



Sunma

## 梭华-Sofast<sup>®</sup> 转染操作规程(in vitro, DNA)

### 1. 介绍

梭华-Sofast<sup>®</sup>是新一代的阳离子聚合物基因转染试剂，梭华-Sofast<sup>®</sup>具有高效率转染所必备特征，梭华-Sofast<sup>®</sup>能与带阴离子的反义寡核苷酸形成稳定的复合物，形成的复合物通过内吞等作用进入细胞内，并释放出反义寡核苷酸，后者选择性抑制或调节基因表达。梭华-Sofast<sup>®</sup>的细胞毒性很低，而且与其它转染试剂相比，梭华-Sofast<sup>®</sup>很稳定，不被血清清除，使得基因转染的操作简便易行，重复性好。

### 2. 储存

5.0mg/ml。梭华-Sofast<sup>®</sup>在室温下运输，试剂到达时请即存放于+4℃处，在+4℃可存放一年。使用前请轻轻摇匀。

### 3. 转染操作规程(贴壁细胞的转染)

#### 3.1 细胞接种

为了获得最好的转染效率，细胞密度应该 50-80%，这因细胞株的不同而变化，对最常用的细胞株建议细胞密度 60-70%。对于 24 孔板，最理想条件是在转染前 18-24 小时，每孔接种  $8 \times 10^4$  -  $2.0 \times 10^5$  个细胞。然而，在多数情况下，如果在细胞贴壁后(接种几小时后)即进行转染，也可以得到相近的结果。对细胞毒性不敏感的细胞株可在细胞接种后立即进行转染。表 1 列举了不同细胞培养装置的推荐细胞数量。

表 1. 不同细胞培养装置的推荐细胞数量

细胞培养装置	每装置面积 (mm <sup>2</sup> /孔或皿)	细胞数量	细胞培养液总体积 μl/孔或皿
96 孔板	50	$1.5-5.0 \times 10^4$	100μl
48 孔板	100	$3.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5$	200μl
24 孔板	200	$8.0 \times 10^4 - 2.0 \times 10^5$	500μl
12 孔板	401	$1.6-4.0 \times 10^5$	1.0 ml
6 孔板	962	$3.0-8.0 \times 10^5$	2.0 ml
35mm 培养皿	962	$3.0-8.0 \times 10^5$	2.0 ml
60mm 培养皿	2827	$1.0-2.5 \times 10^6$	6.0 ml
100mm 培养皿	7854	$2.5-6.4 \times 10^6$	10.0 ml

#### 3.2 梭华-Sofast<sup>®</sup> /DNA 复合物的制备(以 24 孔板转染为例)

3.2.1 0.6μg DNA 质粒稀释于 30μl 不含血清和抗菌素的 DMEM 中，轻轻混匀。

注: opti MEM (Invitrogen)、PBS 缓冲液或 150mM NaCl 也能用于稀释 DNA 和转染试剂。

3.2.2 1-2µl 梭华-Sofast®稀释于 30µl DMEM 中，轻轻混匀。

3.2.3 30µl 梭华-Sofast® 稀释液滴加到 DNA 稀释液中，一边滴加一边混匀。

**注意：两种溶液的混合顺序对转染结果非常重要，切勿颠倒滴加顺序。**

3.3 室温孵育 15-20 分钟。

3.4 60µl 梭华-Sofast®/DNA 复合物加到每孔中并轻轻摇动使均匀混合。

3.5 放置 37°C CO<sub>2</sub> 孵育箱孵育 24-48 小时后，分析报告基因转染效率。

#### \*悬浮细胞转染

在细胞种植 1 小时后，以同样方法加入梭华-Sofast®/DNA 复合物，轻轻摇动使均匀混合，继续 24-48 小时后，分析报告基因转染效率。

#### 4. 影响转染效率的因素

4.1 根据细胞培养装置面积的大小，选择转染试剂梭华-Sofast® 和 DNA 的使用量。表 2 说明不同细胞培养装置的梭华-Sofast®和 DNA 的推荐用量。

**表 2. 不同细胞培养装置的梭华-Sofast®和 DNA 的推荐用量**

细胞培养装置	DNA 溶液		梭华-Sofast®溶液		DNA/ Sofast® 最后体积(µl)
	DNA (µg)	DNA 溶液 终体积 (µl)	梭华-Sofast® (µl)	梭华-Sofast®溶 液终体积 (µl)	
96 孔板	0.15	7.5	0.2-0.5	7.5	15
48 孔板	0.3	15	0.5-0.9	15	30
24 孔板	0.6	30	1-1.8	30	60
12 孔板	1	50	1-3	50	100

4.2 梭华-Sofast®在转染中不受血清影响，所以梭华-Sofast®/DNA 复合物能直接加到含血清的培养基中，但稀释梭华-Sofast®和 DNA 的缓冲液不能混有血清，因为梭华-Sofast®在制备梭华-Sofast®/DNA 复合物之前可能会与血清中的蛋白质反应，影响转染效率。

4.3 如果细胞株很敏感，孵育 2-4 小时后除去转染复合物并加入含血清的新鲜培养基。

#### 4.4 稳定的转染

对于稳定转染，建议使用 6 孔板或 35mm 培养，依据上述方法进行基因转染实验，转染 24-48 小时后根据实验设计筛选细胞。

#### 4. 问题与解决方法

问题	评论与建议
转染效率低	1. 质粒浓度太低—建议使用最适宜的质粒数量。 2. 质粒纯度太低—建议使用高质量的质粒 (OD <sub>260/280</sub> >1.8)。 3. 细胞生长状态欠佳—建议保证细胞密度和形态是最佳的。 4. 梭华-Sofast®/DNA 比率未优化—优化梭华-Sofast®/DNA 比率(重

	量比从 16:1 到 4:1)。 5. 设立阳性对照，例如 GFP Gene 和 luciferase Gene—以便检查转染结果。
细胞毒性太大	1.接种前，细胞的健康状况直接影响细胞毒性。 2. 基因转染时细胞密度不合适会引起细胞毒性。 3. 保持梭华-Sofast <sup>®</sup> /DNA 比率的同时减少质粒的数量。 4. 对某些敏感的细胞株减少梭华-Sofast <sup>®</sup> /DNA 复合物的培养时间。 5. 确定基因产物是否有毒性。 6. 确认质粒没有内毒素。

## 5. 质量保证

太阳马生物工程有限公司对梭华- Sofast<sup>®</sup>基因转染试剂的每批产品实行严格质量检验，并进行转染验证，以确保其产品质量，提供技术支持。如该试剂存在质量问题，而非操作不当造成，本公司将免费提供更换或退回货款。请用户使用前务必认真阅读本手册。