

YALEPIC[®] 特殊细胞专用 DNA 转染试剂-LFDS

YALEPIC[®] Special DNA Transfection Reagent-LFDS

产品货号

产品货号	YJ52005-01	YJ52005-02
规格	1 ml	5 x 1 ml

产品保存及运输条件

常温运输, 2~8°C 保存, 不可冷冻。

产品概述

YALEPIC[®] Special DNA Transfection Reagent-LFDS 是一款高性能的 DNA 转染试剂, 适用于难转染细胞的质粒 DNA 高效传送, 具有极强的 DNA 转染能力。本产品兼具与 DNA 的高效复合及转染后快速释放的能力, 确保优异的转染性能和极低的细胞毒性, 转染复合物形成后, 可直接加入完全培养基, 不受血清和抗生素影响, 转染前后无需更换培养基。具有不受血清影响、毒性低、稳定性好、操作便捷、重复性高等优点。

适用范围

1. 适用于多种贴壁细胞系, 特别适用于各种难转细胞如 BMDC、4T1、CT26、DC2.4 等难转染细胞, 均可得到较高的转染效率, 且重复性好。

自备试剂及仪器

1. 质粒 DNA 提取: 推荐无内毒素质粒大提试剂盒 (YALEPIC[®] Endotoxin Free Plasmid Max Isolation Kit, YALI#YC47013) ;
2. 细胞接种: 细胞培养基, FBS, 胰酶, 血球计数板, 细胞培养板等;
3. 转染复合物的形成: Opti-MEM 或其它无血清、无双抗细胞培养基, EP 管等;
4. 其他: PBS, 移液器, 移液管, 15 ml 离心管, 细胞培养板, 细胞培养瓶, CO₂ 细胞培养箱等。

实验准备及注意事项

1. 操作环境及操作过程中使用的试剂、耗材均需无菌，以免影响正常的转染效果。
2. 确保使用高质量、无内毒素、无菌、高纯度的质粒 DNA。质粒 DNA 的纯度符合实验要求 (注：建议 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.6 ~ 1.8 之间)。
3. 每次使用之前务必颠倒混匀试剂，观察试剂为澄清即可用。
4. 可通过改变细胞密度、基因浓度以及转染试剂用量对转染进行优化。
5. 转染时尽量选用同样的接种比例，以提高实验重复性。(注：不同细胞系的细胞密度不同，细胞密度会直接决定转染效率，建议在细胞融合度达到 60 ~ 70% 时进行转染)
6. 需根据具体细胞系选择最适培养条件。(多数哺乳动物细胞应在 37°C、5% CO_2 条件下培养。其他的一些细胞系，例如昆虫细胞，需要在不同的温度和 CO_2 浓度下进行培养)
7. 应避免转染复合物形成的反应体系中存在血清。
8. 转染实验全程缓慢轻柔操作，尤其在试剂稀释及混合的操作时，使用移液器轻轻吹打 10 ~ 20 次，确保充分混匀。

实验流程

1. 质粒 DNA 转染

以 24 孔板为例，步骤如下：



细胞接种: 转染前 24 h 左右对细胞进行接种, 接种密度约为 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/well, 过夜培养 (12 ~ 24 h)

质粒稀释: 1) 在 1.5 ml 无菌离心管中加入 10 μ l Opti-MEM, 并添加适量的 DNA (表 1), 用移液器轻轻混匀。2) 在 1.5 ml 无菌离心管中加 10 μ l Opti-MEM 无血清培养基, 并添加适量的 LFDS (表 1), 用移液器轻轻混匀, 静置 5 min。

复合物制备: 将 LFDS-Opti-MEM 滴加至 DNA-Opti-MEM 中, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 10 ~ 20 min 后可用于转染。注: 形成的转染复合物溶液尽量在 30 min 内使用。

细胞转染: 1) 将转染复合物混合液滴加至培养基中, 轻轻晃动培养皿, 均匀分散。一般情况下无需更换培养基。注: 如有特殊需要, 可在转染开始之前更换新鲜的完全培养基, 避免转染后培养细胞密度过大、营养不足导致细胞死亡。2) 37°C 过夜培养 18 ~ 48 h。一般情况下无需更换培养基。如转染后需要更换新鲜培养基, 请在培养 6 ~ 12 h 后更换。3) 收取细胞进行后续实验。

2. 质粒 DNA 转染优化

为达到高转染效率和低细胞毒性的最佳效果, 可通过改变细胞密度、DNA 浓度以及转染试剂浓度对转染进行优化, 保证细胞融合度在 60 ~ 70% 以上。转染 1 μ g DNA 所使用的 LFDS 的剂量可以在 1 ~ 5 μ l (1 μ l DNA : 1 ~ 5 μ l LFDS) 之间进行调整以获得最佳的转染效率。

细胞培养板	单孔面积	培养基用量		DNA 转染	
		接种培养基用量	Opti-MEM 稀释培养基用量	DNA	Transfection Reagent-LFDS
96-well	0.3 cm ²	200 μ l	2 x 5 μ l	0.2 μ g	0.4 μ l (0.2 ~ 0.5 μ l)
24-well	2.0 cm ²	500 μ l	2 x 10 μ l	0.5 μ g	1.0 μ l (0.8 ~ 2.0 μ l)
12-well	4.0 cm ²	1 ml	2 x 20 μ l	1.0 μ g	2.0 μ l (1.6 ~ 4.0 μ l)
6-well	10 cm ²	2 ml	2 x 50 μ l	2.0 μ g	4.0 μ l (4.0 ~ 10 μ l)
60 mm	20 cm ²	5 ml	2 x 100 μ l	4.0 μ g	8.0 μ l (8.0 ~ 20 μ l)
10 cm	60 cm ²	10 ml	2 x 300 μ l	12.0 μ g	24 μ l (24 ~ 60 μ l)
T75	75 cm ²	13 ml	2 x 500 μ l	15.0 μ g	30 μ l (30 ~ 75 μ l)

表 1: 质粒 DNA 转染优化推荐表

常见问题与解决方案

1. LFDS 与 DNA 的比例不合适。

优化最佳比例：在 1 μ l DNA : 1 ~ 5 μ l LFDS 范围内尝试，优化 DNA 的使用量。

2. LFDS 与 DNA 未经无血清培养基稀释直接混合。

需分别在无血清培养基条件下按一定比例稀释后再进行混合孵育。

3. 转染时细胞密度不合适。

细胞密度过低导致细胞生长缓慢，对外来刺激变得较为敏感，使得转染毒性增高。细胞密度过高，会导致细胞发生接触抑制，加快细胞凋亡。细胞融合度达到 60 ~ 70% 时，转染可以取得较高的转染效率。可预实验优化细胞转染密度。

4. DNA 质量偏低（降解或内毒素）。

应使用高纯度、无菌、无内毒素的质粒 DNA。

5. 转染体系中存在抑制因素。

当转染体系中存在多聚阴离子聚合物时（例如：硫酸葡聚糖、肝素等），转染将无法正常进行，因此应避免上述物质存在于细胞转染体系中。

6. 细胞状态差。

应尽量使用适度传代接种的细胞系，并尽量在平行实验时保持细胞传代次数的一致性，同时需避免细胞培养时间过长。