

## 脂质体转染试剂（可替代 Lipo2000） C1520

**描述:** 脂质体转染试剂（可替代脂质体转染试剂）是一种新型的阳离子脂质体转染试剂。适合于将核酸(DNA 和 RNA)转染入真核细胞,具有低细胞毒性;对多种类型的细胞和培养板都具有高转染效率;转染时血清的存在不影响转染效率的优点。

**适用范围:** 贴壁细胞和悬浮细胞（哺乳动物细胞系）的转染。

**规格:** 0.75ml ; 2-4℃保存一年。(避免冷冻)

### 质粒 DNA 的转染

对大多数细胞来说, DNA ( $\mu\text{g}$ ) 与脂质体转染试剂的比例为 1:2~1:3。转染时高的细胞密度可以得到高的转染效率和表达水平,并能减少细胞毒性。

#### 1. 以 24 孔板为例

**贴壁细胞:** 转染前一天,用 500  $\mu\text{l}$  不含抗生素的培养基接种  $0.5\sim 2\times 10^5$  细胞,使之第二天能达到 70-90%汇合。

**悬浮细胞:** 用 500  $\mu\text{l}$  不含抗生素的培养基接种  $4\sim 8\times 10^5$  细胞即可。

#### 2. 对每个转染样品,进行以下操作

a. 在Eppendorf管里分别加入50  $\mu\text{l}$  Opti-MEM I Reclipped Serum Medium和0.8  $\mu\text{g}$  DNA轻柔混匀,制成DNA稀释液。

b. 在另一个Eppendorf管里分别加入50 $\mu\text{l}$  Opti-MEM I Reclipped Serum Medium和2.0  $\mu\text{l}$  脂质体转染试剂(注意用前先混匀),轻柔混匀,制成脂质体转染试剂稀释液,室温静置5分钟。

c. 将DNA稀释液和脂质体转染试剂稀释液混合,轻柔混匀,室温静置20分钟,形成DNA-脂质体转染试剂复合物。DNA-脂质体转染试剂复合物在室温下可稳定存在6小时。

3. 将DNA-脂质体转染试剂复合物加入到接种好的细胞中,将培养板轻轻地前后摇动,使复合物分散均匀。

4. 在37℃ CO<sub>2</sub>培养箱中培养4-6小时后更换培养基,继续培养18~48小时。

5. 如果要筛选稳定细胞株,则在转染24小时后将细胞按照1:10或更高的比例接种到新鲜培养基中,第二天加入选择性培养基进行筛选。

质粒DNA转染的优化 为达到最高的转染效率和降低细胞毒性的影响,可以对DNA和脂质体转染试剂的比例以及细胞密度进行优化,一般在1:0.5~1:5的范围内优化DNA ( $\mu\text{g}$ ) 和脂质体转染试剂( $\mu\text{l}$ )的比例。

不同细胞培养板中转染时培养基、核酸及脂质体转染试剂用量

| 细胞培养板   | 每孔面积                | 培养基用量   |            | DNA转染  |        | siRNA    |         |
|---------|---------------------|---------|------------|--------|--------|----------|---------|
|         |                     | 铺板培养基用量 | 稀释培养基用量    |        |        |          |         |
| 96-well | 0.3 cm <sup>2</sup> | 100 uL  | 2 × 25 μl  | 0.2 μg | 0.5 μl | 5 pmol   | 0.25 μl |
| 24-well | 2 cm <sup>2</sup>   | 500 uL  | 2 × 50 μl  | 0.8 μg | 2.0 μl | 20 pmol  | 1.0 μl  |
| 12-well | 4 cm <sup>2</sup>   | 1 mL    | 2 × 100 μl | 1.6 μg | 4.0 μl | 40 pmol  | 2.0 μl  |
| 6-well  | 10 cm <sup>2</sup>  | 2 mL    | 2 × 250 μl | 4.0 μg | 10 μl  | 100 pmol | 5 μl    |
| 60-mm   | 20 cm <sup>2</sup>  | 5 mL    | 2 × 0.5 ml | 8.0 μg | 20 μl  | 200 pmol | 10 μl   |
| 10-cm   | 60 cm <sup>2</sup>  | 15 mL   | 2 × 1.5 ml | 24 μg  | 60 μl  | 600 pmol | 30 μl   |

