

Version 1

Code No. AG51003

AccuFect 细胞转染试剂盒 (纳米聚合物法)

AccuFect Cell Transfection Kit (Nanopolymers)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是一种由纳米聚合物组成的转染试剂，适用于将质粒 DNA 转染到真核细胞中。其原理是质粒 DNA 与纳米聚合物形成多聚复合物，附着于细胞膜表面，在细胞内吞作用下进入到细胞内，在细胞中转录和表达。该方法对于常见的哺乳动物细胞具有较高转染效率、重复性好、操作简单、无明显的细胞毒性等特点。本产品基本不受细胞培养液中血清和抗生素的影响，即可在血清和抗生素存在的情况下进行细胞转染。

➤ 产品组成

组分名称	AG51003 (100 rxns /6 well plate)
<i>NanoFect</i> Reagent	150 μ l X 2 pcs
<i>NanoFect</i> Buffer	5 ml X 2 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C保存（*NanoFect* Reagent 每次使用完成后，拧紧管盖，并放回含有干燥剂的包装袋中。）

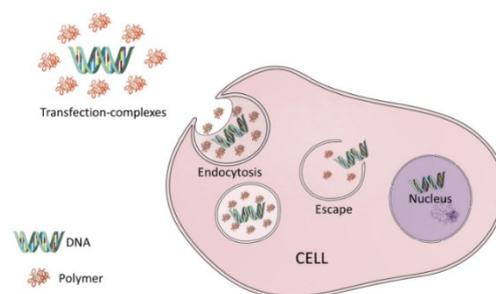
运输温度：干冰运输或-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品具有较高的转染效率，重复性好，无明显细胞毒性；
2. 本产品适用性广，适用于大多数贴壁细胞；
3. 本产品不受血清及抗生素的影响，转染过程中无需更换成无血清的培养基；
4. 本产品不仅适用于细胞的瞬时转染，也适用于细胞的稳定转染。

➤ 实验原理

纳米聚合物转染原理如右图所示：当 *NanoFect* Reagent 与质粒 DNA 结合后，形成多聚复合物，该复合物通过静电作用与细胞膜结合，在细胞内吞作用下进入到细胞内，在细胞质中解离并释放出 DNA，促进 DNA 核内递送，进行转录和表达。被转染的 DNA 可以在细胞内进行瞬时表达，也可整合到靶细胞的基因组上而产生稳定克隆。



➤ 使用注意事项

1. 实验过程中所使用的耗材需保证无菌污染；
2. 初次实验可考虑利用带有荧光标签的质粒对细胞密度、转染试剂以及 DNA 的添加量进行摸索，找出目的细胞的最佳转染条件；
3. 细胞生长状态会直接影响转染效率。因此，转染实验应使用生长健康且状态良好的细胞，转染时细胞融合度达到 50%~80%，具体密度根据培养的细胞进行调整；
4. *NanoFect* Reagent 使用完后盖紧盖子，并放回含有干燥剂的包装袋中；
5. 使用过程中请佩戴一次性手套等防护用品，避免造成细胞污染；
6. 本产品的分装以及实验操作均需在超净工作台中完成。

➤ 实验前准备

1. 确认细胞生长状态以及细胞汇合度，确保转染时细胞汇合度达到 50% ~ 80%。
2. 请提前将本试剂盒产品取出，待恢复至室温后再实验，*NanoFect* Reagent 使用前请涡旋混匀。
3. 准备实验所需的质粒 DNA 以及细胞培养所需的无菌材料。

➤ 操作方法（以 6 孔板为例）

此操作方法以 6 孔细胞培养板的单孔为例，其他类型培养皿或培养板可参考下表进行调整；以下所有操作建议在无菌操作台中进行。

培养皿	推荐质粒用量 (μg)	可摸索质粒添加 范围*(μg)	<i>NanoFect</i> Buffer (μl)	<i>NanoFect</i> Reagent (μl)
48-well	0.5	0.25~1.25	Up to 12.5 μl	0.2
24-well	1	0.5~2.5	Up to 25 μl	0.4
12-well	2	1~5	Up to 50 μl	0.8
6-well	5	2.5~12.5	Up to 100 μl	2

