

HighGene plus Transfection reagent 说明书

货号: RM09014

规格: 1mL

◆ 1. 产品描述

HighGene 转染试剂是一种新型高效的阳离子聚合物。它可以与核酸（包括质粒、siRNA、寡聚核苷酸）相互作用形成一种复合物将核酸转运到真核细胞内，适用于大部分真核细胞的细胞转染。

◆ 2. 产品优势

(1) 转染效率较高。

ABclonal 选取常见细胞系，如 293T、HCT116、C6 分别使用 HighGene 转染试剂和市面常规转染试剂产品进行细胞转染，实验结果如图 1 所示。

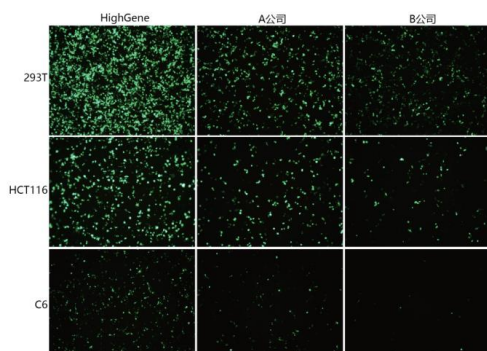


图 1: 在 6 孔细胞板中分别接种 293T、HCT116、C6 三种细胞，细胞密度为 80%左右，分别使用 HighGene 转染试剂和两种市面同类产品进行细胞转染，GFP 真核表达质粒用量均为 2μg，细胞转染 48 小时后，在荧光显微镜下观察并拍照。转染过程不受血清和抗生素的影响。

(2) 批次稳定，实验重复性好。

ABclonal 选取 293T 和 HeLa 细胞系，使用 HighGene 转染试剂进行细胞转染，实验结果如图 2 所示。

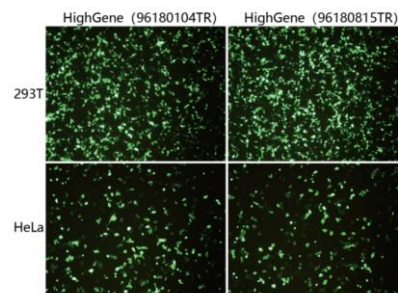


图 2: 在 6 孔细胞板中分别接种 293T 和 HeLa 细胞，细胞密度为 70%左右，细胞转染时，GFP 真核表达质粒用量为 2μg，两种不同批次的 HighGene 转染试剂用量均为 4μL，细胞转染 24h 后，在荧光显微镜下观察并拍照。

(3) 对于贴壁细胞和悬浮细胞均适用。

HighGene 转染试剂不仅适用于贴壁细胞，而且对悬浮细胞也有较好的转染效果。ABclonal 选取 HEK293F 和 Sf9 悬浮细胞系进行了测试，实验结果如图 3 所示。

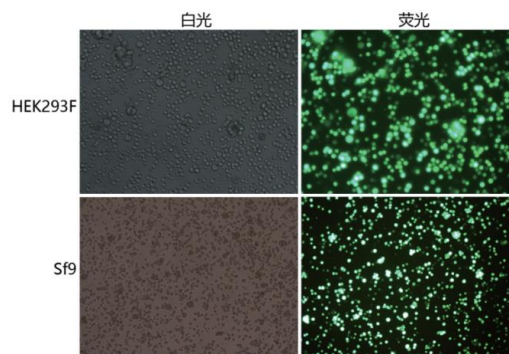


图 3: 在 125mL 摇瓶中接种 30mL 密度为 1×10^6 个/mL HEK293F 或 Sf9 悬浮细胞，细胞转染时，GFP 真核表达质粒用量为 30μg，HighGene 转染试剂用量为 60μL，细胞转染 48 小时后，在荧光显微镜下观察并拍照。

(4) 无明显细胞毒性。

ABclonal 选取 293T、HeLa 和 HCT116 细胞系进行细胞转染，不更换细胞培养液，连续培养 1~2 天，测试细胞活性，实验结果如图 4 所示。

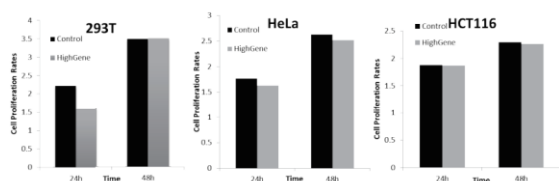


图 4: 在 96 孔板中接种 HEK293T、HeLa、HCT116 细胞, 每孔接种 5000 个细胞, 细胞密度为 50%左右, 5 个复孔, 使用 2 μ L/mL 剂量 HighGene 转染试剂分别处理细胞 24h 和 48h, 然后使用 CCK8 试剂检测细胞的活性。

(5) 适用于 siRNA 细胞转染。

ABclonal 选取 293T 和 HeLa 细胞系进行 siRNA 转染测试, 分别转染了 Cy3 荧光标记 siRNA 和 YAP1 siRNA, 实验结果如图 5 所示。

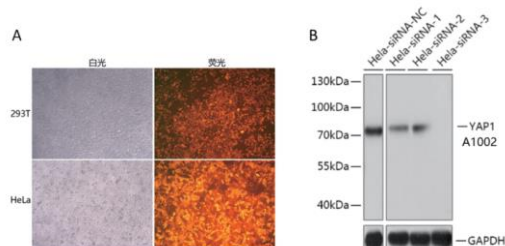


图 5: 在 6 孔细胞板中接种 293T 和 HeLa 细胞, 细胞密度为 80%左右, 细胞转染时, Cy3 siRNA 用量为 100pmol, HighGene 转染试剂用量为 5 μ L, 或 YAP1 siRNA 用量为 200pmol, HighGene 转染试剂用量为 10 μ L, 细胞转染 24 小时后, 在荧光显微镜下观察并拍照 (A), 或制备细胞样本进行 WB 实验 (B)。(备注: WB 实验选用的 YAP1 抗体是来自 ABclonal 品牌, 货号为: A1002。)

