

# CraneBio 转染试剂

## 订购信息

货号	产品名称	规格
YL0055-100mg	CraneBio 转染试剂	100mg
YL0055-1G	CraneBio 转染试剂	1G
YL0055-5G	CraneBio 转染试剂	5G

## CraneBio 转染试剂 工作液配置 (1 mg/mL)

1. 称取 1g Crane Bio 转染试剂 溶于 900ml 去离子水中。
2. 搅拌直至完全溶解。
3. 加入 NaOH(1N) 调整 PH 至 6.9-7.1。
4. 如果 PH 超过 7.10, 加入 HCL(1N) 调整 pH 至 6.9-7.1。
5. 将溶液转移至量杯或者量筒定容至 1L。
6. 用(0.2um) 滤器真空过滤消毒, 4° C 至少稳定保存 3 个月。

### 注意

- **一定要溶解充分, 溶解不充分会影响后续的转染效率。**

### 操作方法

- **特别提醒: 初次使用 CraneBio 转染试剂进行不同基因转染时应先做预试, 优化出适合自己实验的最佳 CraneBio 转染试剂 和 DNA 的比例。**

## 一、贴壁细胞转染

以 6 孔板转染 293T 细胞为例:

### (一) 转染前准备

- 1) 转染前一天: 用胶原酶消化细胞并计数 (不建议用胰酶)。按照每孔  $2 \times 10^6$  的细胞量接种 293T 至 6 孔板 (每孔加入 2ml 新鲜的云贺生物 DMEM:F12+5%FBS 完全培养基和 1ml 的细胞悬液) 置于 37° C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h。
- 2) 24h 后, 移除之前培养基, 每孔加入 2ml 新鲜的云贺生物 DMEM:F12+5%FBS。

**注意:** 确保 293T 细胞生长状态良好传代不超过 15 代。

### (二) 转染过程

- 3) 第一天: 显微镜下检查细胞汇合度, 当细胞达到 70% 到 80% 的汇合度时, 开始准备转染。
- 4) 对于每孔细胞, 用 100μl 无血清培养基 (如 OPTI-MEM I 培养基) 稀释 DNA 使 DNA 终浓度为 1ug/ml (DNA/总培养体积)。
- 5) 对于每孔细胞, 用 100 μL 无血清培养基 (如 OPTI-MEM I 培养基) 稀释适当比例的适量 CraneBio 转染试剂。**DNA:CraneBio 转染试剂的比例要依据自己实验摸索最适比例。**
- 6) 将稀释的 CraneBio 转染试剂加入到稀释的质粒中 (总体积 200μL) 轻轻混匀, 室温孵育 30 分钟。
- 7) 小心地将 CraneBio 转染试剂复合物滴加到细胞培养板每个孔中, 轻轻摇动培养板混匀。注意加入混合液时轻轻沿着孔板边缘滴入, 而不是在细胞的顶部以免破坏细胞的粘附性。
- 8) 将培养板放入 37° C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养中培养 24h。

### (三) 观察转染结果

- 9) 第二天: 在荧光显微镜下观察细胞转染效率, 通常超过 80% 的 293T 细胞在转染后的 24h 可以观察到绿色荧光。

### 小贴士

- 建议进行不同基因转染时应对 Crane Bio 转染试剂 和 DNA 的比例进行优化, 以达到最适比例, 通常筛选范围在 1:1 到 5:1 之间。
- 通常情况下, 分别准备 Crane Bio 转染试剂 和 DNA 转染溶液时其体积一般是转染前每孔细胞培养液体积总量的 1/10-1/20, 如细胞培养液体积为 3ml, 则稀释 Crane Bio 转染试剂及 DNA 的体积为 150ul。质粒 DNA 的浓度通常为 1ug/ml (DNA 质量/细胞培养总体积)。
- 不同质粒种类以及大小会影响转染效率, 如较大片段插入质粒可能转染效率低, 可根据实际实验需要调整, 如适当增加转染质粒总量等。
- HEK293 GnTI 细胞重悬浮可用枪头或移液管反复吹打, 但 CHO-S 细胞的粘附性比较强重悬浮时需要借助细胞刮刀。
- 一般建议用胶原酶消化细胞, 如果表达的是膜蛋白, 胰酶消化细胞可能会降低蛋白表达, 建议用胶原酶消化细胞。
- 对于贴壁性低的细胞系, 可用明胶或鼠尾胶铺板, 增加细胞与培养皿之间的粘附性。
- 一旦确定了细胞类型、培养基和 Crane Bio 转染试剂 与 DNA 的最佳比例, 就可以在转染后 24 至 96 小时内多次观察转染效率, 以优化最大表达量时间点。

