

## KTM 基因转染试剂说明书

### KM605 500 微升 (250 次)

#### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂名称	储存温度	KM605
基因转染试剂	4°C保存一年, -20°C保存二年以上	500ul

#### 产品介绍:

KTM 转染试剂由一种生物降解的阳离子和其他成分组成。细胞毒性低, 不需要更换培养液去掉转染试剂降低细胞毒性。转染试剂操作步骤简单, 质粒 DNA 可以在室温条件下 5 分钟内即可形成纳米颗粒, 不需要使用特定的转染试剂专用培养基。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。

#### 注意事项:

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孔板转染细胞为例)

##### 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  $1\sim 2\times 10^5$  个细胞和 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 ( $\mu\text{g}$ ) 和转染试剂( $\mu\text{l}$ ) 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 $\mu\text{l}$  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基因转染试剂轻柔混匀, 制成转染试剂稀释液。

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  $\mu\text{g}$  和 3~5  $\mu\text{l}$  范围。相同转染效率条件下, 尽可能降低转染剂用量。

3. 将 50 $\mu\text{l}$  转染试剂稀释液滴加到 50 $\mu\text{l}$  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 $\mu\text{l}$  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。

5. 将细胞板移至 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养, 24-72 小时后可进行下游操作。

6. 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 (供参考)**

培养器皿	96 -well	48 -well	24 -well	12 -well	6 -well	35mm	60mm	100mm
面积 (cm <sup>2</sup> )	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

1.