

Entranster™-H

(用于将 DNA 转染入 HEK293T 细胞)

使用手册

Cat. No. 18668-04 Size:0.4ml

常温运输，储存于 4℃

一 产品介绍

英格恩生物公司 (Engreen Biosystem Co.,Ltd.) 是专业的转染试剂研发生产厂商。Entranster™ 是英格恩生物公司研发合成的纳米聚合物转染试剂，该试剂采用纳米技术合成，是最新一代转染试剂。由于纳米技术的应用，Entranster™-H 在 HEK293T 细胞中转染效率最高的可以达到 95% 以上，同时有很低的细胞毒性。

本品适合在 HEK293T 细胞中进行高效快速转染或进行大量转染的实验。

二 转染前重要提示

1. 本品在转染过程中可以添加抗生素，抗生素的添加与否不影响转染效率和毒性。
2. 优化的必要性。由于 DNA 和转染试剂的用量比值是决定转染效率的重要因素，同时由于各实验室质粒的定量误差，质粒纯化程度不同以及细胞状态不同，造成不同细胞和实验室的最优实验条件是有差异的，为取得最高的转染效率，初次应用时，建议先进行优化。最优条件确定后，实验的结果将非常稳定。

三 最优条件实验 (以 6 孔板为例)

1. 提前一天细胞铺板

提前一天将细胞种植在 6 孔板，以转染时细胞密度在 50-70% 左右为宜，种植 2-3 孔。

2. 转染复合物的制备

- (1) 取 2-3 个 EP 管，根据表 1 用量，将相应 DNA 用 50μl 无血清稀释液体 (建议 OPTI-MEM 或无血清 DMEM) 稀释，充分混匀，制成 DNA 稀释液。

表 1 针对您的最优条件实验

	1	2	3
每孔 DNA 的量	0.5μg	1.5μg	3μg
每孔转染试剂量	0.5μl	1.5μl	3μl

- (2) 再取 2-3 个 EP 管，将相应 Entranster™-H 用 50μl 无血清稀释液体 (建议 OPTI-MEM 或无血清 DMEM) 稀释，充分混匀，制成 Entranster™-H 稀释液。室温静置 5 分钟。

(3)将 Entranster™-H 稀释液分别加入到对应 DNA 稀释液中，**加入后立即充分混匀**（可用振荡器振荡或用加样器吹吸 10 次以上），室温静置 **30 分钟**。转染复合物制备完成。

3. 转染

(1)将转染复合物加入到含细胞和完全培养基的培养容器上，轻柔混匀。

注意：①对本试剂，采用含血清的全培养基有助于提升转染效率。②完全培养基可加抗生素。

(2)培养 4-6 小时后更换培养基，继续培养 24-48 小时。

注意：①如细胞没有毒性等不良情况，转染后 4-6 小时可不必更换培养基。

表 2 不同细胞培养容器转染用量

细胞培养容器	表面积 (cm ²)	表面积相对于 24-well 比率	每孔加入 DNA 的量*	每孔 DNA 稀释液体积	每孔 Entranster™-H 用量*	Entranster™-H 稀释液体积	每孔培养基总量
96-well	0.3	0.2	0.25µg	5µl	0.25µl	5µl	100µl
48-well	0.7	0.4	0.5µg	10µl	0.5µl	10µl	200µl
24-well	1.9	1	1µg	15µl	1µl	15µl	500µl
12-well	3.8	2	2µg	25µl	2µl	25µl	1ml
6-well/35-mm	10	5	3µg	50µl	3µl	50µl	2ml
60 mm/T25 flask	21	10	8µg	125µl	8µl	125µl	5ml
100 mm/T75 flask	58	30	15µg	250µl	15µl	250µl	15ml

注意：①DNA 和转染试剂的量和比例严重影响转染效率，请根据优化结果确定具体的 DNA 和转染试剂用量。②如用于同时转染多种质粒，DNA 的用量指每种质粒用量的总和，这时如需得到较高转染效率，建议将 DNA 的用量和转染试剂的用量同步提高 2-4 倍。

