

HighGene转染试剂使用说明书



TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

产品名称	产品货号	产品规格
HighGene 转染试剂	RM09014	1mL
使用说明书	-	1份

1. HighGene简介

HighGene转染试剂是一种新型高效的阳离子聚合物。它可以与核酸(包括质粒、siRNA、寡聚核苷酸)相互作用形成一种复合物将核酸转运到真核细胞内,适用于大部分真核细胞的细胞转染。

2. HighGene优势

(1) 转染效率较高。

ABclonal选取常见细胞系,如293T、HCT116、C6分别使用HighGene转染试剂和市面常规转染试剂产品进行细胞转染,实验结果如图1所示。

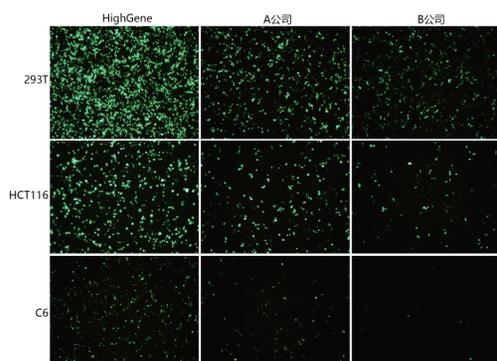


图1: 在6孔细胞板中分别接种293T、HCT116、C6三种细胞,细胞密度为80%左右,分别使用HighGene转染试剂和两种市面同类产品进行细胞转染,GFP真核表达质粒用量均为2 μ g,细胞转染48小时后,在荧光显微镜下观察并拍照。

(2) 批次稳定,实验重复性好。

ABclonal选取293T和HeLa细胞系,使用HighGene转染试剂进行细胞转染,实验结果如图2所示。

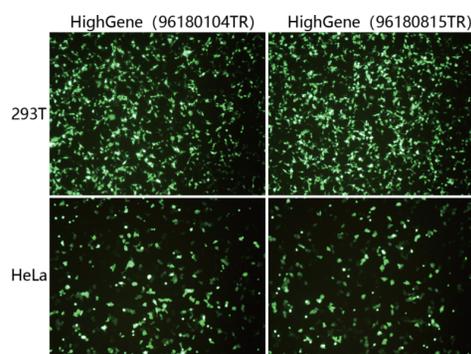


图2: 在6孔细胞板中分别接种293T和HeLa细胞,细胞密度为70%左右,细胞转染时,GFP真核表达质粒用量为2 μ g,两种不同批次的HighGene转染试剂用量均为4 μ L,细胞转染24h后,在荧光显微镜下观察并拍照。

(3) 对于贴壁细胞和悬浮细胞均适用。

HighGene转染试剂不仅适用于贴壁细胞,而且对悬浮细胞也有较好的转染效果。ABclonal选取HEK293F和Sf9悬浮细胞系进行了测试,实验结果如图3所示。

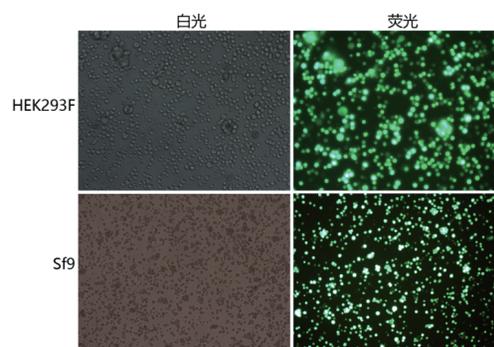


图3: 在125mL摇瓶中接种30mL密度为1 x10⁶个/mL HEK293F或Sf9悬浮细胞,细胞转染时,GFP真核表达质粒用量为30 μ g,HighGene转染试剂用量为60 μ L,细胞转染48小时后,在荧光显微镜下观察并拍照。