**注意事项：一定要进行预实验，来摸索最佳条件**

- 1) 转染试剂必须与细胞匹配，没有万能的转染试剂。
- 2) 高纯度的DNA或RNA才能获得较高的转染效率！用于转染的质粒DNA必须无蛋白质，无内毒素，无RNA和其他化学物质的污染，OD260/280比值应在1.8以上。血清中含有大量的蛋白质，在转染过程中，带负电的蛋白质可能干扰阳离子脂质体对核酸的吸附，影响转染效率。另外，使用脂质体等转染试剂时，由于含血清转染会将血清中的蛋白带入细胞，引发细胞毒性，导致转染效率降低，故用无血清培养基转染效果更好！
- 3) 转染时细胞必须处于良好生长状态，转染时细胞的密度一般铺板率在达到70—80%最好（此时细胞处于对数生长期）；
- 4) 如果是贴壁细胞，应保证贴壁在12~24小时在进行转染，否则细胞转染容易脱壁。对于贴壁生长细胞，一般要求在转染前一日，必须应用胰酶处理成单细胞悬液，重新接种于培养皿或瓶，转染当日的细胞密度以70-90%（贴壁细胞）或 $2 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$ 细胞/ml（悬浮细胞）为宜，最好在转染前4h换一次新鲜培养液。
- 5) 转染时注意脂质体和质粒的用量，过量的话对细胞毒性大也容易失败。
- 6) 转染作用6小时一定记得要换含血清的培养基。
- 7) 培养基以及洗涤细胞和稀释用的培养基要无血清、无双抗。
- 8) 转染试剂对个别细胞可能有一定毒性，在转染过程由于提高细胞的通透性因而不能在培养基中添加抗生素。
- 9) 培养基中的血清：在开始准备DNA和转染试剂稀释液时要使用无血清的培养基，因为血清会影响复合物的形成。其实，只要在DNA-转染试剂复合物形成时不含血清，在转染过程中是可以使用血清的。

- 10) 培养基中的抗生素: 抗生素是影响转染的培养基添加物。这些抗生素一般对于真核细胞无毒, 但阳离子脂质体试剂增加了细胞的通透性, 使抗生素可以进入细胞。这降低了细胞的活性, 导致转染效率降低。
- 11) 一般在转染24-48h, 靶基因即在细胞内表达。根据不同的实验目的, 24-48h后即可进行靶基因表达的检测实验。
- 12) 如若建立稳定的细胞系, 则可对靶细胞进行筛选, 根据不同基因载体中所含有的抗性标志选用相应的药物, 常用的真核表达基因载体的标志物有潮霉素和新霉素等。
- 13) 建议设置阳性对照和阴性对照。

### 脂质体转染试剂用于不同细胞转染时用量参考 (以 96 孔板为例)

| 细胞型号     | 培养基   | 每孔细胞数               | DNA的量 | 转染试剂量  |
|----------|---|---------------------|-------|--------|
| 293H     | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| 293FT    | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| 293E     | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| 293F     | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| COS7     | DMEM  | 1.5×10 <sup>4</sup> | 0.4µg | 0.5µL  |
| hela     | DMEM  | 2×10 <sup>4</sup>   | 0.3µg | 0.5µL  |
| Caco2    | MEM   | 3.5×10 <sup>4</sup> | 0.3µg | 0.75µL |
| BHK21    | MEM   | 2×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| CHO-DG44 | DMEM+HT+pro                                 | 2×10 <sup>4</sup>   | 0.5µg | 0.5µL  |
| RAW264.7 | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| MCF7     | MEM/NEAA+0.01mg/mL insulin + sodium pyruvat | 2×10 <sup>4</sup>   | 0.1µg | 0.25µL |
| SW480    | IMDM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.4µg | 0.5µL  |
| MDCK     | DMEM  | 4×10 <sup>4</sup>   | 0.6µg | 1µL    |
| CHO-K1   | IMDM+Pro                                    | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.2µg | 0.5µL  |
| HepG2    | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.5µg | 0.75µL |
| A549     | DMEM  | 2×10 <sup>4</sup>   | 0.3µg | 0.5µL  |
| NIH/3T3  | DMEM  | 1.5×10 <sup>4</sup> | 0.1µg | 0.75µL |
| vero     | DMEM  | 3×10 <sup>4</sup>   | 0.3µg | 0.75µL |
| sf9      | SIM SF                                      | 5×10 <sup>4</sup>   | 0.4µg | 0.75µL |

### 常见细胞的转染效率 (仅供参考, 实验条件不同转染效率会有较大差别)

|      |        |        |      |         |         |       |          |       |      |       |       |         |        |      |
|------|--------|--------|------|---------|---------|-------|----------|-------|------|-------|-------|---------|--------|------|
| 细胞种类 | HEK293 | 293T   | 293F | HCT 116 | WRL -68 | HepG2 | NIH/3T3  | THP-1 | Hela | MCF-7 | CHO-S | TS cell | HO1980 | A549 |
| 转染效率 | 99%    | 99%    | 99%  | >80%    | ~80%    | ~80%  | ~80%     | >50%  | >80% | >80%  | 97%   | >60%    | >60%   | >80% |
| 细胞种类 | MEF    | BE(2)C | CHO  | Chok1   | Hep3B   | C2C12 | Neuro-2a | HUVEC | MDCK | Hep2C | WEHI  | B50     | Calu1  | L929 |
| 转染效率 | >50%   | 77%    | 96%  | >50%    | >80%    | >80%  | >70%     | >80%  | >80% | >80%  | >80%  | >70%    | >70%   | >70% |