



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **GenFectin™**基因转染试剂
 - ◆ 目录号 **TF01**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

GenFectin™ 基因转染试剂

目录号: **TF01**

目录编号	包装单位	使用次数
TF0101	0.5ml	0.5ml 可进行 250 次转染 (6孔板或35 mm平皿)
TF 0102	1ml	1ml 可进行 500 次转染 (6孔板或35 mm平皿)

❖ 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

❖ 产品储存:

GenFectin™ (1.0mg/ml) 在室温下运输, 试剂到时请即存放于 4℃, 在 4℃ 可存放一年以上。使用前请涡旋振荡混匀。



❖ 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 复合物穿越细胞膜的效率，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控。



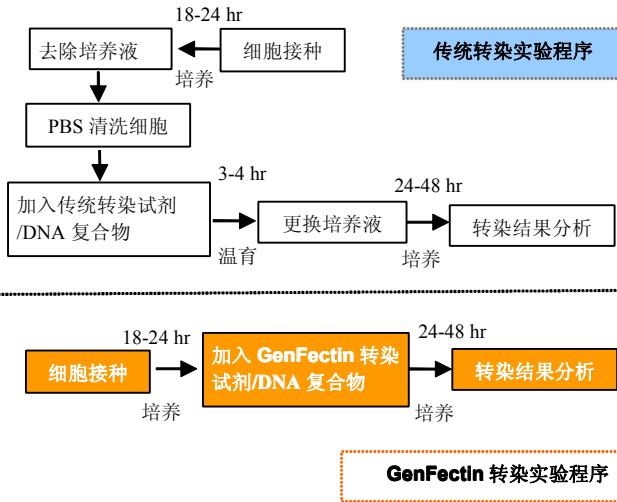


图 1. GenFectin 转染与传统转染实验程序比较

❖ **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℃ 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。

❖ **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 5~8μg DNA（起始用量 5μg），加入稀释液中至总体积为 100μl，轻轻混匀，室温放置。
- 4). **先将 GenFectin™ 涡旋振荡混匀。**取 GenFectin™ 1~4μl（起始用量 2μl），加入稀释液中至总体积为 100μl，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℃，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	1-1.5×10 ⁴ 个	0.1 ml	0.25 μg	5 μl	0.1 μl	5 μl
24 孔板	0.5-1 ×10 ⁵ 个	0.5 ml	1.25 μg	25 μl	0.5 μl	25 μl
6 孔板	2-4 ×10 ⁵ 个	2 ml	5 μg	100 μl	2 μl	100 μl
35mm 培养皿	2-4 ×10 ⁵ 个	2 ml	5 μg	100 μl	2 μl	100 μl
60mm 培养皿	4-6 ×10 ⁵ 个	4 ml	10 μg	200 μl	4 μl	200 μl

❖ 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。

❖ 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 小时再补充足量培养液)。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。