(4) 无明显细胞毒性。

ABclonal选取293T、HeLa和HCT116细胞系进行细胞转染,不更换细胞培养液,连续培养1~2天,测试细胞活性,实验结果如图4所示。

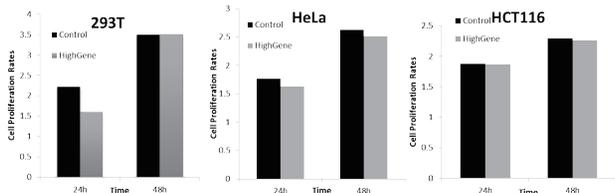


图4: 在96孔板中接种HEK293T、HeLa、HCT116细胞,每孔接种5000个细胞,细胞密度为50%左右,5个复孔,使用2 μ L/mL剂量HighGene转染试剂分别处理细胞24h和48h,然后使用CCK8试剂检测细胞的活性。

(5) 适用于siRNA细胞转染。

ABclonal选取293T和HeLa细胞系进行siRNA转染测试,分别转染了Cy3荧光标记siRNA和YAP1 siRNA,实验结果如图5所示。

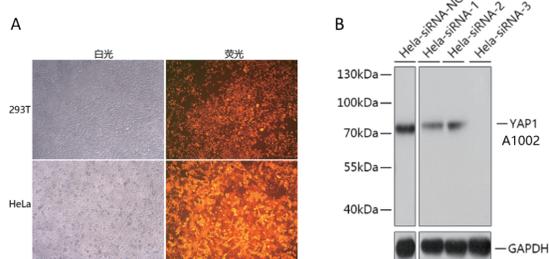


图5: 在6孔细胞板中接种293T和HeLa细胞,细胞密度为80%左右,细胞转染时,Cy3 siRNA用量为100pmol,HighGene转染试剂用量为5 μ L,或YAP1 siRNA用量为200pmol,HighGene转染试剂用量为10 μ L,细胞转染24小时后,在荧光显微镜下观察并拍照(A),或制备细胞样本进行WB实验(B)。(备注:WB实验选用的YAP1抗体是来自ABclonal品牌,货号为:A1002。)

(6) HighGene转染试剂适用于质粒共转染。

ABclonal选取293T细胞系进行质粒共转染测试,同时转染绿色荧光蛋白质粒和红色荧光蛋白质粒,实验结果如图6所示。

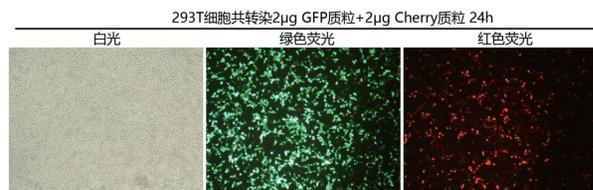


图6: 在6孔细胞板中接种293T细胞,细胞密度为80%,细胞转染时,GFP真核表达质粒用量为2 μ g,Cherry真核表达质粒用量为2 μ g,HighGene转染试剂用量为8 μ L,细胞转染24h后,在荧光显微镜下观察并拍照。

(7) HighGene转染试剂适用于慢病毒包装及感染实验。

ABclonal选取293T细胞系进行慢病毒包装,然后用慢病毒液感染A549细胞系,实验结果如图7所示。

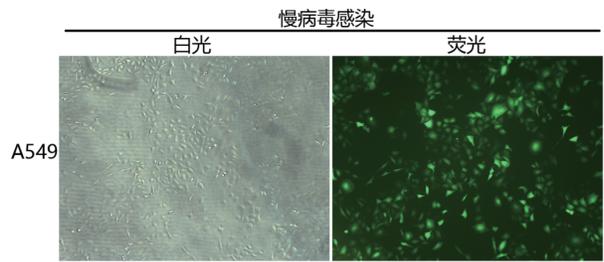


图7: 在10cm培养皿中接种293T细胞,细胞密度为80%,细胞转染慢病毒包装质粒及外源GFP表达质粒,48小时后收获病毒液,取200 μ L慢病毒液感染6孔板中的A549细胞,48小时后,在荧光显微镜下观察并拍照。

