



Sunma

梭华-Sofast[®]基因转染试剂手册

- l 适应于众多原代培养细胞和转化细胞株的基因转染
- l 适用于瞬时转染和稳定转染
- l 适应于贴壁细胞和悬浮细胞转染

- u 转染效率高且稳定,在有无血清存在的细胞培养基中均能获得高效率转染
 - l 细胞毒性低
 - n 转染程序简单, 转染实验可以在半小时内完成

梭华-Sofast[®]基因转染试剂

Catalog No. 11103	0.3 ml (35mm 培养皿转染 50-100 次)
Catalog No. 11105	0.5 ml (35mm 培养皿转染 80-165 次)
Catalog No. 11110	1.0 ml (35mm 培养皿转染 165-330 次)
Catalog No. 11120	2×1.0 ml (35mm 培养皿转染 330-660 次)
Catalog No. 11140	4×1.0 ml (35mm 培养皿转染 660-1320 次)

5.0mg/ml 溶液, 请 4℃保存, 切勿冻存。

1. 介绍

基因转染的定义是“将具生物功能的核酸转移或运送到细胞内并使核酸在细胞内维持其生物功能”。其中,核酸包括 DNA (质粒和线性双链 DNA), 反义寡核苷酸及 RNAi (RNA interference)。基因转染技术已广泛应用于基因组功能研究 (基因表达调控, 基因功能, 信号转导和药物筛选研究) 和基因治疗研究。

基因转染需要一定的转染试剂将带有目的基因的载体运送到细胞内。早期的磷酸钙转染法转染效率很低, 且对很多细胞株无效, 因此不能满足很多科研工作的需要。目前, 最常用的转染试剂是阳离子脂质体和阳离子聚合物, 它们在克服细胞屏障方面跟病毒有很相象的特征, 容易透过细胞膜。其中, 阳离子脂质体在体外基因转染中有很高的效率, 然而在体内, 它迅速被血清清除, 在肺组织内累积, 诱发强烈的抗炎反应, 这将导致高水平的毒性, 因此, 在很大程度上限制了其应用。由于阳离子脂质体的局限性, 阳离子聚合物转染试剂日益受到重视。

梭华-Sofast[®]是新一代的阳离子聚合物基因转染试剂, 梭华-Sofast[®]具有高效率转染所必备特征, 如浓缩 DNA, 将 DNA 运送到细胞内, 并使其在细胞核内释放等; 梭华-Sofast[®]的细胞毒性很低, 这是它的另一个重要特点; 而且与其它转染试剂相比, 梭华-Sofast[®]很稳定, 不被血清清除。以上优点使得基因转染的操作简便易行, 重复性好。梭华-Sofast[®]已被成功应用于很多原代培养细胞和转化细

胞株的基因转染。

● 转染效率高

对梭华-Sofast[®]与一些常用商品化转染试剂的转染效率和细胞毒性进行对比研究，实验表明梭华-Sofast[®]具有很高的和稳定的转染率，是一种很好的基因转染试剂。对某些常用的细胞株梭华-Sofast[®]转染率高于某常用阳离子脂质体，对多数细胞株这两种试剂的转染效率相近；需特别指出梭华-Sofast[®]在原代培养细胞 HUV-EC 中有较高的转染效率，而大多数阳离子脂质体对此细胞的转染效率很低。

● 细胞毒性低

在适宜的条件下，根据推荐用量使用梭华-Sofast[®]进行转染实验，细胞存活率高于 90%。

● 转染程序简单，转染实验可以在半小时内完成，节约实验时间。

梭华-Sofast[®]不被血清清除，转染时梭华-Sofast[®]/DNA 复合物直接加到细胞培养基中，接下来只是等待转染分析，而无需在这前后更换培养基和清洗细胞，这就大大地简化了转染程序，可以节约很多宝贵的实验时间，并使转染实验便于安排和调整（图 1）。而且，用简化的转染程序，转染试剂的细胞毒性很低。

