

版本号: RM121221

Lipofect Transfection Reagent

Lipofect转染试剂

目录号: RM201

产品内容

目录号	产品名称	包装
RM201-01	Lipofect转染试剂 (1 mg/ml)	500 μ l
RM201-02	Lipofect Transfection Reagent	5 \times 1 ml

储存条件

4 $^{\circ}$ C 保存。不可冷冻。适当条件下可保存一年。

产品简介

本产品为阳离子脂质体转染试剂，适用于将核酸转入真核细胞中。

产品特点

1. 对大多数细胞都可高效转染。尤其对常用于蛋白表达的细胞系非常适合（如 COS-7, CHO和293），效率可超过90%。
2. 无论培养基中是否含有血清，DNA-Lipofect复合物都可直接加入。
3. 转染后不需再去去除复合物或更换、添加培养基。

注意事项

1. 准备复合物时，DNA(μg)与Lipofect (μl) 的比例范围为1:0.5到1:5。对大多数细胞，推荐用量为1:2到1:3。
2. 应在细胞密度高时转染。用于转染的最佳细胞密度根据不同的细胞类型或应用而异。一般贴壁细胞密度应为70-90%，悬浮细胞密度应为 2×10^6 - 4×10^6 细胞/ml时效果较好。因为转染效率对细胞密度很敏感，所以在不同实验间应保持一个基本的传代步骤，且应确保转染时细胞没有长满或处于静止期。
3. 转染时不要在培养基中加入抗生素，否则会导致细胞死亡。
4. 某些无血清培养基会抑制阳离子脂质体介导的转染，所以应事先检测培养基本转染是否有抑制。现已知CD293、293SFM II、VP-SFM培养基对转染有影响。

转染步骤

使用下列方法转染24孔板培养的哺乳细胞。如需使用其它培养板，应根据转染规模调整转染试剂的用量。

1. 贴壁细胞：转染前一天，胰酶消化细胞并计数，取 0.5×10^5 - 2×10^5 细胞铺板在0.5 ml含血清，不含抗生素的正常生长的培养基中，使其在转染时密度为90-95%。
悬浮细胞：转染前，即准备DNA-脂质体复合物前，取 4×10^5 - 8×10^5 细胞铺板在0.5 ml含血清，不含抗生素的正常生长的培养基中。
 2. 对于每孔细胞，使用50 μl 无血清培养基（如OPTI-MEM I 培养基）稀释0.8-1.0 μg DNA。多孔操作可以批量制备。
 3. 对于每孔细胞，使用50 μl 无血清培养基（如OPTI-MEM I）稀释1-3 μl Lipofect试剂，温和混匀，室温放置5 min。
-

注意：Lipofect稀释后，应在30 min内同稀释的DNA混合。保温时间过长会降低活性。
可以批量制备。

注意：即使Lipofect使用OPTI-MEM I 稀释，细胞也可以使用DMEM培养。如果DMEM
做为 Lipofect的稀释液，则应在5 min内同稀释的DNA混合。

4. 将稀释的DNA和稀释的Lipofect混合在一起（总体积为100 μ l）作为Mixture。在室温保温20 min。（溶液可能会变混浊，但不会影响转染。）

注意：DNA-Lipofect Mixture在室温条件下6 h内可保持稳定。

5. 直接将100 μ l Mixture加入到每孔中，摇动培养板，轻轻混匀。

注意：如果在无血清条件下转染，使用含血清的正常生长培养基进行细胞铺板。在加入
复合物前应移去生长培养基，替换为0.5 ml无血清培养基。

6. 在CO₂培养箱中37°C 保温24-48 h，无须去掉Mixture或更换培养基（在4-5 h后更换生长培养基也不会降低转染活性）。

7. 在细胞中加入Mixture 24-72 h后，分析细胞抽提物或进行原位细胞染色，检测报告基因活性。检测结果依赖于细胞类型和启动子活性。对稳定表达细胞系，在开始转染一天后将细胞按1:10或更高的稀释比例传代至新鲜培养基中，再培养一天后加入筛选抗生素，进行稳定表达需要数天或数周。

对悬浮细胞：在细胞中加入Mixture 4 h后加入PMA和/或PHA（如果需要）。

对Jurkat细胞：分别加PHA-L和PMA至终浓度为1 μ g/ml和 50 ng/ml，可增强CMV启动子活性和基因表达。

对K562细胞：只加入PMA即可增强启动子的活性。

扩大或降低转染规模

转染不同培养形式的细胞，可根据不同表面积改变Lipofect，DNA，细胞，培养基的比例。

对于96孔板培养，不再需要提前一天进行细胞铺板，而可以直接在平板中制备复合物，然后将细胞悬浮液加入到复合物就可以了，这样进一步减少了转染时间，但同传统方法相比活性稍低。

培养板	培养基用量/孔 (ml)	Mixture 体积(μl)	Mixture成份	
			DNA/RNA(μg)	Lipofect(μl)
96孔	0.1	25	0.2	0.5
24孔	0.5	50	0.8	2.0
12孔	1	100	1.6	4.0
35 mm	2	250	4.0	10
6孔	2	250	4.0	10
60 mm	5	500	8.0	20
10 cm	15	1500	24	60

优化条件

为得到更高的转染效率，应优化转染条件。改变DNA和Lipofect的浓度，细胞密度。还可以从1:0.5到1:5改变DNA(μg)和Lipofect的比例。