3. 储存条件

2-8 $^{\circ}$ C储存,保质期两年。

4. HighGene使用说明

4.1 贴壁细胞转染(以293T细胞为例)

- 第一天,将293T细胞接种到6孔板中,细胞密度控制在70%-90%为宜;
(注:根据实验需求,可以选择不同的细胞培养装置,细胞接种数量和所需培养液体积详见附表1)
- 第二天,先取4 μ g质粒加入到盛有200 μ L无血清DMEM基础培养基离心管中,吹打混合均匀,然后加入8 μ L HighGene转染试剂,吹打混合;
(注:MEM、1640、F12等基础培养基均可用于HighGene转染试剂的溶剂,不同的细胞培养装置所需质粒的量和HighGene转染试剂剂量详见附表2)
- 将200 μ L质粒/HighGene转染试剂复合物均匀滴加到6孔细胞培养板孔中,轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布;
(注:6孔板中为完全培养基,轻轻晃动细胞培养板即可,切勿剧烈摇动细胞培养板,以免细胞脱落漂浮!)
- 细胞转染4-6小时后,半量更换新鲜完全培养基;
(注:半量换液时,吸弃一半原有完全培养基,补加一半新鲜完全培养基)
- 细胞转染24~48小时后,即可使用适当方式进行检测,如RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等,或加入相应筛选药物(G418或Puromycin)可获得稳定细胞株。

4.2 悬浮细胞转染 (以HEK293F细胞为例)

- (1) 第一天,在125mL摇瓶中接种30mL密度为 1×10^6 个/mL HEK293F悬浮细胞;
- (2) 第二天,先取30 μ g质粒加入到盛有3 mL无血清DMEM基础培养基离心管中,吹打混合均匀,然后加入60 μ L HighGene转染试剂,吹打混合均匀;
- (3) 将3mL质粒/HighGene转染试剂复合物均匀滴加到盛有30mL HEK293F悬浮细胞的125mL摇瓶中,轻轻摇动摇瓶使其混合均匀;
- (4) 细胞转染3~5天后,根据蛋白表达的情况(胞内表达或分泌表达),收集细胞或细胞培养上清,进行后续蛋白纯化操作。

4.3 siRNA细胞转染 (以HeLa细胞为例)

- (1) 第一天,将HeLa细胞接种到6孔板中,细胞密度控制在70-90%为宜;
- (2) 第二天,先取100pmol siRNA加入到盛有200 μ L无血清DMEM基础培养基离心管中,吹打混合均匀,然后加入5 μ L HighGene转染试剂,吹打混合均匀;
(注:不同的细胞培养装置所需siRNA的量和HighGene转染试剂剂量详见附表3)
- (3) 将200 μ L质粒/HighGene转染试剂复合物均匀滴加到6孔细胞培养板孔中,轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布;
(注:6孔板中为完全培养基,轻轻晃动细胞培养板即可,切勿剧烈摇动细胞培养板,以免细胞脱落漂浮!)
- (4) 细胞转染4-6小时后,半量更换新鲜完全培养基;
(注:半量换液时,吸弃一半原有完全培养基,补加一半新鲜完全培养基)
- (5) 细胞转染24-48小时后,即可使用适当方式进行检测,如RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等。

4.4 慢病毒包装及感染 (以A549细胞为例)

- (1) 第一天,将293T细胞接种到10cm培养皿中,细胞密度控制在70%-90%为宜;
- (2) 第二天,先分别取慢病毒包装质粒pMD2G 4 μ g,慢病毒包装质粒pSPAX2 3 μ g,表达质粒6 μ g加入到盛有1mL无血清DMEM基础培养基离心管中,吹打混合均匀,然后加入26 μ L HighGene转染试剂,吹打混合均匀;
- (3) 将1mL质粒/HighGene转染试剂复合物均匀滴加到10cm培养皿中,轻轻晃动细胞培养皿使其均匀分布;
- (4) 细胞转染4-6小时后,半量更换新鲜完全培养基;
- (5) 细胞转染48小时后,常规离心收集细胞培养上清液,用

