



GeneTwin™ 基因转染试剂

产品信息:

组成	包装	使用次数
TG101-01	0.5ml	0.5ml 可进行250次转染（6孔板或35 mm平皿）
TG101-02	1ml×4	1×4ml 可进行2000次转染（6孔板或35 mm平皿）

保存条件:

运输: 常温

储存: 2-8℃保存一年; -20℃保存二年以上。

产品介绍:

GeneTwin™ 转染试剂是一种将目的基因运送到细胞内的试剂。GeneTwin™ 是一种高效、低毒的转染试剂，由可生物降解的聚阳离子与其它成分按特定比例配制而成，适用于多种哺乳动物细胞的转染，尤其适合于贴壁细胞的转染，GeneTwin™ 与传统的脂质体转染剂相比无论在稳定性、转染效果和实验操作上都有明显的优势。GeneTwin™ 对绝大多数贴壁细胞有较高的转染效率，重复性好，操作简单。转染试剂和质粒 DNA 可以在室温条件下 5 分钟内即可形成纳米颗粒。形成的 DNA 纳米复合物可以直接加入完全细胞培养液中，不需要通过更换培养液来去掉转染试剂和 DNA 复合物来降低转染剂的细胞毒性，也不需要使用特定的转染专用培养基如 MEM 等培养基。通过对照实验发现，本制品的转染效果不受培养液中血清和抗生素的影响，可以通过简单地调整转染试剂和质粒 DNA 的比例来获得最佳的转染效率。本试剂已经在 HEK293、HeLa、MCF-7、COS-7、CHO、HepG2、NIH-3T3、L929 和 4T1 等细胞的转染实验中获得理想的结果。

操作方法:

所需其它试剂: 使用者需自己准备 0.15M NaCl（双蒸水配制，高压或过滤灭菌）作为转染剂和 DNA 的稀释剂。

使用方法（以 24 孔细胞板转染实验为例）

1. 转染细胞的准备

贴壁细胞: 转染前一天（24 小时），24 孔板中，每孔接种 $1\sim 2\times 10^5$ 个细胞，1ml 完全培养基，使之转染时能够达到 70-90%汇合度。

注：贴壁细胞也可以在传代后直接按悬浮细胞方法进行转染。也可以在传代后细胞贴壁基本完成时（如 HeLa 细胞传代后通常在 2 小时内就完全贴壁）开始转染。但这些简便方法实施的前提是传代时的细胞状态要非常好，不能用过度培养的细胞。此外，接种细胞的培养液在进行转染时已经 24 小时了，如果已经发黄，最好在转染时更换为新鲜培养基。

悬浮细胞: 离心收集悬浮细胞，用新鲜的培养基重悬细胞并按每孔 $1\sim 2\times 10^5$ 个细胞，1ml 完全培养基接种到 24 孔板中。

2. 转染复合物的准备

对大部分细胞而言，质粒 DNA (μg) 和转染剂 GeneTwin™ (μl) 的比例大致为 1:3-1:5。在两个无菌的离心管里分别加入 50 μl 0.15M 的 NaCl, 其中一个管中加入质粒 DNA, 轻柔混匀, 制成 DNA 稀释液。另一个离心管里加入 GeneTwin™ 轻柔混匀, 制成 GeneTwin™ 稀释液。

注：DNA 和转染试剂的最适用量需要根据不同细胞和不同培养基来优化。对 24 孔板而言，每孔中两者的用量一般不超出 1~2 μg 和 3~5 μl 范围。相同转染效率条件下，尽可能降低转染剂用量。

3. 将 50 μl GeneTwin™ 稀释液滴加到 50 μl DNA 稀释液中，用吸头轻轻吹打混匀。室温放置 5 分钟，从而获得 100 μl 转染复合物。

4. 将制备好的转染复合物直接加入到细胞培养基中，轻摇细胞板以混匀。转染复合物可直接加入含血清的细胞培养基中。

- 将细胞板移至 37°C, 5% CO₂ 孵箱中进行培养, 24-72 小时后可进行下游实验。
- 如果要筛选稳定细胞株, 转染 24 小时后将细胞按照 1:10 或更高的比例稀释, 传代到其它的培养板中, 次日添加合适浓度的药物 (如 G418, Zeocin 等) 进行筛选。

转染过程的优化:

影响转染效率的因素有很多, 细胞本身的特性和状态、转染试剂的用量、转染的 DNA 用量、转染试剂/DNA 复合物比例、形成的复合物的形态大小、细胞数/细胞密度、细胞和转染复合物接触孵育的时间等都可能影响转染效果, 应该在具体实践中优化来确定最佳转染条件。在 24 孔板中优化后, 对于同一细胞株, 以后按照同样条件进行。

如果使用不同的细胞培养板进行转染, 可以依据下表, 对优化好的转染体系进行放大或缩小。

不同细胞培养器皿的表面积比较

培养器皿	96 -well 1	48 -well	24 -well	12 -well	6 -well	35mm	60m m	100m m
面积 (cm ²)	0.3	0.7	2	4	10	10	20	60
与 24well 面积的比值	0.2	0.4	1	2	5	5	10	30

问题与解决方法

问题	评论与建议
转染效率低	- 质粒浓度太低-建议: 使用最适量的质粒。 - 质粒纯度太低-建议: 使用高质量的质粒(OD₂₆₀/OD₂₈₀≥1.8)。 - 细胞生长状态欠佳-建议: 保证细胞密度和形态是最佳的。 - 减半转染时培养液体积 (转染 4 小时后再补充足量培养液)。 - 从起始用量开始, 调整配制转染液中 DNA 和 GeneTwin™ 的用量 (保持转染工作液总体积不变), 以确定不同细胞的最佳转染条件。一般固定 DNA 用量 (如 2μg), 与系列含量的 GeneTwin™ 混合, 选取 GeneTwin™ 的最佳用量; 也可固定 GeneTwin™ 用量 (如 2μl), 与系列含量的 DNA 混合, 选取 DNA 的最佳用量; 还可以固定 GeneTwin™/DNA 比率增加或减少质粒的用量。 - 设立阳性对照, 例如混入转染质粒总量 1/10 量的表达 EGFP 或 beta-半乳糖苷酶基因的质粒
细胞毒性太大	- 接种前, 细胞的生长状况直接影响细胞活性。 - 转染时细胞密度不能过低。 - 增加转染时培养液体积, 或保持 GeneTwin™/DNA 比率的同时减少 GeneTwin™ 的用量。 - 对某些敏感的细胞株, 转染 4 小时后去除含转染复合物的培养液, 更换为新鲜的完全培养液。 - 确定基因产物是否有毒性。

BM190311