DOTAP 真核细胞转染试剂使用说明 C1510

描述：DOTAP是一种阳离子脂质体，可与DNA或RNA形成稳定的转染复合物进入细胞，并将核酸释放入细胞内。它以可靠性和高效性著称，是广泛使用的商品化转染试剂。我们的DOTAP真核细胞转染试剂是由DOTAP和中性辅助脂质以特定比例融合制备而成的单层脂质体悬液。这种制备方法增加了脂质体对真核细胞转染的高效性、广谱性、低毒性和可靠性，并使试剂在4°C储存至少稳定12个月。DOTAP可高效转染多种细胞，甚至在低浓度血清环境也可工作良好。它属于可被生物降解的脂质体因而细胞毒性明显降低，其转染效率高于Sigma公司的DOTAP单体转染试剂，与Invitrogen的LipofectAMINE相当，但其价格仅相当同类试剂的1/3。

转染时只需将稀释的DOTAP试剂与DNA溶液混合并室温放置15分钟即可加入细胞。1 ml DOTAP可转染100-500µg DNA或50-100只35mm培养皿或250-1000孔24孔板细胞。

颜色：清亮或略呈白色胶体溶液。
储存：4°C储存12个月。切勿冻存。
适用：将DNA、RNA、寡聚核苷酸转入真核细胞。适用于大多数传代或原代细胞。

转染步骤：
以生长于24孔板的一个孔内的贴壁细胞为例，使用其它规格培养皿参见表一。

细胞准备：
转染前一天传0.5-2 x 10^5细胞于24孔板内，加1 ml正常培养基培养。***在光镜下观察细胞，当细胞群覆盖培养瓶皿生长表面的 85-95%时，为DOTAP转染的最佳时机***。这通常需要18-24小时，但依细胞类型和接种量而变。注意：传代时接种过多的细胞，100%长满的细胞的转化效率明显降低

制备转染复合物：
对特定细胞类型来说，应该优化加入DNA (µg)和DOTAP (µl)比率和绝对量，参见后面附表。推荐DNA和DOTAP的初始比例为1:4。

DNA (µg) ：DOTAP (µl) ＝ 1:2～1:8

转染实际上是人为造成细胞对外源物质的高摄取状态，因此过量摄入DNA和转染试剂将导致细胞毒性而降低转染效率。与细胞接触的转染混合物中DOTAP 的最大浓度不应超过30 µl/ml，DNA浓度应小于5µg/ml。参考表一制备转染复合物，参照表二进行优化。下面的步骤以生长于24孔板的单孔贴壁细胞为例。悬浮细胞转染参见表一后面的说明。

1. 取1 µg DNA稀释到25 µl 无血清无抗生素培养基，混匀。
2. 取2-8 µl DOTAP 加入到25 µl 无血清抗生素培养基，轻轻混匀。
3. 吸取稀释的DNA溶液加入到稀释的DOTAP溶液中，上下吹吸混匀，勿振荡。室温孵育15分钟。
   如果按照相反的顺序将稀释的DOTAP溶液与DNA混合，将生成相反类型的DNA转染复合物，有可能会导致转染效率下降。
4. 在此期间用无血清培养基洗涤细胞1-2次，按照表一Step 5加入适宜体积的无血清无抗生素培养基。
5. 加入步骤3获得的转染复合物于培养瓶皿内，轻轻混合与细胞充分接触，开始转染细胞。
6. 二氧化碳孵箱37C孵育细胞4小时。
7. 吸除转染混合物，加入含血清的正常培养基；或直接将含血清培养基加到孔内，继续培养24小时以上。观察细胞，进行下一步实验。或1:10稀释传代，进行G418筛选。

