胞密度和形态是最佳的。 4. 进一步减少转染时培养液体积(转染后 6~16 小时再补足量培养液)。 5. 从起始用量开始，调整配制转染液中 DNA 和 Genfectin 的用量(保持转染工作液总体积不变)，以确定不同细胞的最佳转染条件。一般固定 DNA 用量(5μg)，与系列含量的 Genfectin 混合,选取 Genfectin 的最佳用量;也可固定 Genfectin 用量(2μl)，与系列含量的 DNA 混合，选取 DNA 的最佳用量;还可以固定 GenFectin/DNA 比率增加或，者减少质粒的用量。 6. 设立阳性对照，例如 GFP Gene 和 luciferase Gene-建议: 以便检查转结果。
细胞毒性太大	<ol style="list-style-type: none"> 1. 接种前，细胞的健康状况直接影响细胞毒性。 2. 转染时细胞密度不能过低。 3. 增加转染时培养液体积，或保持 GenFectin/DNA 比率的同时减少质粒的用量。 4. 对某些敏感的细胞株，转染后 3~4 小时去除含转染复合物的培养液，更换为新鲜的完全培养液。 5. 确定基因产物是否有毒性。 6. 确认质粒没有内毒素。

