

LipoFiter 脂质体转染试剂操作说明

Version: HBRG-LF-001



产品信息

产品名称	LipoFiter 高效转染试剂
货号	HB-LF-1000
存储及运输条件	4°C保存，冰袋运输
规格	1mL
有效期	1 年

产品简介

LipoFiter 脂质体转染试剂(LipoFiter Liposomal Transfection Reagent)是一种适合于把质粒或其它形式的核酸,以及核酸蛋白复合物转染到真核细胞中的高效阳离子脂质体转染试剂。

产品优势

- 1、转染效率高，重复性好，操作简单。
- 2、无明显细胞毒性，用 LipoFiter 转染细胞后，对于大多数细胞 72 小时内不更换培养液无明显细胞毒性。
- 3、LipoFiter 对于贴壁细胞和悬浮细胞都适用，并且可以用于稳定表达细胞株的筛选。

使用说明

1、1. 细胞培养：以 293T 细胞为例，转染前一天(20-24 小时) $\sim 0.4 \times 10^6$ 细胞(具体的细胞数量据细胞大小和细胞生长速度而定)铺到六孔板内，使第二天细胞汇合度 (confluent) 能达到约 50%~70%。

注 1: 汉恒生物 LipoFiter 对细胞毒性极小，因此无需通过增大细胞汇合度来抵抗转染试剂毒性，我们实验证明，50%~70% confluent 时细胞的转染效率可以达到最优。

注 2: 其它培养板或培养皿参考六孔板进行操作, 其他培养介质如培养板, 培养皿的详细细胞接

2、2. 在进行下述转染步骤前, 把六孔板每孔内换成新鲜细胞培养液。培养液的体积约 2 ml。

注: 其他培养介质培养液体积参见《各种培养介质下 LipoFiter 转染 DNA 详表》, 抗生素、Glutamine 等对 LipoFiter 转染并无影响。如果 LipoFiter 对目的细胞毒性较大, 建议去除转染体系内的抗生素。

3、把 LipoFiter 脂质体转染试剂轻轻混匀。

4、对于待转染的六孔板中一个孔的细胞, 取一只洁净无菌离心管, 加入 4μg 质粒 DNA (其他培养介质 DNA 用量参见附表) 到 250 μl DMEM 溶液, 用枪轻轻吹打混匀。

注: 其他培养介质培养液体积参见《各种培养介质下 LipoFiter 转染 DNA 详表》, 如后续实验需要, 可将 DMEM 用其他如 1640、MEM、F12 等培养基代替, 对 LipoFiter 转染效率及操作并无影响。

5、取另一只洁净无菌离心管, 加入 250 μl DMEM 溶液, 再加入 10 μl LipoFiter, 用枪轻轻吹打混匀, 室温放置 5 分钟。

6、将步骤 4 与 5 中的 DNA 溶液与 LipoFiter 溶液混合, 用枪轻轻吹打混匀。注意: 不可 Vortex 或离心。

7、室温孵育 20 分钟。有可能出现絮状沉淀物, 属正常现象, 不会影响转染效率。

8、无论是贴壁细胞还是悬浮细胞, 均把 500μl LipoFiter-DNA 混合物全部加入六孔板的一个孔内。加入时注意尽量均匀加入到整个孔内, 随后轻轻“8”字摇摆混匀。

注: 针对贴壁细胞, 如上述所说, 只需将 LipoFiter-DNA 复合物加入细胞中孵育 6 小时再换液即可。若是转染悬浮或半悬浮细胞, 则推荐通过平角离心转染法, 即将适量的 LipoFiter - DNA 复合物加入细胞培养皿后 (步骤 8), 封好封口膜, 放入平角离心机, 低速 (200 g) 离心 1.5 小时, 放入培养箱中正常培养 6 小时再换液即可。

9、细胞培养箱内培养 6-12 小时后, 去除含有 LipoFiter-DNA 的无血清培养液。每孔加入 2 ml 新鲜含血清的细胞培养液继续培养。

注: 通常 LipoFiter-DNA 混合物和细胞一起孵育 6 小时已经足够产生较高的转染效率。大多数细胞和 LipoFiter 3.0-DNA 一起培养长达 72 小时未见明显细胞毒性。但转染后 6 小时更换新鲜培养液对于一些生长非常快速的细胞有助于提高转染效率。对一些比较易于转染的细胞如 HEK-293T 细胞, 换液可视细胞生长状况而定, 无需为提高转染效率而换液。

10、转染后续处理:

1) 对于基因表达, 再培养 24-40 小时后即可检测转染效果, 如转染带 GFP 或者其他荧光基因的表达式, 可用荧光显微镜观测细胞转染效率。

2) 用于筛选稳定表达细胞株, 则在转染后 24 小时即可加入适当的筛选药物, 例如 G418 或 Puromycin (嘌呤霉素) 等, 进行稳定表达细胞株的筛选。

注 1: 为了保证实验操作的平行性和稳定性, 以 6 孔板中一个孔为例, 目的质粒和对照质粒的量一般为 4 μg 不同细胞间的质粒添加量可能存在差异, 可摸索最适质粒使用量后再进行正式试验)。而 LipoFiter 的用量通常是 4-10μl (质粒量/LipoFiter 量=1:1~1:2.5)。因细胞类型及培养条件、转染参数等会极大的影响转染效率, 因此, 为了获得最佳转染条件, 我们建议在上述推荐参数的基础上自行优化。对于多个孔转染相同数量相同质粒的情况可以把每个孔所需的 LipoFiter 和 DNA 混合物配置在一个离心管内, 后续混匀孵育等步骤后可以分加到各个孔内。

注 2: 对于其它培养板或培养器皿, 各种试剂的用量可以参考附录《各种培养介质下 LipoFiter 转染 DNA 详表》进行换算。

附录

各种培养介质下 LipoFiter 转染 DNA 详表

类型 (培养皿/培养板)	表面积/cm ²	对应细胞培 养液体积	溶剂 DMEM 对应体积/μl	DNA	LipoFiter
96-well	0.3 cm ²	100 μl	2 x 25 μl	0.2 μg	0.2-0.5 μl
48-well	0.8 cm ²	350 μl	2 x 37.5 μl	0.5 μg	0.5-1.25 μl
24-well	2 cm ²	500 μl	2 x 50 μl	0.8 μg	0.8-2 μl
12-well	4 cm ²	1 ml	2 x 100 μl	1.6 μg	1.6-4 μl
6-well	10 cm ²	2 ml	2 x 250 μl	4.0 μg	4-10 μl
60mm	20 cm ²	4 ml	2 x 0.5 ml	8.0 μg	8-20 μl
100mm	60 cm ²	12 ml	2 x 1 ml	24 μg	24-60 μl