注：上表中均表示单孔所需试剂量。

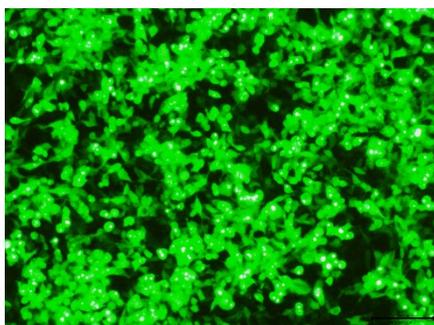
1. 转染前一天接种适量细胞于培养皿或培养板内，使细胞在转染前汇合度达到 50%~ 80%。
(注：一般 6 孔板可接种 $2\sim 8 \times 10^5$ 细胞/孔，不同类型的细胞生长速度和细胞大小不一致，建议在正式实验前可接种不同密度的细胞，摸索最佳的细胞接种密度。)
2. 转染前，提前将转染试剂取出，待其恢复至室温后再进行后续转染实验。
3. 取干净无菌的离心管，对于每孔待转染的细胞，在无菌离心管中添加 5 μg DNA 质粒使用 *NanoFect* Buffer 稀释至 100 μl ，用移液器轻柔吹打混匀 10~15 次。

(注：不同的细胞最佳转染条件不一样，若使用推荐用量所得到的转染效果不理想则可根据上表中推荐的“可摸索质粒添加范围”调整质粒用量。若初次转染后，细胞脱落情况明显，则可降低 *NanoFect* Reagent 添加量再进行尝试。)

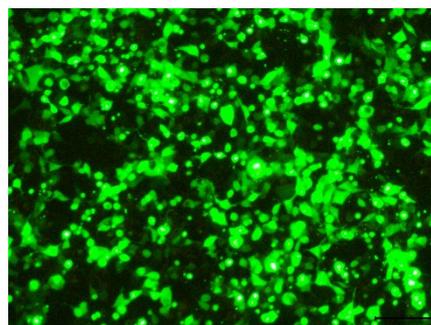
4. 涡旋混匀 *NanoFect* Reagent 溶液，取 2 μ l *NanoFect* Reagent 加入至已使用 *NanoFect* Buffer 稀释的 DNA 质粒中，轻柔涡旋混匀。
5. 在室温下孵育 10~20 分钟，形成转染复合物。孵育结束后用移液器吹打混匀。
(注：室温下 *NanoFect* Reagent 与质粒 DNA 孵育时间最好不要超过 30 分钟。)
6. 去掉待转染细胞孔中的一半培养基。
(注：可将细胞培养基更换成无血清培养基，可能会提高转染效率，但也可能会影响细胞的生长状态。)
7. 按照 100 μ l/孔将孵育后的转染复合物均匀滴加在细胞培养板中，轻轻前后左右晃动培养板，使转染复合物均匀的分布在细胞表面。
(注：混匀时避免旋转培养皿或培养板，防止沉淀集中于孔中间。)
8. 将细胞培养板置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 小时。
(注：不同的细胞系最佳的孵育时间可能会有所不同，可根据实际情况在 4~8 h 范围内调整优化。)
9. 然后去掉含有转染试剂的培养基，更换成 2 ml 新鲜完全培养基。根据实验需要置于培养箱中继续培养 24~72 h，收集细胞进行基因表达情况检测，通常在转染 24 h 后就可检测到转染基因的表达。

➤ 实验例

12 孔板中，使用本产品转染 2 μ g 的 EGFP 质粒至 293T 细胞及 293 细胞，48 h 后，在显微镜下可观察到很强的绿色荧光，获得较高的转染效率，如下图所示：



293T 细胞 (12 孔板)



293 细胞 (12 孔板)

➤ 产品注意事项

1. 合适的细胞可获得较好的转染效率
 - ❖ 不同种类的细胞对转染试剂及方法常表现出不同的转染效率。纳米多聚物

转染的方法适用于贴壁细胞，对悬浮细胞转染效率较低。因此，一般不建议使用本产品进行悬浮细胞的转染；同时，在正式实验前可使用报告基因表达载体（如带 GFP 绿色荧光蛋白标签的质粒）进行转染预实验，摸索最佳的转染条件。

