

ProteanFect Max 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect Max 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，专为原代细胞与难转细胞系设计，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 Max 能高效且低毒性地转染 mRNA、siRNA、DNA 等多种核酸。该试剂操作简便，仅需 5-15 分钟即可将核酸递送至原代细胞内，最快在 2 小时内观察到 mRNA 的表达效果。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect Max 转染试剂盒在干冰中运输，收到后应存放于 -20℃，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 Max (PT02) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT02)	打开使用后，保存于 2-8℃
Reagent B (PT02)	保存于-20℃，避免反复冻融
Reagent C (PT02)	打开使用后，保存于 2-8℃
EGFP-mRNA (1 µg/µL) 阳性对照	保存于-20℃，避免反复冻融
EGFP-pDNA (0.5 µg/µL) 阳性对照	保存于-20℃，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；对于部分原代细胞，建议在适当活化后进行转染。详细操作和技巧可参考微信公众号“西湖凝聚体”中的转染攻略。
- 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 Max 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect Max（PT02）转染不同类型细胞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	原代细胞转染 ^a
1 配置 ProteanFect 转染体系(配置完置于冰上)		
1.1 混合 Reagent A（PT02）与 mRNA	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 0.5 μg mRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）	在 40 μL Reagent A（PT02）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（PT02）并混匀	向上述混合液中加入 1.4 μL Reagent B（PT02），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 ^b	向上述混合液中加入 0.7 μL Reagent B（PT02），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 ^b
1.3 加入 Reagent C（PT02）混匀	N/A	往上述混合物中加入 8 μL Reagent C（PT02）并混匀
2 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 5×10 ⁶ – 1×10 ⁷ cells/mL 备用	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 5×10 ⁶ – 1×10 ⁷ cells/mL 备用
2.2 贴壁细胞准备 ^c	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	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	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℃孵育 45-60 分钟 ^d	37℃孵育 15-30 分钟 ^d
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	加入约 5 倍转染体系体积（250 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 ^e	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 ^e

a, 对于原代细胞，建议在转染前进行适当的激活处理，以提高转染效果。

b, 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。

c, 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。

d, 孵育时间可根据不同细胞类型进行适当调整。对于细胞系，孵育时间建议不超过 2 小时；对于原代细胞，孵育时间建议不超过 45 分钟。

e, 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 Max 转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect Max（PT02）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			原代细胞转染	
1 配置 ProteanFect 转染体系	mRNA ^a	siRNA ^b	pDNA ^c	mRNA ^a	siRNA ^b
1.1 混合 Reagent A（PT02）与核酸	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 0.5 μg mRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 40 pmol siRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 0.4 μg pDNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 0.5 μg mRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 20 pmol siRNA，充分混匀
1.2 加入 Reagent B（PT02）	往上述混合物中加入 1.4 μL Reagent B（PT02）	往上述混合物中加入 1.4 μL Reagent B（PT02）	往上述混合物中加入 1 μL Reagent B（PT02）	往上述混合物中加入 0.7 μL Reagent B（PT02）	往上述混合物中加入 0.7 μL Reagent B（PT02）
1.3 加入 Reagent C（PT02）	NA	NA	NA	往上述混合物中加入 8 μL Reagent C（PT02）	往上述混合物中加入 8 μL Reagent C（PT02）
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（细胞系）或 20 pmol（原代细胞）。

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。此外，双链 DNA 转染原代细胞可能引发一定的细胞毒性，如炎症应激，因此某些原代细胞（例如原代 T 细胞）不适合质粒 DNA 转染，实验设计时应谨慎选择。

ProteanFect Max 转染试剂盒使用说明书

表 4 ProteanFect Max（PT02）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			原代细胞	
Reagent A（PT02）	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	mRNA	siRNA
	96 孔	0.4 μg	0.5 μg	40 pmol	0.5 μg	20 pmol
	48 孔	0.8μg	1 μg	80 pmol	1 μg	40 pmol
	24 孔	2 μg	2.5 μg	200 pmol	2.5 μg	100 pmol
	12 孔	6 μg	7.5 μg	600 pmol	7.5 μg	300 pmol
	6 孔	8 μg	10 μg	800 pmol	10 μg	400 pmol
Reagent B（PT02）	96 孔	1 μL	1.4 μL	1.4 μL	0.7 μL	0.7 μL
	48 孔	2 μL	2.8 μL	2.8 μL	1.4 μL	1.4 μL
	24 孔	5 μL	7 μL	7 μL	3.5 μL	3.5 μL
	12 孔	15 μL	21 μL	21 μL	10.5 μL	10.5 μL
	6 孔	20 μL	28 μL	28 μL	14 μL	14 μL
Reagent C（PT02）	96 孔	NA			8 μL	
	48 孔				16 μL	
	24 孔				40 μL	
	12 孔				120 μL	
	6 孔				160 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）				

