

## 一、产品描述

Poly-Fecter 是我们自主开发的一种针对质粒 DNA 转染的非病毒类转染试剂, 该试剂主要成分为可生物降解的高分子化合物, 特别适合于各种贴壁细胞的转染, 对大多数贴壁细胞具有优秀的转染效率, 也可以转染原代细胞和悬浮细胞。对于某些比较难以转染的细胞系, 如 Jurkat 等, Poly-Fecter 转染效率比传统转染试剂有显著的提高。

Poly-Fecter 与传统的脂质体转染试剂相比具有独特的优势, 主要表现为:

1. 细胞毒性低, 转染前后不需要更换培养基;
2. 对大多数贴壁细胞有较高的转染效率;
3. 操作简单, 转染试剂/DNA 复合物的形成只需 10-15 分钟;
4. 转染复合物可以直接加入到完全细胞培养基中, 血清和抗生素的存在不影响其转染效率;
5. 转染试剂及 DNA 用量少, 经济实惠, 适合大规模质粒转染以及病毒包装。

## 二、转染前重要提示

1、由于本品细胞毒性较低, 所以转染过程中无需换液, 同时转染时细胞密度 (汇合度, confluent) 以 70%-90% 为宜。表一中列举了不同细胞培养装置的推荐细胞数量。为了取得较高的转染效率, 推荐使用在 50 代以内的细胞进行转染实验。转染用的细胞需提前一天 (24 小时内) 传代, 以保证实验时细胞处于指数增长期。在培养基中加入抗生素对转染效果没有影响。

表一. 不同细胞培养装置转染前一天接种的推荐细胞数量

细胞培养装置	接种细胞数量 (个)	每装置面积 (cm <sup>2</sup> /孔或皿)	细胞培养液总体积 (每孔或每皿)
96孔板	$7.5 \times 10^3 - 1.5 \times 10^4$	0.3	0.1ml
24孔板	$5 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	1.9	0.5ml
12孔板	$1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$	3.8	1ml
6孔板/3.5cm培养皿	$2 \times 10^5 - 4 \times 10^5$	9.4	2ml
6cm培养皿	$4 \times 10^5 - 8 \times 10^5$	28	5ml
10cm培养皿	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$	78.5	10ml
14cm培养皿	$2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$	153	20ml

2、如果长时间没有使用过本品, 请在使用前先将本品振荡混合均匀。

3、本品在加入转染复合物后的细胞培养过程中需采用含血清的完全培养基, 培养基中的血清可提高转染效率, 并降低细胞毒性, 抗生素的存在与否不影响细胞的转染效率和毒性。但是在 Poly-Fecter 和 DNA 形成转染复合物的过程中不能添加血清和抗生素。制备转染复合物的过程中推荐使用无血清的 DMEM 或者 Opti-MEM 稀释质粒 DNA 和转染试剂。

4、转染条件优化。由于 DNA 和转染试剂的用量比值是决定转染效率的重要因素, 同时由于各实验室质粒的定量误差, 质粒纯化程度不同以及细胞状态不同, 造成不同细胞和实验室的最优实验条件是有差异的, 为取得最高的转染效率, 初次应用时, 建议先进行条件优化。最优条件确定后, 实验的结果将非常稳定。转染试剂量 (μl): DNA (μg) 量的比值影响转染效果, 对于接种细胞密度在 60%-90% 之间的实验样本, 转染试剂量 (μl): DNA (μg) 量 = 1.6:1 - 3:1 都可以得到较好的转染效率, 我们推荐 转染试剂量 (μl):DNA (μg) 量=2:1 为您优化实验条件的起始比例。表二中列举了常用的不同细胞培养容器质粒 DNA 和转染试剂的用量, 对于比较容易转染的细胞, 可以同时减半质粒 DNA 和转染试剂的用量, 同样能够得到优秀的转染效率。

## 三、操作步骤 (以 12 孔板为例)

1、提前一天将细胞种植在 12 孔板中, 以转染时细胞密度为 60-80% 为宜。

2、取 12 个 EP 管, 根据表二中用量, 每管中加入 1.6μg 质粒 DNA, 用 75μl 不含血清和抗生素的 DMEM 稀释, 充分混合均匀, 制成 DNA 稀释液。

3、另取 12 个 EP 管, 再将 3.2μl Poly-fecter 转染试剂用 75μl 无血清 DMEM 稀释, 充分振荡或者用枪吹打均匀, 制成转染试剂稀释液。

4、将转染试剂稀释液分别加入到对应 DNA 稀释液中 (注意: 顺序很重要, 一定是转染试剂稀释液加入到 DNA 稀释液中), 充分振荡或者用枪吹打均匀, 静置 15 分钟, 使转染试剂与 DNA 形成稳定的转染复合物。

