

## 使用说明书

1. 产品名称: PEI transfection Kit (Cat. No. AB-TP1001~ AB-TP1003)

### 2. 产品介绍

HTfect transfection Kit 是盎然生物技术有限公司研发的一种高效、低毒、廉价且重复性好的新型转染试剂, 特别适合于转染 293 等细胞来表达重组蛋白, 或者包装病毒, 进行 microRNA 靶基因 3'-UTR 分析、co-IP 等实验。

### 3. 产品原理

本转染试剂的成分主要是人工合成型阳离子多聚物, 能与 DNA 通过静电吸附作用而自组装成纳米微粒, 不但能保护 DNA 抵抗核酸酶的水解, 也有利于细胞的内存作用。

### 4. 产品优势

- (1) 转染效率高, 尤其对 293T 细胞的转染效率高达 95%以上。
- (2) 细胞毒性小, 细胞毒性显著低于 Lipofectamin2000 等。
- (3) 转染过程中无需更换无血清培养液, 操作简单。
- (4) 经济实惠, 特别适合大规模转染实验, 如表达重组蛋白或者包装病毒等。
- (5) 结果重复性好。

### 5. 制品内容

#### AB-TP1001

1. Sol.A	1.25 ml
2. Sol.B	20 ml

#### AB-TP1002

1. Sol.A	2.5 ml
2. Sol.B	40 ml

#### AB-TP1003

1. Sol.A	5 ml
2. Sol.B	80 ml

### 6. 储存条件

长期保存:  $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$

短期保存:  $4^{\circ}\text{C}$

### 7. 注意事项

- (1)  $4^{\circ}\text{C}$ 放置时间不要超过一个月, 否则会降低转染效率, 建议分装后 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。
- (2) 细胞转染期间用不含抗生素的培养基。
- (3) 转染试剂长期静置会产生一些白色沉淀, 用前需摇晃使沉淀溶解。
- (4) 转染用质粒建议用去除内毒素的方法提取。
- (5) 转染时细胞的密度保持在 60~80%。

## 8. 使用方法

### A. 细胞接种

转染所需细胞最好是在 25 代以内，细胞代数太高会降低转染效率。转染前一天铺板，第二天转染时细胞密度介于 60~80%。不同大小规格铺板所需的细胞数如表 1 所示。（以 HEK293 为例，不同细胞要根据其生长速度及细胞大小而定）

**表 1 细胞培养装置转染前一天推荐接种细胞数量**

细胞培养	每孔接种细胞数	细胞培养液体积
96孔板	$1.0-3.0 \times 10^4$	0.1-0.2 ml
48孔板	$3.0-8.0 \times 10^4$	0.25-0.5 ml
24孔板	$0.5-2.0 \times 10^5$	0.5-1 ml
12孔板	$0.8-4.0 \times 10^5$	1-2 ml
6孔板	$2.0-6.0 \times 10^5$	2-4 ml
60 mm培养皿	$4.0-8.0 \times 10^5$	5-10 ml
100 mm培养皿	$1.0-2.0 \times 10^6$	10-15 ml

### B. DNA 的准备

为得到较高的转染效果和较好的重复性，建议使用去内毒素的试剂盒来提取质粒。用分光光度计准确测定质粒浓度， $OD_{260/280}$  应该  $\geq 1.8$ 。稀释质粒所用的水或缓冲液应确保无菌。

### C. 转染

(1) 转染前一天，接种适当数量的细胞至细胞培养板中（用不含抗生素的培养基），使转染时的细胞密度能够达到 60~80%（不同细胞生长速度不一样，按照细胞培养经验来接种）。

**表 2 不同细胞培养装置中转染试剂所需用量**

培养细胞	质粒用量 ( $\mu\text{g}$ )	用 Sol.B 将质粒稀释至 ( $\mu\text{l}$ )	Sol.A 用量 ( $\mu\text{l}$ )	稀释 Sol.A 时 Sol.B 的用量 ( $\mu\text{l}$ )
96孔板	0.2	6.25	0.75	5.5
48孔板	0.5	12.5	1.5	11.0
24孔板	1	25	3.0	22.0
12孔板	2	50	6.0	44.0
6孔板	3~4	100	12.5	87.5
60 mm培养皿	5~6	165	25.0	140.0
100 mm培养皿	7~8	500	62.5	437.5

