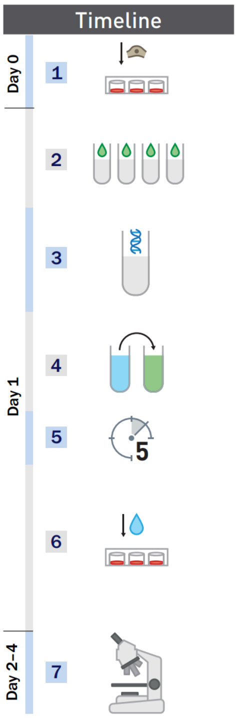
转染试剂的使用

Lipofectamine 是目前使用最广泛的转染试剂, 主要有 Lipo 2000 和 Lipo 3000 两款产品。

- 其中 **Lipo 2000** 适用于大多数细胞的转染, 如实验室培养的 HeLa、U-2 OS 细胞;
- 而 **Lipo 3000** 具有更高的效率, 通常针对更难转染的细胞, 如实验室培养的 RPE1-hTERT、果蝇 D.mel-2 细胞系



Timeline		Steps	Component	96-well	24-well	6-well
Day 0	1	Seed cells to be 70–90% confluent at transfection	Adherent cells	1–4 × 10^4	0.5–2 × 10^5	0.25–1 × 10^6
Day 1	2	Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4
			Lipofectamine® 2000 Reagent	1, 1.5, 2, 2.5 µL	2, 3, 4, 5 µL	6, 9, 12, 15 µL
	3	Dilute DNA in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL
			DNA (0.5–5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg
	4	Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL
			Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
	5	Incubate	Incubate for 5 minutes at room temperature.			
	6	Add DNA-lipid complex to cells	Component	96-well	24-well	6-well
			DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
			Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng
			Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL
Day 2–4	7	Visualize/analyze transfected cells	Incubate cells for 1–3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.			

Lipo 2000 转染体系(HeLa, U-2 OS 细胞)

1. 转染前一天, 六孔板铺细胞1.5 × 10^5个细胞, 确保细胞状态和活性, 消化后吹打将细胞团分散
2. 转染前 15 分钟, 37°C 水浴锅预热培养基
3. 准备需要转染的质粒(QIAGENE, 无内毒素), 测量质粒浓度
4. 搭建转染体系 (约 Lipo 2000 说明书用量的 1/5)
   - 稀释转染试剂: 50 µL Opti-MEM + 1 µL Lipofectamine 2000 (多个样品可同时稀释为 1 管)
   - 稀释质粒 DNA: 50 µL Opti-MEM + 500 ng DNA

   搭建体系前提前准备 1.5mL 管, 并做好标记; 每向 Opti-MEM 中加入样品后, 涡旋 3-5 秒混匀; 将转染试剂加入到 Opti-MEM 中时, 枪头尖打旋儿向外
5. 将稀释的转染试剂加入到稀释的 DNA 中(每个样品 50 µL), 涡旋 3-5 秒, 室温静置 5 分钟
6. 静置期间给细胞换新培养基, 静置完成后逐滴加入细胞中, **轻柔摇匀**
7. 细胞继续培养 1-2 天后可进行检测

JWangL5

Lipo 3000 转染体系(RPE1-hTERT 细胞)

1. 前一天铺 RPE1 细胞, 六孔板每孔铺1.5×10^5（0.5M-1M）
2. 转染前 1 小时换液, 预热培养基和 Opti-MEM
3. 稀释 Lipofectamine 3000 Reagent, 配制好涡旋振荡 3s

   125 µL opti-MEM + 3.75 µL Lipofectamine 3000 Reagent
4. 稀释质粒

   125 µL opti-MEM + 2.5 µg DNA +5 µL P3000 Reagent
5. 将稀释好的 DNA 加入到稀释好的 Lipofectamine 3000 Reagent 中, 室温静置孵育 15min
6. 将混合液逐滴加入到细胞中, 轻轻晃匀
7. 37°C培养 3-4 天后用检测

X-treme 转染体系(果蝇 D.mel-2 细胞)

1. 水提前拿出解冻、X-treme 提前 5min 拿出恢复到室温, 所需质粒混匀并短离, 转染体系提前算好写在纸条上 (每个孔转 2ug 质粒+6ul Xtreme, 体积共 100ul)

   六孔板体系: 0.5µg DNA+1.5µL X-tremeGENE 转染试剂+100µL Opti-MEMI
2. 将 X-treme 高速涡旋震荡, 将水、质粒按顺序排好, X-treme 放到架子上, 用镊子夹取所需的 1.5ml 管, 提前写好标记
3. 先加质粒, 加到管底部侧壁, 加第二种时直接加到第一滴上, 再加水, 沿管侧壁混匀, 最后加 X-treme, X-treme 乙醇溶解易挥发, 用之前打开, 用完拧紧, 加多个样品中间可先虚盖着, 动作要迅速: 加 X-treme 时伸到液体下面, 转圈加, 从上到下, 从下到上, 边转圈边匀速打出, 确保 X-treme 能均匀包裹 DNA, 加时不要碰到管壁, 每加完一个涡旋 5s。加完第一个时定 14min Timer, 再加下一个, 把握好时间, 确保每个时间间隔相同, 全部样品完成后将 X-treme 盖盖紧, 封口膜封住, 放回冰箱, 确保 X-treme 在外时间越短越好。
4. Timer 响, 将细胞拿出来, 在盖子上做好标记, Timer 响后 1min 再开始转染
5. 逐滴加入, 加到不同位置, 滴一滴, 晃一圈, 再加下一个, 间隔时间也把握好, 和加 X-treme 间隔相同。
6. 全部加完后, 顺、逆时针各晃 10 下, 竖直、水平各晃 10 下, 放回培养箱, 放回架子上再轻轻晃几下。
7. 25°C培养 36-48h 后收细胞, 在第二天, 显微镜下查看细胞生长情况, 防止在下一步实验之前细胞出现问题。

PEI 转染体系(293T 细胞)

参见包病毒的 Protocol

修订日期 2024-04-23

JWangL5