表一 DNA和转染试剂稀释表

			Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5
Culture Vessel	Area cm^2	Cell No.	Dilute DNA (µg) to media (µl)	Dilute DOTAP (µl) to media (µl)	DOTAP : DNA mixture	Serum-free media in well	Total Trans. volume
96-well	0.3	1×10^4	0.2 µg in 10 µl	0.5 µl in 10 µl	20 µl	80 µl	100 µl
48-well	1	5×10^4	0.5 µg in 20 µl	2 µl in 20 µl	40 µl	100 µl	140 µl
24-well	2	1×10^5	1 µg in 50 µl	4 µl in 50 µl	100 µl	200 µl	300 µl
12-well	4	2×10^5	2 µg in 100 µl	8 µl in 100 µl	200 µl	400 µl	600 µl
6-well	10	5×10^5	4 µg in 250 µl	15 µl in 250 µl	500 µl	1000 µl	1.5 ml
35-mm	10	5×10^5	4 µg in 250 µl	15 µl in 250 µl	500 µl	1000 µl	1.5 ml
60-mm	30	1×10^6	10 µg in 500 µl	40 µl in 500 µl	1000 µl	2000 µl	3 ml
10-cm	75	4×10^6	20 µg in 1000 µl	60 µl in 1000 µl	2000 µl	4000 µl	6 ml

悬浮细胞转染

悬浮细胞转染与上述步骤类似：(1) 离心收取细胞，用不含血清培养基洗涤2次；将1 x 10^6 细胞混悬于1ml无血清培养基，加入6孔板内。(2) 按照表一制备转染复合物。将转染复合物加到悬浮细胞的培养基中，轻轻混匀。(3) 二氧化碳孵箱培养4小时。(4) 吸除转染混合物，换常规培养基，继续培养24小时以上。观察细胞或进行下一步实验如G418筛选。

转染优化程序：

对特定类型的细胞，欲获得最大转染效率和最低细胞毒性，应该对加入DNA和DOTAP的绝对量和比率、浓度等分别进行优化，步骤参见表二。表二是生长于24孔板的单孔细胞为例进行优化操作的。由于可以理解的心理因素，实验人员在转染时常常趋于加入过量的DNA和转染试剂和使用更小的转染复合物体积。从表二可以计算，如果每孔加入1 µg DNA和8 µl DOTAP，在200 µl转染混合物中，DNA的浓度将为5µg/ml，DOTAP浓度达到40µl/ml，二者的浓度很容易产生细胞毒性；另外转染混合物体积很少时不利于操作也不利于细胞生长，不利于获得最佳转染效率。作为参考，通常最后的转染混合物中DNA浓度应小于5µg/ml，DOTAP浓度应<30～40 µl/ml。表二给出DNA和转染试剂的量、比率、浓度等指标仅作为参考。

表二 转染优化操作程序

1. 优化DNA:DOTAP 比率，固定加入0.5 µg DNA

DNA : DOTAP ratio	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
DNA µg in 25 µl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DOTAP µl in 25 µl	0.5	1	1.5	2	2.5	3
Add media µl	150	150	150	150	150	150
Final volume µl	200	200	200	200	200	200
Final DNA concentration µg/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Final DOTAP concentration µl/ml	2.5	5	7.5	10	12.5	15

2. 优化DNA和DOTAP 绝对剂量，固定DNA:DOTAP 比率为1:3或1:4

DNA : DOTAP ratio	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
DNA µg in 25 µl	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6
DOTAP µl in 25 µl	0.6	1.2	2.4	3.6	4.8
Add media µl	150	150	150	150	150
Final volume µl	200	200	200	200	200
Final DNA concentration µg/ml	1	2	4	6	8
Final DOTAP concentration µl/ml	3	6	12	18	24

3. 优化DNA和DOTAP 浓度，固定DNA和DOTAP 绝对量和比率为1:3或1:4

DNA : DOTAP ratio	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
DNA µg in 25 µl	1	1	1	1	1
DOTAP µl in 25 µl	3	3	3	3	3
Add media µl	100	150	200	250	300
Final volume µl	150	200	250	300	350
Final DNA concentration µg/ml	6.7	5	4	3.3	2.85
Final DOTAP concentration µl/ml	20	15	12	10	8.5

说明：

使用高纯水和不含内毒素的质粒DNA、溶液、器皿。常规方法制备的质粒DNA含有大量内毒素，可明显降低降低转染效率。使用**内毒素清除剂 (Endotoxin Removal Reagent) #D1501**清除内毒素。