## 二、悬浮细胞转染

离心对数期生长的细胞用新鲜的培养基重悬浮使细胞密度达到  $1 \times 10^6$  cells/mL 小规模转染时, 如需大规模转染细胞密度要到达  $2-3 \times 10^6$  cells/mL。以 293F 细胞于 100mL 培养瓶 (溶液体积占瓶体积的 1/5) 操作体系举例如下:

### (一) 转染前准备

- 1) HEK293F 细胞传代接种于 20mL 悬浮细胞生长培养基中 (36.5° C, 120rpm, 5%CO<sub>2</sub>) 的条件下培养。当细胞密度到  $1 \times 10^6$  cells/mL, 然后旋紧瓶口放入摇床继续培养, 2~4 小时后可以转染。

### (二) 转染过程

- 2) 用 1ml OptiPRO™SFM (无血清培养基) 稀释适量的 DNA, 使 DNA 终浓度为 1ug/ml (DNA/总培养体积)。混匀并静置 5min。
- 3) 用 1ml OptiPRO™SFM (无血清培养基) 稀释适当比例的 Crane Bio 转染试剂, 混匀并静置 10min。 (Crane Bio 转染试剂 : DNA 参考比例范围, 可参考上述贴壁细胞 Crane Bio 转染试剂 和 DNA 优化方案优化)。
- 4) 将 Crane Bio 转染试剂加入到稀释的质粒中轻轻混匀, 室温孵育 30 分钟。

- 5) 将 Crane Bio 转染试剂 -DNA 转染复合物逐滴加入到细胞培养液中, 摇匀后旋紧瓶口放回摇床 (36.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 120rpm)。  
6) 基因表达可在 24-72 小时后检测, 具体时间取决于细胞系和转基因。

#### 小贴士

- 在悬浮培养中, 单个细胞的转染效率要高于聚集在一起的细胞, 需要优化适合单细胞的生长条件。
- 方形瓶应经过两个连续的干燥循环高压灭菌 (每个 45 分钟, 干燥 15 分钟) 盖子应尽可能松, 不得脱落。应该让它们冷却拧紧盖子前, 将其完全放入层流罩中。如果瓶子向内塌陷, 细胞将无法生长。
- 如果要获得更多的蛋白产量, 转染后 24 小时, 可以适当稀释细胞, 稀释比例参考范围 (1:2—1:5) 之间, 可以增加蛋白产量, 稀释效应与最佳稀释比率应根据经验确定。
- 可以把 DNA 和 Crane Bio 转染试剂直接加入到细胞悬液中进行转染, 但必须经过上述特定流程的 DNA 和转染试剂的比例和用量的相应优化。

#### 产品具有以下特点:

- 转染效率高, 细胞毒性低;
- 蛋白表达量高;
- 节约成本: Crane Bio 转染试剂至少能够降 40% 的转染试剂总成本;
- 适用于 HEK293 等真核细胞的转染;
- 适用于贴壁细胞和悬浮细胞的转染;
- 适用于有血清和无血清的转染条件;
- 无机试剂, 无动物源成分;
- 产品稳定, 质控严格;

表 1 可借鉴的转染参数 (96-孔板- 5L 生物反应袋<sup>[4]</sup>)