为简化操作, 在注意及时充分混匀的前提下, 前面几步可以合并为一步完成: 将 1.6μg 质粒稀释于 150μl 不含血清和抗生素的 DMEM 中, 充分振荡或吹打均匀, 然后加入 3.2μl 转染试剂后立刻充分振荡或吹打均匀, 室温放置 10-15min, 获得 150μl 转染复合物。

5、将 850μl 完全培养基 (以 12 孔板培养基的标准用量是 1ml 计算, 减去所用无血清 DMEM 体积) 加入到转染复合物中, 用枪轻柔吹打均匀。(注意: 对于本试剂, 采用含血清的完全培养基有助于提高转染效率并降低细胞毒性; 含双抗的培养基对转染效率没有影响)。

6、吸去 12 孔板中原有的培养基, 加入上述含有转染复合物的培养基, 此后无需更换培养基 (注意: 目前为止没有发现细胞毒性, 对于特殊细胞系, 请根据具体情况决定是否需要 4-6 小时后更换培养基)。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱孵育 24 - 48 小时后观察结果。

注意: 如完全培养基用量较大, 操作不便, 可先换培养基后将转染复合物滴加到含培养基和细胞的培养容器中, 前后摇晃培养容器混匀。

### 悬浮细胞转染:

转染复合物的准备与上面步骤 2-4 完全相同。悬浮细胞接种后, 直接加入转染复合物, 轻轻摇动使均匀混合。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱孵育 24 - 48 小时后观察结果。为了提高转染效率也可首先使用低细胞培养体积, 转染 2-3 小时后加入培养基至正常体积。

表二 不同细胞培养容器转染用量

细胞培养装置	DNA 用量	稀释 DNA 的稀释剂体积	Poly-fecter 试剂的体积	稀释 Poly-fecter 的稀释剂体积	细胞培养液总体积 (每孔或每皿)
96 孔板	0.2μg	25μl	0.4μl	25μl	0.1ml
24 孔板	0.8μg	50μl	1.6μl	50μl	0.5ml
12 孔板	1.6μg	75μl	3.2μl	75μl	1ml
6 孔板	4.0μg	150μl	8.0μl	150μl	2ml
6cm 皿	5-8μg	250μl	10-16μl	250μl	5ml
10cm 皿	10-20μg	500μl	20-40μl	500μl	10ml
14cm 皿	20-30μg	1000μl	40-60μl	1000μl	20ml

### 四、常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方案
转染效率低	质粒 DNA 用量不佳	优化转染实验中所用的质粒 DNA 的用量
	DNA 与转染试剂比例不佳	优化转染试剂与质粒 DNA 的比值
	DNA 纯度不够	建议采用 OD260/OD280 大于 1.8, 并确认不含有 RNA、蛋白和内毒素的高质量 DNA
	细胞状态不佳或细胞密度不够	转染前细胞的密度应达到 60-80%, 并保证细胞状态是最佳的
	稀释用溶液含血清或蛋白	建议采用高质量无血清 DMEM 稀释 DNA 和 Poly-fecter
	稀释用溶液体积不合适	建议采用表二推荐的每孔稀释用溶液体积, 也可适当减少稀释液体积, 以增加转染复合物与细胞的接触机会
	转染时培养基不合适	建议采用含血清的全培养基
细胞毒性大	转染时培养基使用不当	由于高分子转染试剂的特殊性, 转染复合物形成以后, 一定使用含血清的全培养基稀释复合物后加入细胞培养皿。
	细胞状态不佳	接种前, 细胞的健康状况直接影响细胞毒性
	质粒和 Poly-fecter 用量不佳	保持 Poly-fecter/DNA 比率的同时减少质粒的用量 预实验优化 Poly-fecter/DNA 比率
	细胞密度太大	建议减少细胞密度
	细胞污染	建议彻底清洁所有细胞培养相关用品
转染结果重复性不好	质粒表达系统毒性大	建议使用其他可靠质粒作为阳性对照, 比较转染效果 减少 Poly-fecter/DNA 复合物与细胞的孵育时间, 可在转染 4 小时后吸去转染复合物, 更换成新鲜的完全培养基
	细胞状态变化 其他	细胞传代次数多, 细胞老化, 或者细胞分裂条件已经变化都能导致转染效果变差。建议重新取一只新的细胞株培养用于转染 在不同的 Poly-fecter/DNA 比例或不同的细胞密度下, 转染效果可能差别较大; 质粒的品质变化, 改变培养基等都可能转染结果重复性不佳

### 五、质量保证

我们对每一批产品进行严格的质量检验, 并用 HeLa 和 293T 细胞进行转染验证, 以确保我们每一批产品的质量。请使用前务必仔细阅读本手册。

### 六、使用限制

本转染试剂仅限于科研用途。

### 七、储存与安全

本品常温运输, 储存于 4℃, 有效期 12 个月。长期储存请置于 -20℃。

本品使用安全, 目前未发现任何生物、化学毒性, 如不慎沾染, 请立即用清水冲洗即可。