ProteanFectMax 转染试剂盒使用说明书

ProteanFect Max (PT02) 已成功转染的细胞

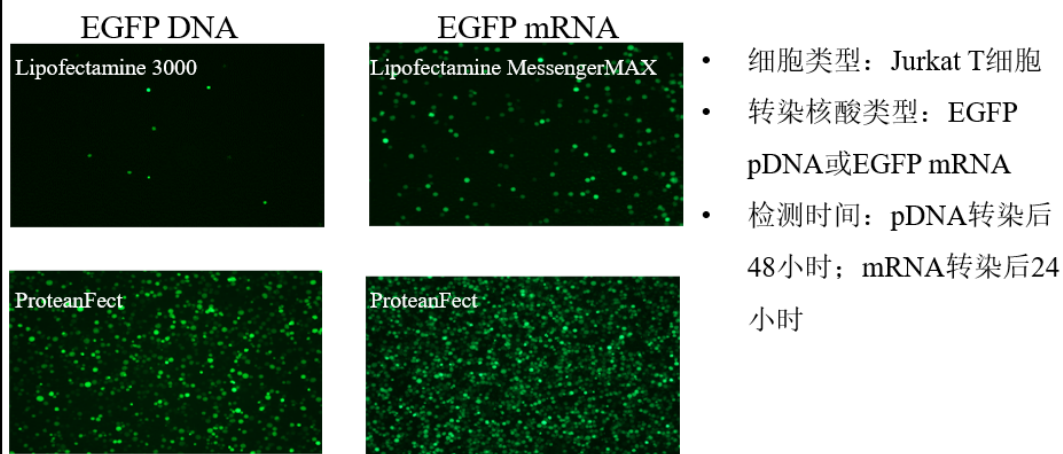
目前使用 ProteanFect Max 可成功转染以下所列细胞类型，也广泛适用于其他多种细胞

细胞类型		已测试可转染的核酸类型
原代细胞	人原代 T 细胞	mRNA, siRNA
	人原代 NK 细胞	mRNA, siRNA
	人原代单核细胞	mRNA, siRNA
	人原代 CD34+造血干细胞	mRNA, siRNA
	小鼠原代心肌细胞	mRNA, siRNA
	小鼠原代神经元	pDNA, mRNA, siRNA
	小鼠原代神经胶质细胞	pDNA, mRNA, siRNA
	大黄鱼原代间充质干细胞	mRNA, siRNA
难转细胞系	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
	MOLT-16 (人 T 淋巴细胞白血病细胞)	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
	MDBK (牛肾细胞系)	mRNA, siRNA

ProteanFect Max 转染试剂盒使用说明书

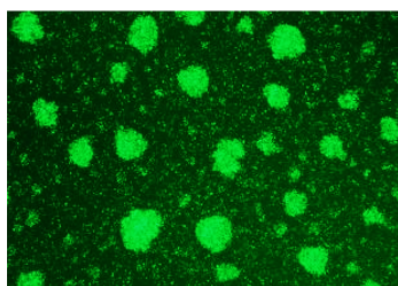
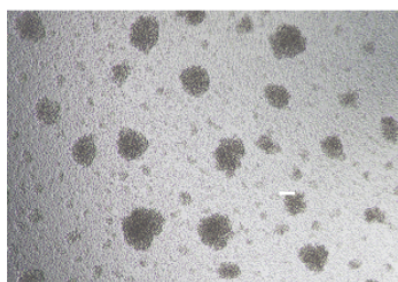
数据分享

案例1：使用ProteanFect 成功转染Jurkat T细胞

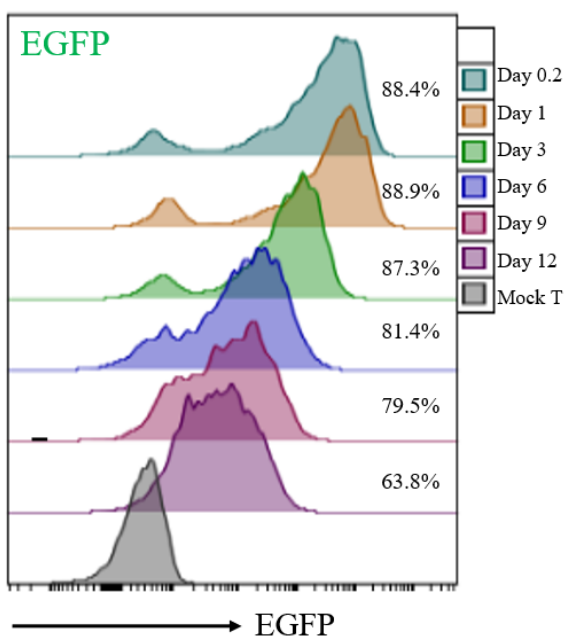


案例2：使用ProteanFect Max 成功转染人原代 T细胞

24 hours post transfection



Sustained gene expression



- 细胞类型：使用Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28 (Thermo Fisher, 11141D) 持续激活6天后的人原代T细胞
- 转染核酸类型：EGFP mRNA
- 检测时间：转染后5小时至12天内持续监测

ProteanFect Max 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。通常原代细胞不超过 1 小时，细胞系不超过 2 小时。**2) 提升 Reagent C 用量**：对于细胞系转染，可在体系中添加适当的 Reagent C，以 96 孔板为例，添加 8-13.5 μL ，孵育 15 分钟，最长不超过 45 分钟；原代细胞则可将 Reagent C 体积增加至 13.5 μL ，孵育时间同样不超过 45 分钟。**3) 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 能否用于原代细胞转染

双链 DNA 转染原代细胞可能引起一定的毒性，例如炎症应激，因此需根据实验目的谨慎选择。以人或小鼠来源的原代 T 细胞为例，使用质粒 DNA 转染可能导致显著的细胞毒性，因此不适合此类细胞。而大多细胞系通常经过多代培养，能更有效地应对外源 DNA 带来的压力，对双链 DNA 转染的耐受性较高，因此可以使用质粒 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. 原代细胞转染前预处理

对于原代细胞，充分活化有助于提高转染效率，因此建议在适当活化后进行转染。例如，人原代 T 细胞可使用 CD3/CD28 磁珠或抗体进行激活，激活 2-10 天内均可转染，其中激活 4-7 天时转染效率最高。（详细操作和技巧可参考微信公众号“西湖凝聚体”中的转染攻略→人原代 T）。

6. 关于试剂盒中阳性对照的使用建议

ProteanFect Max 转染试剂盒使用说明书

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。

7. 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 4×10^3 /孔，以确保后续检测的可靠性。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 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。

