

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect 转染试剂盒是全球首款自组装蛋白纳米颗粒核酸转染试剂，专为难转细胞系设计，能够实现卓越的外源基因递送与表达。作为一种非病毒、非电转、非脂质体的转染试剂，ProteanFect 可高效、低毒、简便地将基因递送至细胞中，尤其适用于大片段和多片段基因递送。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect 转染试剂盒在干冰中运输，收到后应存放于 -20°C ，直至使用。**试剂盒规格依据 Reagent B 的体积设定。**试剂盒包含阳性对照样品，编码绿色荧光蛋白（EGFP）的 mRNA 和质粒 DNA（pDNA），以验证实验操作及试剂效果。开封后，为确保试剂的最佳性能，需根据表 1 中的存储条件妥善保管各组分。

表 1 ProteanFect (PT01) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT01)	打开使用后，保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
Reagent B (PT01)	保存于 -20°C ，避免反复冻融
EGFP-mRNA ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照	保存于 -20°C ，避免反复冻融
EGFP-pDNA ($0.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照	保存于 -20°C ，避免反复冻融

实验前材料准备

- 待转染细胞：转染前细胞必须处于良好的生长状态，活率 $>90\%$ 。细胞在转染前一天需传代更换新鲜培养基，贴壁转染需提前种板。
- 推荐培养基：Opti-MEM 培养基（或无血清的 RPMI 1640 培养基/无血清 DMEM 培养基），提前预热或恢复至室温。
- 转染试剂：室温自然解冻，颠倒或涡旋至溶液均一后使用。
- 其他：完全培养基，无菌 EP 管、所需转染的核酸样品。

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect (PT01) 转染细胞系的实验操作步骤说明 (以 96 孔板转染 mRNA 为例)

操作步骤	细胞系转染
1 配置 ProteanFect 转染体系 (配置完置于冰上)	
1.1 混合 Reagent A (PT01) 与 mRNA	在 40 μL Reagent A (PT01) 中加入 0.5 μg mRNA, 充分混匀 (Reagent A 使用前需颠倒混匀)
1.2 加入 Reagent B (PT01) 并混匀	向上述混合液中加入 1.4 μL Reagent B (PT01), 使用移液枪上下吹打 20–30 次或涡旋混匀 10 秒, 使其充分混合 ^a
2 转染前细胞处理 (尽量去除 FBS, 以免影响转染效果)	
2.1 悬浮细胞准备	取待转染细胞, 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清后以 Opti-MEM 重悬细胞沉淀, 再次离心。最终用 Opti-MEM 重悬并调整细胞浓度至 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/mL 备用
2.2 贴壁细胞准备 ^b	转染前汇合率应保持在 50%-80%; 弃去培养基后, 用 Opti-MEM 轻柔清洗细胞两次, 加入 20 μL Opti-MEM 备用
3 细胞转染	
3.1 混合转染体系与细胞	将配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 μL 细胞悬液混合后, 在离心管中孵育; 或直接将转染体系加入贴壁细胞中
3.2 孵育	37°C 孵育 45-60 分钟 ^c
3.3 终止反应与洗涤	加入约 5 倍转染体系体积 (200 μL) 的完全培养基, 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清 (可保留少量液体以减少细胞损失); 贴壁细胞可直接弃去混合液并补加培养基
3.4 细胞培养与观察	加入适量完全培养基, 进行细胞培养, 后续可根据实验目的进行基因表达检测 ^d

a, 在配置 ProteanFect 转染体系过程中, 如出现轻微粘稠现象, 属正常现象。体系配置完成后建议置于冰上保存; 如需在室温下保存, 须在 30 分钟内使用完毕。

b, 部分贴壁细胞可通过悬浮转染方式提升转染效率, 即在转染当日将细胞消化为单细胞悬液, 后续操作流程与悬浮细胞一致。

c, 孵育时间可根据不同细胞类型适当调整, 建议不超过 2 小时。

d, 阳性对照 mRNA 可在转染后 5–48 小时内检测 EGFP 表达; 阳性对照 pDNA 可在转染后 24–48 小时检测 EGFP 表达; 转染 siRNA 后敲低效率检测建议在 48–72 小时内进行。

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect（PT01）转染不同类型核酸的实验操作步骤说明（以 96 孔板转染为例）

操作步骤	细胞系转染		
1 配置 ProteanFect 转染体系	mRNA ^a	siRNA ^b	pDNA ^c
1.1 混合 Reagent A（PT01）与核酸	在 40 μL Reagent A（PT01）中加入 0.5 μg mRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT01）中加入 40 pmol siRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT01）中加入 0.4 μg pDNA，充分混匀
1.2 加入 Reagent B（PT01）	往上述混合物中加入 1.4 μL Reagent B（PT01）	往上述混合物中加入 1.4 μL Reagent B（PT01）	往上述混合物中加入 1 μL Reagent B（PT01）
2 转染前细胞处理	详见表 2		
3 细胞转染	详见表 2		

a, 建议 mRNA 浓度≥1 μg/μL。如需同时转染多个 mRNA，为确保高效的转染效果，加入的 mRNA 总量为 0.5 μg。

b, 建议 siRNA 浓度≥20 μM。如需同时转染多个 siRNA，为确保高效的转染效果，加入的 siRNA 总量为 40 pmol。

c, 建议 DNA 浓度≥0.5 μg/μL。如需同时转染多个 DNA，为确保高效的转染效果，加入的 DNA 总量为 0.4 μg。同时，转染效率受 DNA 质量影响，建议使用无内毒素试剂盒制备 DNA，并确保 OD 值在 1.7-1.9 之间。使用无核酸酶纯水将 DNA 稀释至 0.5-2 μg/μL 的浓度，以提高转染效果并降低细胞毒性。

