

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基于内院蛋白凝聚体的核酸转染试剂，专为原代细胞设计，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℃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 Max转染试剂盒（PT02）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。
- 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、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孔板体系为例）

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（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）
1.2 加入Reagent B（PT02）并混匀	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 ^a
1.3加入Reagent C（PT02）混匀	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）	
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 5×10 ⁶ – 1×10 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（1×10 ⁵ – 2×10 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℃孵育15-30分钟 ^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, 孵育时间可根据不同细胞类型进行适当调整。原代细胞，孵育时间建议不超过 45 分钟。

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。

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			
1 配置ProteanFect转染体系	mRNA ^a	siRNA ^b	pDNA ^c
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20 pmol siRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A（PT02）中加入 0.4 μg pDNA，充分混匀
1.2 加入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）	往上述混合物中加入8 μL Reagent C（PT02）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。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	用量		
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	mRNA	siRNA	DNA
	96孔	0.5 μg	20 pmol	0.4 μg
	48孔	1 μg	40 pmol	0.8μg
	24孔	2.5 μg	100 pmol	2 μg
	12孔	7.5 μg	300 pmol	6 μg
	6孔	10 μg	400 pmol	8 μg
Reagent B (PT02)	96孔	0.7 μL		
	48孔	1.4 μL		
	24孔	3.5 μL		
	12孔	10.5 μL		
	6孔	14 μL		
Reagent C (PT02)	96孔	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)		

ProteanFect Max 转染试剂盒使用说明书

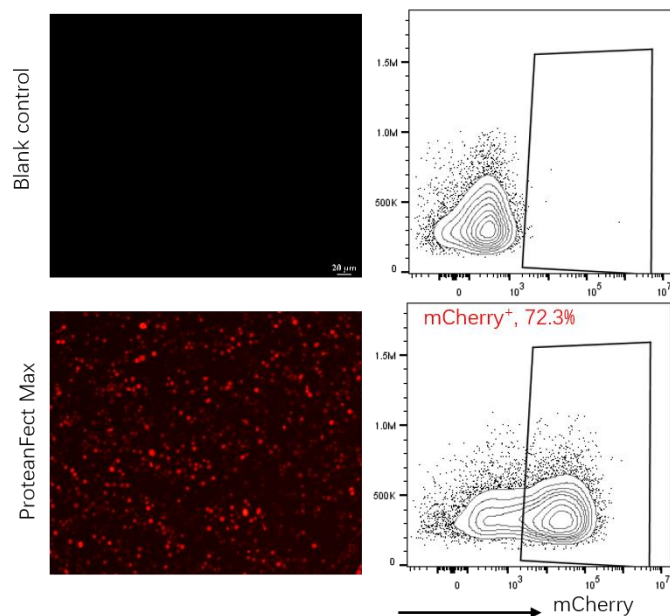
ProteanFect Max (PT02) 已成功转染的细胞

目前使用ProteanFect Max (PT02) 可成功转染以下所列原代细胞类型，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
人原代细胞	人原代T细胞	mRNA, siRNA
	人原代NK细胞	mRNA, siRNA
	人原代B细胞	mRNA, siRNA
	人原代单核细胞	mRNA, siRNA
	人原代CD34+造血干细胞	mRNA, siRNA
	UC-MSCs (脐带间充质干细胞)	mRNA, siRNA
	iPSCs (诱导多能干细胞)	pDNA, mRNA, siRNA
	人皮肤成纤维细胞	pDNA, mRNA, siRNA
其他原代细胞	KSL (小鼠造血干细胞)	mRNA, siRNA
	小鼠原代B细胞	mRNA, siRNA
	小鼠原代软骨细胞	pDNA, 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
	猪原代巨噬细胞	mRNA, siRNA
	牛原代成纤维细胞	mRNA, siRNA
	鸡原始生殖细胞	mRNA, siRNA
	罗氏沼虾血细胞	mRNA, siRNA
	大黄鱼原代间充质干细胞	mRNA, siRNA

数据分享

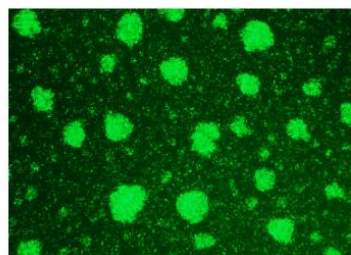
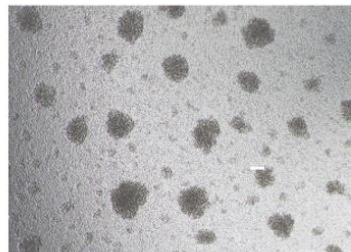
案例1：使用ProteanFect Max成功转染人CD34⁺造血干细胞



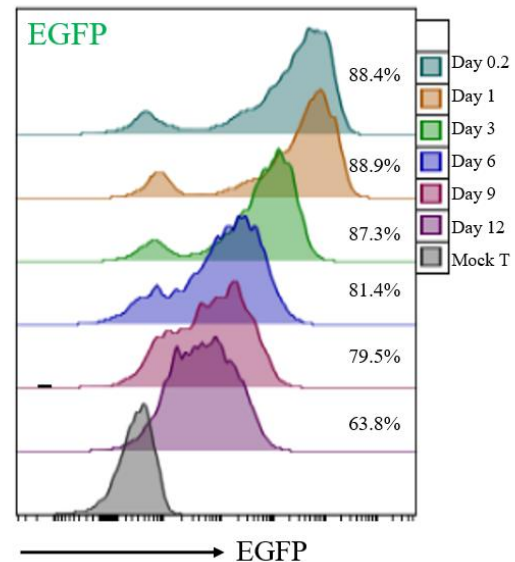
- 细胞类型：人CD34⁺造血干细胞
- 转染核酸类型：mCherry mRNA
- 检测时间：转染后24小时

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

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45分钟。**2) 提升Reagent C用量**：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。

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. 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）。

5. 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。

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 4×10^3 /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。

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，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。

9. 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。

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。