以下操作对应 6 孔板的单孔：

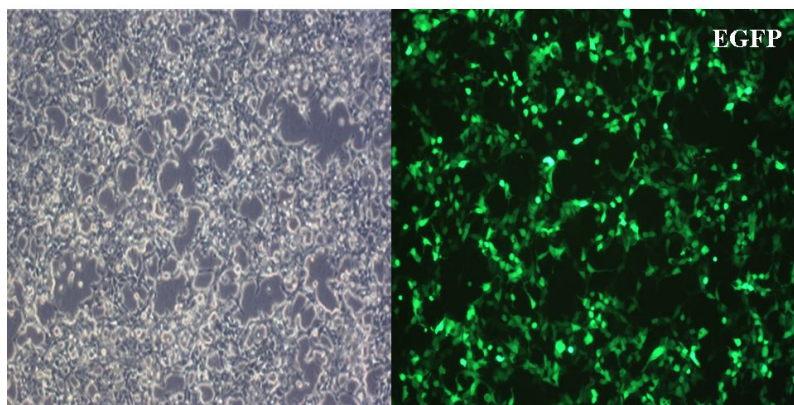
- 1) 在无菌的 1.5 ml 离心管中，用 Sol.B 将所需转染的质粒 3-4  $\mu\text{g}$  稀释至体积到 100  $\mu\text{l}$ ，混合均匀（称为混合物 A）。
  - 2) 在另外一个无菌的 1.5 ml 离心管中加入 12.5  $\mu\text{l}$  的 Sol.A，用 Sol.B 将其体积调至 100  $\mu\text{l}$ ，混合均匀（称为混合物 B）。
  - 3) 将 B 加入 A 中，用枪头混匀，室温静置 10 分钟。
- (2) 将 B 与 A 的混合物加入到含有 2 ml 培养液的培养孔中，轻轻混匀。
- (3) 培养 6-8 小时后，将含有转染试剂孔中的液体弃去，更换同样体积的新鲜培养液（可

含有抗生素)。

(4) 将培养板置于 37°C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24~48 h (依实验而定)。

## 9. 使用实例

用 3 μg 的 pLVX-cmyc-EGFP 质粒转染 HEK293 细胞, 转染两天后使用 Olympus 倒置荧光显微镜 (IX71) 进行拍照。(左图为明场细胞图像, 右图为绿色荧光细胞图像)。



## 问题解答

### 问题 1: 转染效率低

原因分析	解决办法
质粒用量不够	提高质粒的用量
质粒纯度不高	用无内毒素的试剂盒提取质粒
细胞数目偏低或偏高	接种细胞时选择合适的细胞数目, 24 小时后开始转染
细胞状态不好	传代次数不能太多, 转染时细胞应该处于生长最旺盛时期
长期静置本转染试剂, 会产生白色沉淀	用之前需摇晃使沉淀溶解且均匀

### 问题 2: 细胞死亡多

原因分析	解决办法
质粒纯度不好	用无内毒素的试剂盒提取质粒
未及时换液	转染 6-8 小时后, 需换新鲜的培养液
细胞状态不佳	选择细胞生长最旺盛时期接种细胞
质粒用量偏多	如果细胞对质粒的承受能力差, 稍微降低质粒的用量

### 问题 3: 转染结果重复性差

原因分析	解决办法
细胞铺板不均匀	需要提高细胞培养操作技术
质粒和转染试剂没有混合均匀	复孔在同一个管子中吹打混匀, 这样可以减少复孔之间的误差
将混合液加入细胞时没有混匀	建议逐滴加入细胞板的不同部位, 并前后左右轻轻混匀