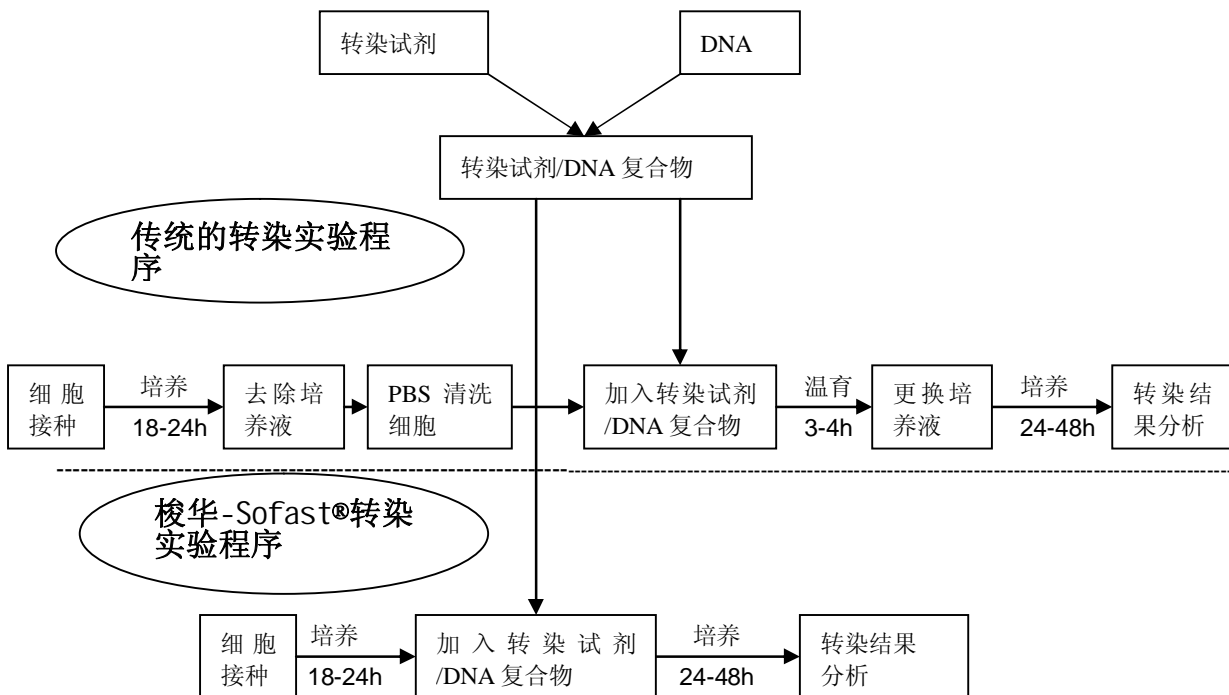


图 1. 梭华-Sofast[®]转染与传统转染实验程序比较

2. 适应范围

梭华-Sofast[®]适用于原代培养细胞和转化细胞株，表 1 列举了已用梭华-Sofast[®] 成功转染的部分细胞株。

表1. 梭华-Sofast[®] 成功转染的部分细胞株

细胞株	来源	细胞类型
-----	----	------

HEK 293	Human	胚胎肾细胞 (Embryonic kidney)
HeLa	Human	子宫颈癌细胞 (Cervix carcinoma)
NIH 3T3	Mouse	胚胎纤维原细胞 (Embryo fibroblast)
BNL CL2	Mouse	胚胎肾细胞 (Embryonic kidney cells)
HepG2	Human	肝癌细胞 (Hepatocarcinoma)
COS7	Monkey	猿猴病毒40肝脏转化细胞 (SV40 liver transformed)
CHO	Chinese hamster	中国仓鼠卵巢细胞 (Ovary)
SHSY-5Y	Human	成神经细胞瘤细胞 (Neuroblastoma)
IMR 32	Human	成神经细胞瘤细胞 (Neuroblastoma)
MRC5	Human	胎儿肺上皮细胞 (Fetal lung epithelium)
MCF7	Human	乳腺癌细胞 (Breast adenocarcinoma)
K562	Human	慢性白血病细胞 (Chronic leukemia)
SKOV-3	Human	卵巢腺癌细胞 (Ovarian adenocarcinoma)
IGROV-1	Human	卵巢腺癌细胞 (Ovarian adenocarcinoma)
HUV-EC(primary cell)	Human	脐带静脉内皮状细胞 (Umbilical vein endothelial cell)
C6	Rat	脑胶质瘤细胞(Glioma C6 cell)

3. 储存

梭华-Sofast[®] (5.0mg/ml) 在室温下运输, 试剂到时请即存放于+4℃, 在+4℃可存放一年以上。使用前请轻轻摇匀。

如果试剂中出现少量沉淀, 50℃水浴 1-3 分钟溶解使用即可。

4. 转染操作规程(贴壁细胞的转染*)

4.1 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 8×10^4 - 2.0×10^5 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 2 列举了不同细胞培养装置的推荐细胞数量。

表 2. 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 ² /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	3.0-8.0×10 ⁵	2.0 ml
60mm 培养皿	2827	1.0-2.5×10 ⁶	6.0 ml
100mm 培养皿	7854	2.5-6.4×10 ⁶	10.0 ml

4.2 梭华-Sofast[®]/DNA 复合物的制备(以 24 孔板转染为例)

4.2.1 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。

4.2.2 1-2μl 梭华-Sofast[®] 稀释于 30μl DMEM 中，轻轻混匀。

4.2.3 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。

4.3 室温孵育 15-20 分钟。

4.4 60μl 梭华-Sofast[®]/DNA 复合物加到每孔中并轻轻摇动使均匀混合。

4.5 放置 37°C CO₂ 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。

5. 影响转染效率的因素

5.1 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 3 说明不同细胞培养装置的梭华-Sofast[®]和 DNA 的推荐用量。

表 3. 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/梭华-Sofast [®] 最后体积 (μl)
	DNA (μg)	DNA 溶液终体积 (μl)	梭华-Sofast [®] (μl)	梭华-Sofast [®] 溶液的终体积 (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
6 孔板	2	100	3-6	100	200
35mm 培养皿	2	100	3-6	100	200
60mm 培养皿	6	300	9-18	300	600
100m 培养皿	16	800	24-48	800	1600

5.2 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。

5.3 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。

5.4 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。

6. 问题与解决方法

问题	评论与建议
转染效率低	<ol style="list-style-type: none"> 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 (OD260/280>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	<ol style="list-style-type: none"> 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[®]/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[®]/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。

7. 质量保证

太阳马生物工程有限公司对梭华-Sofast[®]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。