	96-孔板	6-孔板	6 孔深孔板 -ThinCert™	125 mL 培养瓶	10 L 反应袋 Cellbag™
细胞培养体系	200ul	2 mL	6 mL	25 mL	5 L
接种细胞量 (*10 <sup>6</sup> cell/mL)	0.2	1.5-2.0	1.5-2.0	1.5-2.0	1.5-2.0
悬浮细胞初始量	100 ul	1.8 mL	5.0-5.4 mL	22.5 mL	4.8 L
DNA 量=DNA (W) /培养 总体积 (V)	1ug/mL	1 ug/mL	1 ug/mL	1 ug/mL	0.75 ug/mL
DNA:Crane Bio 转染试剂 (w:w) 比例	1: 1-1: 5	1: 1-1: 5	1: 1-1: 5	1: 1-1: 5	1: 1-1: 5
DN 溶解体积	20 uL	100 uL	500-300 uL	1.25 mL	100 mL
Crane Bio 转染试剂 溶 解体积	80 uL	100 uL	500-300 uL	1.25 mL	100 mL
悬浮培养条件	无 (黏附细胞)	120 rpm	140 rpm	120 rpm	25 rpm, 8°; 28 rpm, 9.5° 24 hpt

#### 常见问题

问题	可能的原因	推荐的解决方案
转染效率低	细胞状态不好	使用状态好传代小于 15 代
	细胞接种密度低	增加细胞密度
	CraneBio 转染试剂工作液存储不当	配置好的 Crane Bio 转染试剂溶液 4°C 保存不超过 3 个月;如果储存在 -20°C, 避免反复冻融
	CraneBio 转染试剂/DNA 比率不合适	Crane Bio 转染试剂 /DNA 对于 293T 细胞为 (1: 1-5: 1), CHO 细胞使用 5: 1 或 6: 1

	混合方式不当	质粒 DNA 和 Crane Bio 转染试剂溶液混合时避免涡旋。Crane Bio 转染试剂加入 DNA 溶液中注意顺序
细胞毒性高	转染液孵育时间过长	合适的 Crane Bio 转染试剂/DNA 孵育时间为 3-6h, 过长时间 Crane Bio 转染试剂/DNA 复合体会导致细胞毒性
	细胞接种密度低	适合转染的细胞汇合度为 70%-80%
	Crane Bio 转染试剂 /DNA 比例高	优化合适的 Crane Bio 转染试剂 /DNA 比例

#### 注意

- 本手册仅为 Crane Bio 转染试剂基本操作说明指导。基于 Crane Bio 转染试剂的转染效率受多种因素影响, 包括 Crane Bio 转染试剂/DNA 复合物的制备方式、Crane Bio 转染试剂与 DNA 的比例、DNA 浓度、Crane Bio 转染试剂溶液的储存条件等。本手册不能覆盖 Crane Bio 转染试剂转染涉及的所有问题, 只能根据主要影响因素, 如 Crane Bio 转染试剂/DNA 比例 Crane Bio 转染试剂和 DNA 的浓度, 孵育时间等提供相应的操作指南, 以提高其效率、重复性和一致性。如果我们提供的 Crane Bio 转染试剂手册无法回答您的问题, 建议您查阅更多参考资料, 调整转染条件, 为自己的实验找到合适的转染方法。

#### 质量保证

- Crane Bio 转染试剂为云贺生物公司生产的线性阳离子聚合物的升级版, 每批产品出厂前都经过严格的检测, 保证每批产品都 100%合格、稳定且高品质。然而, 基于 Crane Bio 转染试剂的转染受到许多因素的影响, 如上所述, 另外还有很多实验相关因素 (如配置方法, PH, 水纯度, 称量的准确度, DNA RNA 纯度, 细胞状态, 细胞品系...)等造成溶解出现问题或者转染效率出现差异, 我们只能保证产品出厂时化学性质的售后质量包括产品纯度, 分子量及重量缺失破损等相关投诉。针对极个别客户溶解问题和转染效率问题我们只能友善解决, 不能保证您能获得满意答复, 对于产品产品转染效率不高, 转染批间有差异, 转染不了等问题, 不作为评价我们售后工作的依据。

本产品仅用于科研非诊断用