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

表 4 ProteanFect（PT01）转染不同细胞培养孔板规格的各组分使用含量

* 大体系转染推荐使用离心管孵育，600 μL 体系（含 600 μL）以上涡旋混匀

组分	孔板类型	细胞系		
Reagent A（PT01）	96 孔	40 μL		
	48 孔	80 μL		
	24 孔	200 μL		
	12 孔	600 μL		
	6 孔	800 μL		
待转染核酸	核酸类型	DNA	mRNA	siRNA
	96 孔	0.4 μg	0.5 μg	40 pmol
	48 孔	0.8μg	1 μg	80 pmol
	24 孔	2 μg	2.5 μg	200 pmol
	12 孔	6 μg	7.5 μg	600 pmol
	6 孔	8 μg	10 μg	800 pmol
Reagent B（PT01）	96 孔	1 μL	1.4 μL	1.4 μL
	48 孔	2 μL	2.8 μL	2.8 μL
	24 孔	5 μL	7 μL	7 μL
	12 孔	15 μL	21 μL	21 μL
	6 孔	20 μL	28 μL	28 μL
推荐每孔细胞数（Opti-MEM）	96 孔	1×10 ⁵ ~2×10 ⁵ （20 μL）		
	48 孔	2×10 ⁵ ~4×10 ⁵ （40 μL）		
	24 孔	5×10 ⁵ ~1×10 ⁶ （100 μL）		
	12 孔	1.5×10 ⁶ ~3×10 ⁶ （300 μL）		
	6 孔	2×10 ⁶ ~4×10 ⁶ （400 μL）		

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

ProteanFect 已成功转染的细胞

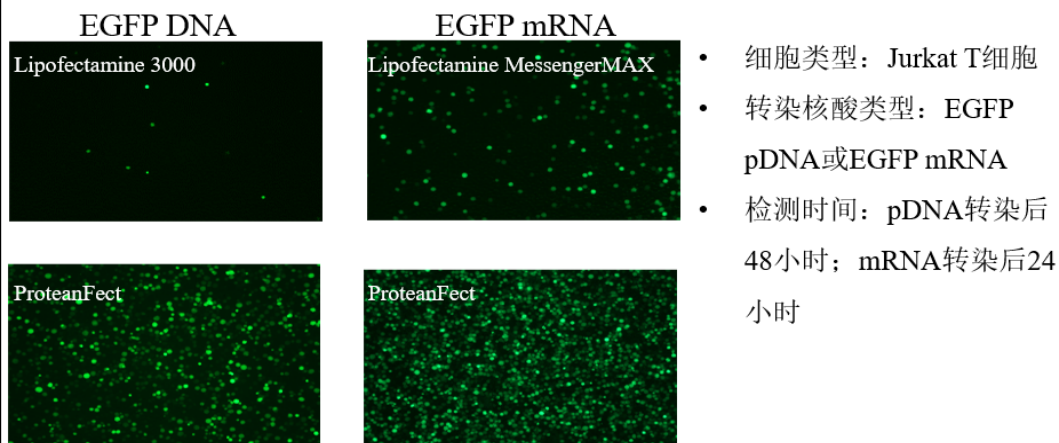
目前使用 ProteanFect 可成功转染以下所列细胞系类型，也广泛适用于其他多种细胞

细胞系	已测试可转染的核酸类型
Jurkat T (人 T 淋巴细胞白血病细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
LX-2 (人肝星状细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
HepG2 (人肝肿瘤细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
THP-1 (人急性单核细胞白血病细胞系)	mRNA, siRNA
Raji (人 Burkitt 淋巴瘤细胞)	mRNA, siRNA
K562 (人慢性粒细胞白血病细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
SH-SY5Y (人神经母细胞瘤细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA
U2OS (人骨肉瘤细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
U937 (人类淋巴瘤细胞)	mRNA, siRNA
HFF (人皮肤成纤维细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
HEK-293 (人胚胎肾细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA
MC38 (小鼠结肠癌细胞)	mRNA, siRNA
RAW264.7 (小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)	mRNA, siRNA
LLC (小鼠 Lewis 肺癌细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
C2C12 (小鼠成肌细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
COS7 (猴肾细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA

