

YALEPIC® DNA/RNA 通用型转染试剂-LFDR YALEPIC® DNA/RNA Transfection Reagent-LFDR

产品货号

产品货号	YJ52002-01	YJ52002-02
规格	1 ml	5 × 1 ml

产品保存及运输条件

常温运输，2~8℃ 保存一年，不可冷冻。

产品概述

YALEPIC® DNA/RNA Transfection Reagent-LFDR 是一款高效便捷的 DNA/RNA 通用型转染试剂，对于常用贴壁细胞株，如 HeLa、B16F10、A549、HepG2、MRC-5，以及一些较难转染细胞株，如 L929、NIH3T3、LLC、U14、M38 等，均可获得较高的转染效率。本产品兼具与 DNA 或 RNA 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

适用于常用贴壁细胞如 HeLa、B16F10、A549、HepG2、MRC-5，以及一些较难转染细胞株，如 L929、NIH3T3、MCF-7、LLC、U14、M38 等，均可获得较高的转染效率。

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 DNA Maxi 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，离心管，T-75 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. DNA 转染时，确保使用高质量、无内毒素、无菌、高纯度的质粒 DNA。（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. 应避免转染复合物形成的反应体系中存在血清。
7. 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。
8. 建议进行 siRNA 转染时，LFDR (μl) : siRNA (pmol) 可以在 0.02 : 1 和 0.15 : 1 之间调整。
9. 建议进行质粒 DNA 转染时，LFDR (μl) : DNA (μg) 可以在 1 : 1 和 5 : 1 之间调整。

实验流程

● 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 EP 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 LFDR (表 1), 用移液器轻轻混匀, 静置 5 min。

复合物制备: 将 LFDR-Opti-MEM 滴加至 DNA-Opti-MEM 中, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 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 $^{\circ}$ 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。

● siRNA 转染

转染步骤与质粒 DNA 相同, 请参考表 1 的转染规模进行调整, 所有数量和体积均是按孔计算。转染高密度细胞可获得高转染效率、高表达水平和低细胞毒性。以 24 孔板为例, siRNA 需 15 pmol, LFDR 需 1.0 μ l。

● 质粒 DNA 及 siRNA 转染优化方案

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/siRNA 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 60~80% 以上。

1) LFDR (μ l) : DNA (μ g) 剂量可以在 1:1 和 5:1 μ l 之间进行调整。

2) LFDR (μ l) : siRNA (pmol) 剂量可以在 0.02:1 和 0.15:1 之间进行调整。

细胞培养板	单孔面积	培养基用量		DNA 转染		siRNA 转染	
		接种培养基用量	稀释培养基用量 Opti MEM	DNA	LFDR	siRNA	LFDR
96 well	0.3 cm ²	100 μ l	2 x 5 μ l	0.2 μ g	0.2 ~ 0.5 μ l	7.5 pmol	0.5 μ l
24 well	2.0 cm ²	500 μ l	2 x 10 μ l	0.4 μ g	0.8 ~ 2 μ l	15 pmol	1 μ l
12 well	4.0 cm ²	1 ml	2 x 20 μ l	1.0 μ g	2 ~ 5 μ l	30 pmol	2 μ l
6 well	10 cm ²	2 ml	2 x 50 μ l	2 μ g	4 ~ 10 μ l	60 pmol	4 μ l
60 mm	20 cm ²	5 ml	2 x 100 μ l	4 μ g	8 ~ 20 μ l	100 pmol	10 μ l
10 cm	60 cm ²	15 ml	2 x 300 μ l	12 μ g	24 ~ 60 μ l	300 pmol	30 μ l
T25	25 cm ²	6 ml	2 x 150 μ l	10 μ g	20 ~ 50 μ l	125 pmol	12.5 μ l
T75	75 cm ²	20 ml	2 x 300 ml	30 μ g	60 ~ 150 μ l	400 pmol	40 μ l

表 1: 质粒 DNA/siRNA 转染优化推荐表

常见问题与解决方案

1. LFDR 与 DNA/siRNA 的比例不合适。

1) LFDR (μl) : DNA (μg) 剂量可以在 1 : 1 和 5 : 1 μl 之间进行调整。

2) LFDR (μl) : siRNA (pmol) 剂量可以在 0.02 : 1 和 0.15 : 1 之间进行调整。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 细胞毒性高。

导致转染时细胞毒性大的因素有很多，例如 DNA 的用量过大、转染试剂的用量过大、转染时细胞状态较差以及培养基中抗生素的加入等。建议严格按照所选择转染试剂的说明书进行操作，以避免细胞毒性大的问题。

6. 转染效果不稳定

一个是转染试剂的稳定性，另一个是基因的稳定性。转染试剂应按照说明书建议的保存温度及条件进行保存。核酸如短时间内连续使用，可放置于 4°C 保存。若超过 10 天不使用，建议置于 -20°C 或 -80°C 长期储存以降低核酸的降解速度。

7. DNA-siRNA 共转染时，基因沉默效率不够高

当细胞同时转染 DNA 和 siRNA 时，建议使用分别转染的方式进行。即使用基因转染试剂分别与 DNA 和 siRNA 进行复合，再将两个复合物体系分两次分别加入到同一个装有细胞的实验孔中。