0.45 μ m滤器过滤细胞上清液,200 μ L分装后-80 $^{\circ}$ C冻存备用;

- (6) 将待感染的A549接种到6孔板中,细胞密度控制在70%-90%为宜;
- (7) 细胞贴壁后,将200 μ L慢病毒液均匀滴加到6孔板中,轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布;
- (8) 慢病毒感染18小时后,更换新鲜完全培养基;
- (9) 慢病毒感染48小时后,即可使用适当方式进行检测,如RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等,或加入相应筛选药物(G418或Puromycin)可获得稳定表达细胞株。

5. 注意事项

- (1) 转染前细胞应处于良好的生长状态,以对数生长期为佳,推荐细胞传代后12-24小时内、细胞密度为70-90%时进行转染;
- (2) 使用高质量的质粒有利于获得较高的转染效率,推荐使用无内毒素质粒抽提试剂盒抽提质粒,A260/A280比值为1.8~2.0,质粒浓度在300ng/ μ L以上;
- (3) 在配制转染试剂与质粒复合物时,需使用无血清、无抗生素的基础培养基作为溶剂,细胞培养孔中的完全培养基不影响细胞转染效率;

在细胞转染实验中,根据细胞转染效率可适当调整质粒与转染试剂的用量比例,一般质粒的量(μ g)与HighGene转染试剂剂量(μ L)使用比例在1:1~1:4之间,推荐比例为1:2;对于毒性比较敏感的细胞,建议转染4-6小时后,半量更换新鲜完全培养基;

转染试剂如遇沉淀,轻轻摇动管身,至沉淀溶解即可使用;本产品仅限用于科学研究,不得用于临床诊断和治疗。

附表1**常用细胞培养装置转染前一天细胞接种的推荐数量和培养体积**

细胞培养装置	接种细胞数量	细胞培养液体积
96 孔板	(1-3) $\times 10^4$	0.1-0.2mL
24 孔板	(1-3) $\times 10^5$	0.5-1mL
12 孔板	(2-4) $\times 10^5$	1-2mL
6 孔板	(3-5) $\times 10^5$	2-3mL
60mm 培养皿	(5-10) $\times 10^5$	3-5mL
100mm 培养皿	(1-3) $\times 10^6$	8-10mL
125ml 摇瓶	(1.5-2.5) $\times 10^7$	30-35mL
500ml 摇瓶	(6-10) $\times 10^7$	120-140mL
1000ml 摇瓶	(1.2-2) $\times 10^8$	240-280mL

附表2**常用细胞培养装置细胞转染时，各组分推荐使用剂量（质粒细胞转染）**

细胞培养装置	质粒 (μg)	HighGene 转染试剂 (μL)	基础培养基 (μL)
96 孔板	0.2	0.4	10
24 孔板	1	2	50
12 孔板	2	4	100
6 孔板	2-4	4-8	200
60mm 培养皿	3-5	6-10	400
100mm 培养皿	5-10	10-20	1000
125mL 摇瓶	30-35	60-70	3000
500mL 摇瓶	120-140	240-280	12000
1000mL 摇瓶	240-280	480-560	24000

附表3**常用细胞培养装置细胞转染时，各组分推荐使用剂量（siRNA 细胞转染）**

细胞培养装置	siRNA (pmol)	HighGene 转染试剂 (μL)	基础培养基 (μL)
96 孔板	4	0.2	10
24 孔板	20	1	50
12 孔板	40	2	100
6 孔板	100	5	200
60mm 培养皿	200	10	400
100mm 培养皿	600	30	1000