



脂质体 2000

方法一

描述:

脂质体 2000 是专门用于将核酸转染进入真核细胞的一种形式, 我们提供下列的建议:

在多种细胞和培养板中都有很高的转染效率。在网上列出的细胞类型中都获得了较高的转染效率。

核酸-脂质体 2000 的复合物可以直接加入到细胞培养液中, 无论是有血清还是无血清的情况。

转染之后不用移除复合物或者更换培养液, 但是复合物应在转染后 4-6h 移除。

转染的一些重要指导:

DNA 转染使用 page3

我们建议使用 Opti-MEM I reduced serum 培养基来稀释脂质体 2000 和核转染时不要向培养基中加入抗生素。

在实验过程中要保持一样的条件

DNA 转染:

使用下列方法在 24 孔板内转染 DNA 进入哺乳动物细胞。对于其他的板子, 可以参考 page4. 所有的数量和体积都是基于一个孔的剂量。准备复合物使 DNA(ug):脂质体(ul)的比例为 1:2 到 1:3。转染时细胞密度较高可以获得高的效率, 高的表达水平, 以及使毒性降低。条件的选择很重要。

1. 贴壁细胞:

在转染前一天, 向 24 孔板内接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞, 使得细胞在转染时融合率达到 90-95%。切记使用不含抗生素的培养基。

2. 对于每一个转染样品, 按照如下方法准备复合物:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

A.使用无血清的培养基将 DNA 稀释为 50ul, 温和混匀。

B.使用前混匀脂质体 2000, 然后用培养基将一定量的脂质体 2000 稀释为 50ul。室温孵育 5min。

进行到 c 时间不超过 25min

C. 5min 的孵育后, 混合稀释的 DNA 和稀释的脂质体 2000(总体积为 100ul) 温和混匀, 室温育 20min(溶液呈现云雾状)

混合物在室温可稳定存在 6h。

3.向含有细胞和培养液的板子中每孔加入 100ul 的复合物, 通过敲打板子和来回晃动使其混合均匀

4.细胞孵育 18-48h 后可检测转染情况。培养液可在转染 4-6h 后更换。

5.对稳定的细胞系:

传代细胞在转染后以 1:10 的比例加入新鲜的培养液。第二天加入选择培养基。

优化转染:

为了获得高的转染效率和低毒性, 通过调整细胞浓度和 DNA:脂质体 2000 的比例来优化转染条件。确保细胞 90%的融合, 以及 DNA(ug):胎质体(ul)比例在 1:0.5 到 1:5。

转染条件的浮动:

转染到不同类型的培养板中, 脂质体 2000 的, 核酸的量, 细胞数以及合适的培养基量, 都在下表中显示。在 96 孔板中, 建议总体积到 50ul

培养容器	共同试剂		DNA 转染	
	孔内液体体积	稀释液体积	DNA	脂质体 200
96 孔板	100ul	2*25ul	0.2ug	0.5ul
24 孔板	500ul	2*50ul	0.8ug	2.0ul
6 孔板	2ml	2*250ul	4.0ug	10ul
60mm	5ml	2*0.5ml	8.0ug	20ul



方法二

Protocol Outline:

- A. Plate cells so they will be 70-90% confluent at the time of transfection.
- B. Prepare plasmid DNA-lipid complexes.
- C. Add DNA-lipid complexes to cells.

Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol:

Component	96-well	24-well	6-well
Final DNA per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Final Lipofectamine® 2000 Reagent per well	0.2-0.5 uL	1.0-2.5 µL	5.0-12.5 uL

Co-Transfection of Plasmid DNA and siRNA:

Transfect plasmid DNA and siRNA at the same time using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 30 pmol (-0.6 µg) of siRNA per 1 µg of DNA.

mRNA Transfection:

mRNA can be transfected in a 24-well plate using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 0.5-1 µg of mRNA per well.

Transfect cells according to the following chart. Volumes are given on a per-well basis. Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (-well) transfections, and accounts for pipeting variations. Adjust the amounts of components according to your issue culture format.

Timeline		Procedure Details			
		Component	96-well	24-well	6-well
Day 0	1	Adherent cells	1-4 × 10 ⁴	0.5-2 × 10 ⁵	0.25-1 × 10 ⁶
	2	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4
Day 1	3	Lipofectamine® 2000 Reagent	i 1, 1.5, 2, 2.5 µL	i 2, 3, 4, 5 µL	i 6, 9, 12, 15 µL
	4	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL
Day 1	5	DNA (0.5-5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg
	6	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL
Day 1	7	Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
		Incubate for 5 minutes at room temperature.			
Day 2-4	8	Component	96-well	24-well	6-well
	9	DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
Day 2-4	10	Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng
	11	Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2-0.5 µL	1.0-2.5 µL	5.0-12.5 µL
		Incubate cells for 1-3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.			

Steps	
Seed cells to be 70-90% confluent at transfection	
Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	
Dilute DNA in Opti-MEM® Medium	
Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)	
Incubate	
Add DNA-lipid complex to cells	
Visualize/analyze transfected cells	