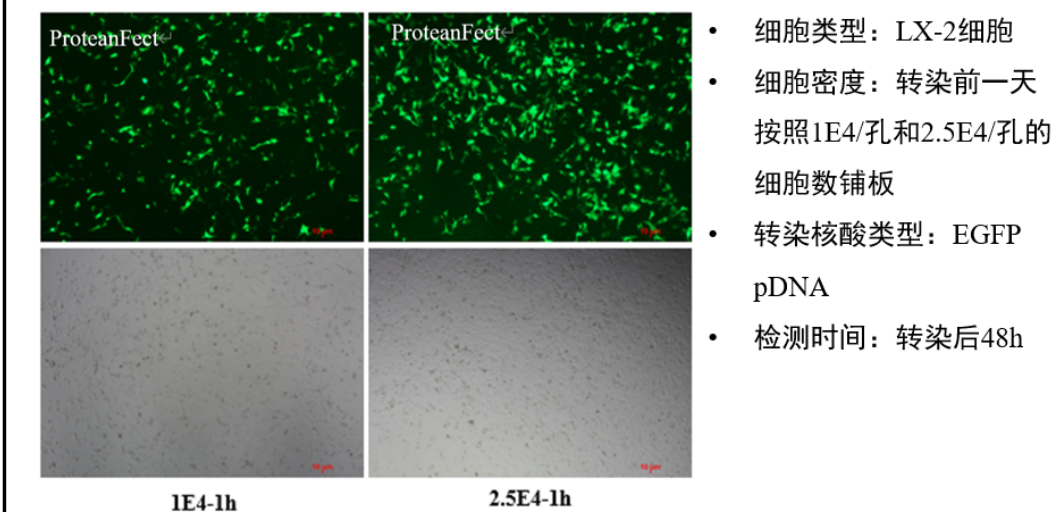
ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

数据分享

案例1：使用ProteanFect 成功转染Jurkat T细胞



案例2：使用ProteanFect 成功转染LX-2人肝心状细胞



ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

常见问题

1. 如何提升转染效率

转染条件需根据细胞类型和培养条件进行优化。建议：**1) 延长转染时间**：根据细胞状态适当延长转染时间。通常细胞系不超过 2 小时。**2) 提升 ProteanFect 转染量**：适当增加转染体系至初始的 1.5-2.5 倍。

2. 质粒 DNA 能否用于细胞系转染

多数细胞系经过多代培养后，能够更有效地应对外源 DNA 的压力，对双链 DNA 的转染耐受性较高，因此通常可使用质粒 DNA 进行转染。然而，一些细胞系仍可能对双链 DNA 较为敏感，导致转染过程中产生毒性反应，如炎症应激。因此，实验中应根据具体细胞系的特性及研究目的选择合适的转染策略。以 THP-1（人急性单核细胞白血病细胞系）和 Raji（人 Burkitt 淋巴瘤细胞系）为例，它们不适合使用质粒 DNA 进行转染。

3. 质粒 DNA 转染要求

转染效率受 DNA 质量影响。建议使用无内毒素试剂盒制备 DNA，并确保 OD 值在 1.7-1.9 之间；使用无核酸酶纯水将 DNA 稀释至 0.5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度。

4. 细胞系转染前处理

1) 为获得良好的转染效率，建议使用活性超过 90% 的细胞，可以通过台盼蓝染色测定细胞活性。2) 不建议使用传代次数超过 15 次的细胞进行实验。3) 新复苏的细胞在转染实验前需传代 2-3 次，待细胞恢复正常生长后使用。

5. 关于试剂盒中阳性对照的使用建议

首次尝试时，建议设置阳性对照组（EGFP mRNA 或 EGFP pDNA），以检测实验操作和试剂的有效性。使用 96 孔板的细胞量即可，节省细胞和试剂。

6. 转染时的细胞数范围

说明书中提供了最佳转染条件下的细胞数量范围，但在特殊情况下，即使细胞数量较少，也可以进行转染。以 96 孔板为例，建议细胞数量不低于 $4 \times 10^3/\text{孔}$ ，以确保后续检测的可靠性。

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

7. 转染后细胞状态与活力

转染后，细胞状态可能与未处理组略有差异。但使用 ProteanFect 试剂进行转染时，对细胞活力的损伤较小。通常在转染后第二天，细胞状态会基本恢复。

8. 转染后细胞离心后看不到沉淀

对于小体积转染体系（如 96 孔板），离心后细胞沉淀不明显是正常现象。细胞沉淀可能散落在离心管侧壁，不影响后续结果。为减少细胞损失，离心后移液时应避免枪头紧贴底部。

9. 转染体系扩大是否影响转染效率

如转染细胞量较大，12 孔板体系及以上推荐在凝聚体配置步骤中采用涡旋方式混匀，在离心管进行转染孵育，转染体系参照表 4，不会影响转染效率。

10. 贴壁细胞如何转染

对于贴壁细胞，可提前一天种板后进行转染，也可消化成细胞悬液进行悬浮转染。具体操作参照表 2。

如果您在实验过程中遇到任何问题，欢迎通过扫描下方二维码联系我们的技术微信，或将您的问题发送至我们的电子邮件：tech@nanoportalbio.com。我们的专业团队将竭诚为您解答疑问，提供技术支持。

