

## GenXion® Transfection Reagent 2000

**保存:** 4-8C 保存一年。(避免冷冻)

**品名:** GenXion® Transfection Reagent 2000

**货号:** GXL2000

**规格:** 1ml

### 产品说明

GenXion® Transfection Reagent 2000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。

### 质粒DNA的转染

对大多数细胞来说,DNA( $\mu\text{g}$ )与GenXion® Transfection Reagent 2000( $\mu\text{l}$ )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: 在准备DNA-GenXion® Transfection Reagent 2000复合物之前,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  $\mu\text{l}$  GenXion®(注意用前先混匀),轻柔混匀制成GenXion® Transfection Reagent 2000稀释液,室温静置5分钟。

c. 将DNA稀释液和GenXion® Transfection Reagent 2000稀释液混合,轻柔混匀,室温静置20分钟,形成DNA-GenXion® Transfection Reagent 2000复合物。DNA-GenXion® Transfection Reagent 2000复合物在室温下可稳定存在6小时。

3. 将DNA-GenXion® Transfection Reagent 2000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37C 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GenXion® Transfection Reagent 2000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GenXion® Transfection Reagent 2000( $\mu\text{l}$ )的比例。

不同细胞培养板中转染时培养基、核酸及GenXion® Transfection Reagent 2000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 x 25 µl	0.2 µg	0.5 µl	5 pmol	0.25 µl
24-well	2 cm <sup>2</sup>	500 uL	2 x 50 µl	0.8 µg	2.0 µl	20 pmol	1.0 µl
12-well	4 cm <sup>2</sup>	1 mL	2 x 100 µl	1.6 µg	4.0 µl	40 pmol	2.0µl
6-well	10 cm <sup>2</sup>	2 mL	2 x 250 µl	4.0 µg	10 µl	100 pmol	5 µl
60-mm	20 cm <sup>2</sup>	5 mL	2 x 0.5 ml	8.0 µg	20 µl	200 pmol	10 µl
10-cm	60 cm <sup>2</sup>	15 mL	2 x 1.5 ml	24 µg	60 µl	600 pmol	30 µl

### 细胞转染注意事项：一定要进行预实验，来摸索最佳条件

- 1) 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）；
- 2) 如果是贴壁细胞，应保证贴壁在 12~24 小时再进行转染，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。
- 3) 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。
- 4) 转染作用 6 小时一定记得要换含血清的培养基。
- 5) 培养基以及洗涤细胞和稀释用的培养基要无血清、无双抗。
- 6) 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管基中添加抗生素。
- 7) 高纯度的DNA或RNA可获得较高的转染效率，用于转染的质粒DNA必须无蛋白质，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。
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) 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。
- 12) 建议设置阳性对照和阴性对照。

### 常见细胞的转染效率（实验条件不同转染效率会有差别）

细胞种类	HEK293	293T	293F	HCT 116	WRL- 68	HepG2	NIH/3T3	THP-1	Hela	MCF-7	CV-1
转染效率	99%	99%	99%	80%	80%	~80%	~80%	>50%	94%	>80%	70%
细胞种类	CHO-S	CHO	COS-7L	Chok1	Hep3B	C2C12	Neuro-2a	HUVE	MDCK	Hep2C	WEHI
转染效率	97%	96%	99%	50%	80%	>80%	>70%	>80%	60%	>80%	>80%
细胞种类	HT-1080	SKBR3	Vero	MEF	BE(2)C	A549	L929	HO1980	Calu1	TS cell	B50
转染效率	81%	50%	85%	50%	77%	>80%	>70%	>60%	>70%	>60%	>70%

GenXion® Transfection Reagent 2000 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	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
293FT	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
293E	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
293F	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
COS7	DMEM	1.5x10 <sup>4</sup>	0.4 µg	0.5µl
hela	DMEM	2x10 <sup>4</sup>	0.3 µg	0.5µl
Caco2	MEM	3.5x10 <sup>4</sup>	0.3 µg	0.75µl
BHK21	MEM	2x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
CHO-DG44	DMEM+HT+pro	2x10 <sup>4</sup>	0.5µg	0.5µl
RAW264.7	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
MCF7	MEM/NEAA+0.01mg/mL insulin + sodium pyruvat	2x10 <sup>4</sup>	0.1 µg	0.25µl
SW480	IMDM	3x10 <sup>4</sup>	0.4 µg	0.5µl
MDCK	DMEM	4x10 <sup>4</sup>	0.6µg	1µl
CHO-K1	IMDM+Pro	3x10 <sup>4</sup>	0.2 µg	0.5µl
HepG2	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.5µg	0.75µl
A549	DMEM	2x10 <sup>4</sup>	0.3 µg	0.5µl
NIH/3T3	DMEM	1.5x10 <sup>4</sup>	0.1 µg	0.75µl
vero	DMEM	3x10 <sup>4</sup>	0.3 µg	0.75µl
sf9	SIM SF	5x10 <sup>4</sup>	0.4 µg	0.75µL