

说明书

转染试剂 L2000 Transfection Reagent

产品介绍

本品是一种新型的阳离子脂质体转染试剂，通过带正电的脂质体与带负电的核酸（如质粒 DNA、siRNA、mRNA 等）形成复合物，这些复合物通过内吞作用进入细胞，随后释放核酸到细胞质或细胞核中，实现基因表达或沉默。可在多种贴壁和悬浮细胞系中提供高效转染，在保证高转染效率的同时具有极低的细胞毒性。本产品适用细胞类型广，转染时血清和抗生素的存在不影响转染效率，毒性小，大部分细胞转染后可无需更换培养基。

特点

- 适用于多种细胞系（如 HEK293、HeLa、CHO 等）。
- 优化配方在高效转染的同时减少对细胞的损伤。
- 操作简便，操作步骤标准化，通常仅需 15~30 分钟复合物形成时间。
- 适用范围广：可用于 DNA、siRNA、miRNA、mRNA 等多种核酸的转染贴壁细胞和悬浮细胞的转染。
- 性价比高，质量媲美进口品牌，价格低廉，适合工业大规模生产。

储存事项

冰袋运输，短时间内可室温运输，但需避免光源、热源，长时间储存请放置于 4℃，切勿冻存，有效期 24 个月。

注意事项

- △ 整个实验过程避免细胞污染，注意无菌操作，转染前需调整细胞状态，选择细胞状态最佳时机进行转染。
- △ 由于不同细胞耐受性不同，建议您在做批量实验前，分不同梯度量先做预实验，摸索最佳质粒和转染试剂的混合比例。（在保证细胞状态前提下，增加转染试剂及质粒用量会相对提高转染效率。）
- △ 转染 siRNA 至细胞时，遵循操作步骤所述的 DNA 实验方案，但细胞汇合度需调整。

操作步骤（以 6 孔板 转染 DNA 贴壁细胞为例）

1. 细胞准备，转染前一天将细胞接种至孔板内，细胞接种数量视其生长速度和细胞系类型而定，以六孔板为例一般为 $0.25-1 \times 10^6$ 个细胞。转染时要求细胞生长的汇合度为 70%~90%，如转染 RNA 或转染后需长时间观察（如 72 小时），可适当降低初始密度，以免细胞过度增长。（注意在降低细胞密度的同时，需同时减少转染体系中各试剂用量），具体接种数量及密度可以根据细胞长势及观察时间综合而定。细胞状态与转染效果影响很大，选择最佳的细胞状态更有利于转染效率提高和转染后细胞状态的恢复。
2. 将 EanGul L2000 加入减血清专用培养基中，轻轻混匀，室温静置 2~3 分钟。
注意：减血清稀释液建议采用本公司专用培养基 Ordi-MEM (OPTI-MEM)，或可用无血清 DMEM，1640 代替，不可用 PBS。
3. 将质粒 DNA (0.5-5μg/μL) 加入专用培养基 Ordi-MEM (OPTI-MEM) 进行稀释，制成 DNA 预混液匀。
4. 将步骤 2 中已稀释的转染试剂中加入等体积步骤 3 中 DNA 稀释液，孵育 5~15 分钟。
5. 将 DNA 和转染试剂混合液滴加至孔板的孔内，前后左右晃动孔板混匀，置于培养箱中培养。
6. 转染 18~48 小时后，倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白表达，或加入抗性培养基筛选稳定表达细胞系单克隆。

用量参照表（表中用量为每孔用量，如转染多孔，可根据单孔用量乘以孔数，整体配置试剂。）：

细胞培养容器	表面积 (cm ²)	培养基 总体积	稀释液 体积	DNA 转染		RNA 转染	
				DNA 用量	转染试剂用量	RNA 用量	转染试剂用量
96-well	0.3	100μl	25μl×2	0.2μg	0.2-0.5μl	5pmol	0.375μl
24-well	1.9	500μl	50μl×2	0.5g	1.0-2.5μl	20pmol	1.5μl
12-well	3.8	1ml	100μl×2	1.33μg	2.5-7.5μl	40pmol	3μl
6-well/35-mm	10	2.5ml	150μl×2	2.5μg	5.0-12.5μl	100pmol	7.5μl
60 mm/T25	21	5ml	0.5ml×2	8.0μg	20μl	200pmol	10μl
100mm/T75	58	15ml	1.5ml×2	24.0μg	60μl	600pmol	30μl

注意：

- 转染后，由于不同细胞耐受性不同，建议 6 小时后观察细胞状态，如果细胞状态不好，请及时更换成无双抗的完全培养基，状态好的情况下，24~48 小时后也要更换培养基。如果长时间不换液细胞会因为培养体系中营养匮乏而出现异常。
- 观察检测时间过早或太晚都会影响观察效率。建议首次转染后分别在 16~72 小时，设置观察点，选择最佳荧光观察时间。一般荧光蛋白在 48 小时左右达到峰值。RNA 敲低实验，相对时间更长，建议 48~72 小时后检测。部分原代及难转染细胞甚至需要更长时间（72~96 小时）。
- 由于血清和培养条件等差异，转染后镜下培养基中可能出现少量黑点状沉淀，为转染试剂和血清中蛋白结合产物，不影响转染结果和细胞状态，可通过换液体除去。
- 由于不同质粒大小，包括细胞种类及状态不同，决定了质粒和转染试剂在不同情况下会有不同的转染最佳条件，如果细胞敏感，耐受性差，建议减少转染试剂用量。在细胞状态允许的情况下或者相对难转染的细胞，可适当提高质粒及转染试剂用量，以提高转染效率。首次实验可先进行不同浓度的梯度测试，选择最佳的转染比例。图表里面推荐的用量仅供参考，可根据自身实验情况优化调整用量。



重要提示

产品用途：仅供研究使用，不适用于人或动物的体外诊断与治疗。

由于实验受多种因素影响具有不确定性，本说明书操作说明仅供参考，最终解释权归本公司所有。

警告！产品对人体危害性未知，请遵循操作说明。穿戴适当的防护眼镜、衣服和手套！