四 优化条件的应用

根据预实验的最优化条件，按培养器皿表面积比例应用到其他培养容器。对大培养皿，可采用较少的培养基总量以增加转染复合物与细胞接触的机会，提高转染效率。

五 其他事项

1. **更好地优化。**表 2 的用量由于各实验室的差异会有所不同。为更好地优化，建议用不同浓度的 DNA 配合不同的剂量的 Entranster™-H 进行梯度实验。以 6 孔板为例，质粒浓度可以设 0.5µg、0.75µg、1µg、2µg、4µg 等梯度，同时转染试剂可以设 DNA (µg) : 转染试剂量 (µl) 为 1:0.5、1:1、1:2 几个梯度。

- 2. 稀释用液的选择。**必须采用无血清液体！建议采用 OPTI-MEM 或无血清 DMEM。
- 3. 培养时间。**应用本转染试剂后，由于不同细胞和不同的表达体系的差异，一般来说，观察转染效果的最佳时间是转染后 2-4 天。
- 4. 转染用细胞。**建议采用传代在 50 代以内，生长旺盛的细胞，细胞生长的培养基没有特殊要求，可以采用含血清培养基或加入抗生素。
- 5. 细胞密度。**细胞密度是决定转染效率和细胞毒性的重要因素之一，为求最佳转染效果，建议转染时的细胞密度从 30%到 70%进行不同细胞梯度转染，确定最佳转染数量。
- 6. 转染用 DNA。**推荐采用：高纯度和无内毒素 DNA。高纯度 DNA: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8 左右，无蛋白和 RNA。采用高纯度和无内毒素 DNA 将提高转染效率。

六 常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方案
转染 24 小时后效率低	DNA 与转染试剂比例不佳	建议预实验优化
	表达体系不佳	建议继续培养 24-48 小时或采用表达更好的质粒和状态良好的细胞用于转染
	细胞密度太高	建议转染时汇合度减低到 30-50%，同时延长转染后观察时间
	DNA 纯度不高	建议采用 OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 在 1.8 左右，无蛋白和 RNA，无内毒素 DNA
	转染后培养时间不够	建议减少转染时的细胞汇合度，48 小时甚至更长时间观察结果
	转染时培养基不合适	建议步骤 3(1)*采用含血清的全培养基
	稀释用溶液体积不合适	建议采用表 2 推荐的每孔稀释用溶液体积
	稀释用溶液含血清或蛋白	建议采用 OPTI-MEM 或无血清 DMEM 稀释。
细胞毒性	培养基用量不合适	建议采用表 2 推荐的每孔培养基量 建议步骤 3(1)*的全培养基量加大
	质粒表达系统毒性大	建议采用其他可靠质粒做阳性对照，比较转染结果
	细胞密度太大	建议减少细胞数量
	DNA 与转染试剂比例不佳	建议预实验优化
	细胞污染	建议彻底清洁所有细胞培养相关用品

七 储存与安全

本品常温运输，储存于 4℃，有效期 12 个月。

本品使用安全，未发现任何生物、化学毒性。如不慎沾染，用清水冲洗即可。

八 其他相关试剂

Entranster™-D: 用于将 DNA 高效低毒转染入动物细胞。

Entranster™-R: 用于将小片段 RNA(siRNA、miRNA、mimic、inhibitor 等)转染入动物细胞。

Entranster™-in vivo: 用于动物体内转染。

Envirus™: 病毒感染增强试剂。

九 质量保证

北京英格恩生物科技有限公司对 Entranster™-H 转染试剂的每批产品实行严格质量检验，并进行转染验证，以确保产品质量。请用户使用前务必认真阅读本手册。

十 使用限制

本转染试剂仅限科研用途。

Copyright © Engreen Biosystem Co., Ltd (China). 2008-2010. All rights reserved.
版权所有 © 北京英格恩生物科技有限公司 2008-2010。保留全部权利。