

pmlip2000转染试剂

货号: PMK0857

保存: 4°C干燥避光, 有效期12个月。

规格: 0.75ml/1.5ml

用途: 适用于贴壁细胞和悬浮细胞(哺乳动物细胞系)的转染。

产品简介:

pmlip2000转染试剂是一种新型的阳离子脂质体转染试剂, 适合于将核酸(DNA和RNA)转染至真核细胞, 具有低细胞毒性、对多种类型的细胞都具有高转染效率、转染时血清的存在不影响转染效率的优点。

适用范围: 贴壁细胞和悬浮细胞(哺乳动物细胞系)的转染。

质粒DNA的转染: 对大多数细胞来说, DNA(μg)与pmlip2000转染试剂(μl)的比例为1:2~1:3。转染时高的细胞密度可以得到高的转染效率和表达水平, 并能减少细胞毒性。

操作步骤:(以24孔板为例)

1、细胞铺板:

贴壁细胞: 转染前一天, 用500 μl 不含抗生素的培养基接种 $0.5-2 \times 10^5$ 细胞, 使之第二天能达到70-90%汇合。

悬浮细胞: 在准备DNA-pmlip2000复合物之前, 用500 μl 不含抗生素的培养基接种 $4-8 \times 10^5$ 细胞即可。

2、对每个转染样品, 进行以下操作

(1) 在离心管里分别加入50 μl 无血清培养基和0.8 μg DNA, 轻柔混匀, 制成DNA稀释液。

(2) 在另一个离心管里分别加入50 μl 无血清培养基和2.0 μl pmlip2000(注意用前先混匀), 轻柔混匀, 制成pmlip2000稀释液, 室温静置5分钟。

(3) 将DNA稀释液和pmlip2000稀释液混合, 轻柔混匀, 室温静置20分钟, 形成DNA-pmlip2000复合物。DNA-pmlip2000复合物在室温下可稳定存在6小时。

3、将DNA-pmlip2000复合物加入到接种好的细胞中, 将培养板轻轻地前后摇动, 使复合物分散均匀。

4、在37°C CO₂培养箱中培养4-6小时后更换培养基, 继续培养18-48小时

5、如果要筛选稳定细胞株, 则在转染24小时后将细胞按照1:10或更高的比例接种到新鲜培养基中, 第二天加入选择性培养基进行筛选。

质粒DNA转染的优化: 为达到最高的转染效率和降低细胞毒性的影响, 可以对DNA和pmlip2000的比例以及细胞密度进行优化, 一般在1:0.5~1:5的范围内优化DNA(μg)和pmlip2000(μl)的比例。

注意事项: 细胞/DNA/siRNA每次都不同, 建议每次转染一定要进行预实验:来摸索最佳条件, 尤其是转染试剂的最佳用量!

1) 转染试验失败需要找一下原因: DNA/siRNA, 转染试剂和细胞。转染效率低要先排除一下是否是siRNA的问题, 如果siRNA无效, 换再好的转染试剂也没意义, 可以用带荧光标记的control siRNA做一下看看, 转进去的话会有荧光的。确实转染效率低, 可以考虑换转染试剂; 毒性大则要减少转染试剂的用量。

2) 细胞的种类和状态影响较大: 转染时细胞必须处于良好生长状态, 转染时细胞的密度一般铺板在

达到70—80%最好（此时细胞处于对数生长期）；

3) 如果是贴壁细胞，应保证贴壁在12~24小时在进行转染，否则细胞转染容易脱壁。对于贴壁生长细胞，一般要求在转染前一日，必须应用胰酶处理成单细胞悬液，重新接种于培养皿或瓶，转染当日的细胞密度以70-90%（贴壁细胞）或 $2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ 细胞/ml（悬浮细胞）为宜，最好在转染前4h换一次新鲜培养液。

4) 质粒的大小，质量和用量对转染效率很关键。

5) 转染时注意脂质体和用量，过量的话对细胞毒性大也容易失败。

6) 转染作用6小时一定记得要换含血清的培养基

7) 培养基以及洗涤细胞和稀释用的培养基要无血清、无双抗。

8) 转染试剂对个别细胞可能有一定毒性，在转染过程由于提高细胞的通透性因而不能在培养答基中添加抗生素。

9) 高纯度的DNA或RNA可获得较高的转染效率！用于转染的质粒DNA必须无蛋白质，无RNA和其他化学物质的污染，OD260/280比值应在1.8以上。血清中含有大量的蛋白质，在转染过程中，带负电的蛋白质可能干扰阳离子脂质体对核酸的吸附，影响转染效率。另外，使用脂质体等转染试剂时，由于含血清转染会将血清中的蛋白带入细胞，引发细胞毒性，导致转染效率降低，故用无血清培养基转染效果更好！

10) 培养基中的血清：在开始准备DNA和转染试剂稀释液时要使用无血清的培养基，因为血清会影响复合物的形成。其实，只要在DNA-转染试剂复合物形成时不含血清，在转染过程中是可以使用血清的。

11) 培养基中的抗生素：抗生素是影响转染的培养基添加物。这些抗生素一般对于真核细胞无毒，但阳离子脂质体试剂增加了细胞的通透性，使抗生素可以进入细胞。这降低了细胞的活性，导致转染效率降低。

12) 一般在转染24-48h，靶基因即在细胞内表达。根据不同的实验目的，24-48h后即可进行靶基因表达的检测实验。

13) 如若建立稳定的细胞系，则可对靶细胞进行筛选，根据不同基因载体中所含有的抗性标志选用相应的药物，常用的真核表达基因载体的标志物有潮霉素和新霉素等。

14) 建议设置阳性对照和阴性对照。

相关产品：

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液

PMK053 GAPDHmAb-HRP conjugated

PMK0312 抗体稀释液

PMK1700 PBST缓冲液

PMK1020 IPTG溶液 (50mg/ml)

PMK1010 30%丙烯酰胺(29:1)

PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

PMK0012 SDS-PAGE凝胶制备试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：



