

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基于内源蛋白凝聚体的转染试剂，专为难转细胞系设计，能够实现高效的核酸递送与基因调控。作为一款全新的非病毒、非电转、非脂质体的递送系统，ProteanFect 能够高效、低毒、便捷地将mRNA、siRNA及DNA 等多种核酸分子递送入细胞，尤其在大片段和多片段基因递送中展现出显著优势。

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℃到-80℃，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 转染试剂盒（PT01 ）组分

成分	存储方式
Reagent A（PT01）	打开使用后，保存于2-8℃
Reagent B（PT01）	保存于-20℃至-80℃，避免反复冻融
Reagent C（PT01）	打开使用后，保存于2-8℃
EGFP-mRNA（1 µg/µL）阳性对照	保存于-20℃至-80℃，避免反复冻融
EGFP-pDNA（0.5 µg/µL）阳性对照	保存于-20℃至-80℃，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。
- 核酸：无酶无菌水溶解。建议mRNA浓度≥1 µg/µL，siRNA浓度≥20 µM，DNA浓度≥0.5 µg/µL。
- 其他：完全培养基，无菌EP管、无RNA酶无菌吸头（RNA转染）、待转染的核酸样品。

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

表2 ProteanFect （PT01）实验操作步骤说明（最小体系mRNA为例）

操作步骤	
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
1.3 [可选步骤]加入Reagent C（PT01）	加入 8 μL Reagent C（PT01），轻柔吹打 2–3 次或涡旋 2–3 秒混匀。 提示：Reagent C 专为难转染细胞设计，可显著提升部分细胞系转染效率。初次转染时，建议设立“添加”与“不添加” Reagent C 的平行对照实验，以确定最佳转染条件。
2 细胞处理（尽量去除FBS，以免影响转染效果）	
a. 悬浮转染准备	取待转染细胞，300 g 常温离心 5 分钟，吸弃去上清后以 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
b. 贴壁转染准备 ^b	转染当天细胞96孔板汇合率应保持在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	悬浮转染——吸取 20 μL 细胞悬液（ $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ cells），加入配置好的 ProteanFect 转染复合物体系中，轻柔吹打 2–3 次混匀，离心管中孵育； 贴壁转染——将配置好的 ProteanFect 转染复合物体系直接加入贴壁细胞培养孔中，轻柔摇匀
3.2 孵育	37℃培养箱中孵育45-60分钟（未添加Reagent C）或15-45分钟（添加Reagent C） ^c
3.3 终止反应与洗涤	悬浮转染——加入 200 μL（约 5 倍 Reagent A 体积）完全培养基以终止反应，300 g 常温离心 5 分钟，小心吸弃上清液（可保留少量液体以减少细胞损失）； 贴壁转染——直接小心吸弃孔中的转染混合液
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. 孵育时间可根据转染后细胞活率和转染效率进行适当调整。在未添加 Reagent C 的条件下，转染孵育时间不宜超过 2 小时；若添加 Reagent C，孵育时间不宜超过 1 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（以最小体系转染为例）

操作步骤			
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），充分混匀	往上述混合物中加入1.4 μL Reagent B（PT01），充分混匀	往上述混合物中加入1 μL Reagent B（PT01），充分混匀
1.3 【可选步骤】加入Reagent C（PT01）	往上述混合物中加入8 μL Reagent C（PT01）混匀		
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，提前预混匀多个mRNA，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，提前预混匀多个siRNA，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，提前预混匀多个DNA，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）各转染体系的试剂使用量

*悬浮转染推荐试剂用量及细胞悬液体积可根据表2、表3中最小体系等比放大
*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
*Reagent C 为可选组分。常规细胞系可不添加（0 μL）；难转染细胞系如需添加，请按表中标注用量使用。

组分	孔板类型	用量		
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	mRNA	siRNA	DNA
	96孔	0.5 μg	40 pmol	0.4 μg
	48孔	1 μg	80 pmol	0.8μg
	24孔	2.5 μg	200 pmol	2 μg
	12孔	7.5 μg	600 pmol	6 μg
	6孔	10 μg	800 pmol	8 μg
Reagent B （PT01）	96孔	1.4 μL	1.4 μL	1 μL
	48孔	2.8 μL	2.8 μL	2 μL
	24孔	7 μL	7 μL	5 μL
	12孔	21 μL	21 μL	15 μL
	6孔	28 μL	28 μL	20 μL
[可选步骤] Reagent C （PT01）	96孔	0/8 μL		
	48孔	0/16 μL		
	24孔	0/40 μL		
	12孔	0/120 μL		
	6孔	0/160 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)		