- ❖ 在实验室培养、保存过程中，细胞会发生不同的突变、总染色体重组或基因调控等变化。同一种系的细胞株，在各实验室不同培养条件下，其生物学性状会发生不同程度的改变，导致其转染特性也发生变化。因此，不同实验室的细胞转染效率不同，建议在正式实验前进行预实验，摸索最佳的转染条件。
- ❖ **细胞状态**同样会影响转染效率。最适合转染的细胞是处于指数生长期的细胞，细胞生长旺盛，容易转染。传代次数高时，细胞的生长速度和形态会发生改变。细胞传代次数过多、细胞受到污染常导致细胞生长状态较差从而降低转染效率，建议使用复苏后经过传代培养 2~3 代，处于指数生长期、健康且无污染的细胞，解冻后传代次数建议不要超过 10 次。
- ❖ **细胞接种密度**：活跃分裂期的细胞能更好地摄取外源核酸，细胞接种密度过高时可能会引起接触抑制，导致核酸摄取不良、转染效率下降或表达效率降低；细胞接种密度过低时，转染后可能会影响细胞正常生长；细胞接种不均匀导致细胞局部密度过于密集或稀疏，影响转染效率。不同的细胞生长速率以及细胞大小有所不同，因此，建议正式实验前先对细胞密度进行摸索获得合适的细胞接种密度，一般建议将细胞转染时（接板~24 h 后）的细胞密度控制在 50%~80%。

2. 使用高质量的质粒

- ❖ 多的转染试剂原理为正负电荷间相互吸引，因此 DNA 质量对转染效率有较大的影响，若质粒中存在污染物会影响细胞正常生长；而盐离子可能会干扰转染复合物的形成，从而降低转染效率；内毒素的存在会影响细胞生长状态大大降低原代细胞和其他敏感细胞的转染效率。因此转染需使用高纯度、无内毒素以及无菌的高质量质粒 DNA，且需确保质粒 DNA 的 A260 / A280 的比值在 1.8~2.0 的范围。可使用本公司无内毒素质粒提取试剂盒 (Code No. AG21028)提取获得较高质量的质粒 DNA 用于转染。
- ❖ 最佳的质粒用量可参考本说明书推荐进行摸索。不同的细胞种类最佳的质粒与转染试剂比例有所不同，质粒添加量过少和过多，均可能导致转染效率较低，建议在首次实验时进行 DNA 质粒添加量摸索。

3. 转染试剂影响

- ❖ 不同的细胞种类最佳的质粒与转染试剂比例有所不同，*NanoFect* Reagent 添加量过少可能导致转染效率较低，过多可能会影响细胞正常生长。若首次实验，建议按照推荐的加入 *NanoFect* Reagent 用量，摸索 DNA 质粒添加量。
- ❖ *NanoFect* Reagent 过多，可能会影响细胞生长，导致细胞脱落。若转染后出现一定程度的细胞毒性，可尝试降低转染试剂 *NanoFect* Reagent 的用量，调整质粒用量后再做尝试。
- ❖ *NanoFect* Reagent 需要保存在有干燥剂的试剂盒中，避免吸潮，造成转染效率降低。

4. 细胞培养物

- ❖ 新鲜且无污染的培养基对细胞正常生长至关重要，若培养基长期放置可能会影响细胞生长而影响转染效率。因此建议使用新鲜配制的培养基，配制后放置时间不超过 1 个月。
- ❖ 血清是一种包含生长因子及其他辅助因子的不确切成分的添加物，对不同细胞的生长作用有很大的差别。血清质量的变化直接影响细胞的生长状态，进而可能间接地影响转染效率。建议使用高品质的血清培养细胞，以确保细胞生长状态良好能获得较理想的转染效率。
- ❖ 细胞培养过程中一般会加入抗生素来防止真菌、细菌等污染，通常情况下抗生素对细胞无害。当进行转染实验时，转染试剂可能会增加细胞膜的通透性，使过多的抗生素进入细胞内，导致细胞死亡，造成转染效率降低。通常情况下，本产品不受抗生素的影响。