

# YALEPIC<sup>®</sup> DNA/RNA 通用型转染试剂-LFDR

## YALEPIC<sup>®</sup> 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°C 保存一年, 不可冷冻。

### 产品概述

**YALEPIC<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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, CO<sub>2</sub> 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 ( $\mu\text{l}$ ) : 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 ( $\mu\text{l}$ ) : DNA ( $\mu\text{g}$ ) 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°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  $\mu$ 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 ( $\mu$ l) : DNA ( $\mu$ g) 剂量可以在 1:1 和 5:1  $\mu$ l 之间进行调整。

2) LFDR ( $\mu$ 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 <sup>2</sup>	100 $\mu$ l	2 x 5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	0.2 ~ 0.5 $\mu$ l	7.5 pmol	0.5 $\mu$ l
24-well	2.0 cm <sup>2</sup>	500 $\mu$ l	2 x 10 $\mu$ l	0.4 $\mu$ g	0.8 ~ 2 $\mu$ l	15 pmol	1 $\mu$ l
12-well	4.0 cm <sup>2</sup>	1 ml	2 x 20 $\mu$ l	1.0 $\mu$ g	2 ~ 5 $\mu$ l	30 pmol	2 $\mu$ l
6-well	10 cm <sup>2</sup>	2 ml	2 x 50 $\mu$ l	2 $\mu$ g	4 ~ 10 $\mu$ l	60 pmol	4 $\mu$ l
60 mm	20 cm <sup>2</sup>	5 ml	2 x 100 $\mu$ l	4 $\mu$ g	8 ~ 20 $\mu$ l	100 pmol	10 $\mu$ l
10 cm	60 cm <sup>2</sup>	15 ml	2 x 300 $\mu$ l	12 $\mu$ g	24 ~ 60 $\mu$ l	300 pmol	30 $\mu$ l
T25	25 cm <sup>2</sup>	6 ml	2 x 150 $\mu$ l	10 $\mu$ g	20 ~ 50 $\mu$ l	125 pmol	12.5 $\mu$ l
T75	75 cm <sup>2</sup>	20 ml	2 x 300 ml	30 $\mu$ g	60 ~ 150 $\mu$ l	400 pmol	40 $\mu$ 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 ( $\mu\text{l}$ ) : DNA ( $\mu\text{g}$ ) 剂量可以在 1:1 和 5:1  $\mu\text{l}$  之间进行调整。
- 2) LFDR ( $\mu\text{l}$ ) : 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。