ProteanFect 转染试剂盒使用说明书

ProteanFect (PT01) 已成功转染的细胞 (部分展示)

目前使用ProteanFect (PT01) 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

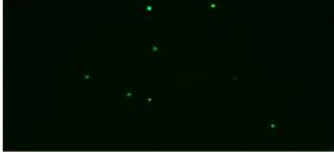
细胞类型		已测试可转染的核酸类型
人源细胞系	Jurkat T (人T淋巴细胞白血病细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
	LX-2 (人肝星状细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
	HepG2 (人肝肿瘤细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
	THP-1 (人急性单核细胞白血病细胞系)	mRNA, siRNA
	Raji (人Burkitt淋巴瘤细胞)	mRNA, siRNA
	K562 (人慢性粒细胞白血病细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
	Kasumi-1 (人急性髓系白血病细胞系)	mRNA, siRNA
	HL-60 (人早幼粒白血病细胞系)	mRNA, siRNA
	KYSE-510 (人食管鳞状细胞癌细胞系)	mRNA, siRNA
	Mum2B (人黑色素瘤细胞系)	mRNA, siRNA
	H1-hESC (人胚胎干细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA
	HT-29 (人结直肠腺癌细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA
	5637 (人膀胱癌细胞系)	pDNA, mRNA, siRNA
	HGC-27 (人胃癌细胞系)	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
其他细胞系	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

数据分享

案例1：使用ProteanFect 成功转染Jurkat T细胞

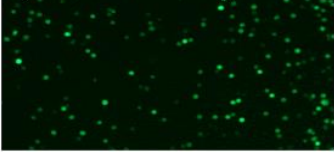
EGFP DNA

Lipofectamine 3000

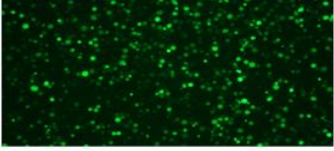


EGFP mRNA

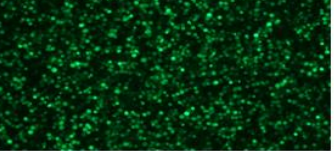
Lipofectamine MessengerMAX



ProteanFect

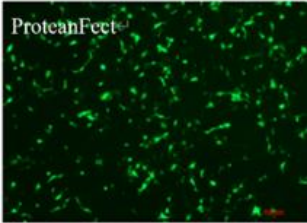


ProteanFect

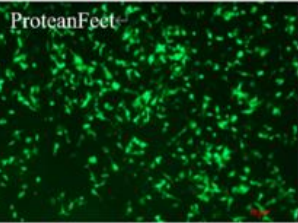


- 细胞类型：Jurkat T细胞
- 转染核酸类型：EGFP pDNA或EGFP mRNA
- 检测时间：pDNA转染后48小时；mRNA转染后24小时

案例2：使用ProteanFect 成功转染LX-2人肝心状细胞



1E4-1h



2.5E4-1h

- 细胞类型：LX-2细胞
- 细胞密度：转染前一天按照1E4/孔和2.5E4/孔的细胞数铺板
- 转染核酸类型：EGFP pDNA
- 检测时间：转染后48h

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。在未添加 Reagent C 的条件下，转染孵育时间不宜超过 2 小时；若添加 Reagent C，孵育时间不宜超过 1 小时。**2) 添加/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 。**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转染要求

转染效率受DNA质量影响。建议使用去内毒素试剂盒制备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。

3. 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。4) 培养期间培养基应无过度消耗或严重变黄现象，转染前一天需更换新鲜培养基。

4. 关于试剂盒中阳性对照的使用建议

需设置阳性对照组（EGFP mRNA或EGFP pDNA），最小体系即可，节省细胞和试剂，以检测实验操作和试剂的有效性。

5. 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。悬浮转染放大体系，等比放大试剂及细胞量。

6. 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。

7. 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，水平转子离心后移液应避免枪头紧贴底部，一次性吸弃上清，保留少量液体。

8. 转染体系扩大是否影响转染效率

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。

9. 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，也可当天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。