(6) HighGene 转染试剂适用于质粒共转染。

ABclonal 选取 293T 细胞系进行质粒共转染测试, 同时转染绿色荧光蛋白质粒和红色荧光蛋白质粒, 实验结果如图 6 所示。

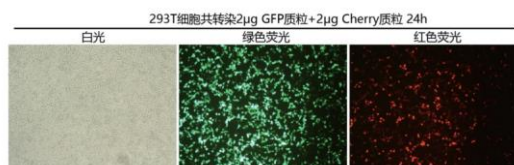


图 6: 在 6 孔细胞板中接种 293T 细胞, 细胞密度为 80%, 细胞转染时, GFP 真核表达质粒用量为 2 μ g, Cherry 真核表达质粒用量为 2 μ g, HighGene 转染试剂用量为 8 μ L, 细胞转染 24h 后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

(7) HighGene 转染试剂适用于慢病毒包装及感染实验。

ABclonal 选取 293T 细胞系进行慢病毒包装, 然后用慢病毒液感染 A549 细胞系, 实验结果如图 7 所示。

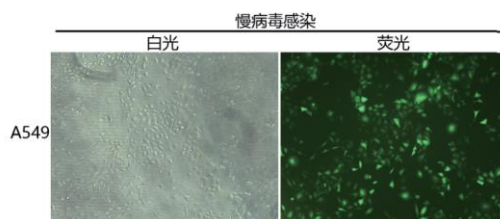


图 7: 在 10cm 培养皿中接种 293T 细胞, 细胞密度为 80%, 细胞转染慢病毒包装质粒及外源 GFP 表达质粒, 48 小时后收获病毒液, 取 200uL 慢病毒液感染 6 孔板中的 A549 细胞, 48 小时后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

◆ 3. 储存条件

2-8 $^{\circ}$ C 储存, 保质期两年。

◆ 4. HighGene 使用说明

4.1 贴壁细胞转染 (以 293T 细胞为例)

(1) 第一天, 将 293T 细胞接种到 6 孔板中, 细胞密度控制在 70%-90%为宜; (注: 根据实验需求, 可以选择不同的细胞培养装置, 细胞接种数量和所需培养液体积详见附表 1)

(2) 第二天, 先取 4 μ g 质粒加入到盛有 200 μ L 无血清 DMEM 基础培养基离心管中, 吹打混合均匀, 然后加入 8 μ L HighGene 转染试剂, 吹打混合; (注: MEM、1640、F12 等基础培养基均可用于 HighGene 转染试剂的溶剂, 不同的细胞培养装置所需质粒的量和 HighGene 转染试剂剂量详见附表 2)

(3) 将 200 μ L 质粒/HighGene 转染试剂复合物均匀滴加到 6 孔细胞培养板孔中, 轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布; **(注: 6 孔板中为完全培养基, 轻轻晃动细胞培养板即可, 切勿剧烈摇动细胞培养板, 以免细胞脱落漂浮!)**

(4) 细胞转染 4-6 小时后, 半量更换新鲜完全培养基;
(注: 半量换液时, 吸弃一半原有完全培养基, 补加一半新鲜完全培养基)

(5) 细胞转染 24~48 小时后, 即可使用适当方式进行检测, 如 RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等, 或加入相应筛选药物 (G418 或 Puromycin) 可获得稳定细胞株。

4.2 悬浮细胞转染 (以 HEK293F 细胞为例)

(1) 第一天, 在 125mL 摇瓶中接种 30mL 密度为 1×10^6 个/mL HEK293F 悬浮细胞;

(2) 第二天, 先取 30 μ g 质粒加入到盛有 3 mL 无血清 DMEM 基础培养基离心管中, 吹打混合均匀, 然后加入 60 μ L HighGene 转染试剂, 吹打混合均匀;

(3) 将 3mL 质粒/HighGene 转染试剂复合物均匀滴加到盛有 30mL HEK293F 悬浮细胞的 125mL 摇瓶中, 轻轻摇动摇瓶使其混合均匀;

(4) 细胞转染 3~5 天后, 根据蛋白表达的情况 (胞内表达或分泌表达), 收集细胞或细胞培养上清, 进行后续蛋白纯化操作。

4.3 siRNA 细胞转染 (以 HeLa 细胞为例)

(1) 第一天, 将 HeLa 细胞接种到 6 孔板中, 细胞密度控制在 70%-90% 为宜;

(2) 第二天, 先取 100pmol siRNA 加入到盛有 200 μ L 无血清 DMEM 基础培养基离心管中, 吹打混合均匀, 然后加入 5 μ L HighGene 转染试剂, 吹打混合均匀; **(注: 不同的细胞培养装置所需 siRNA 的量和 HighGene 转染试剂**

剂量详见附表 3)

(3) 将 200 μ L 质粒/HighGene 转染试剂复合物均匀滴加到 6 孔细胞培养板孔中, 轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布; **(注: 6 孔板中为完全培养基, 轻轻晃动细胞培养板即可, 切勿剧烈摇动细胞培养板, 以免细胞脱落漂浮!)**

(4) 细胞转染 4-6 小时后, 半量更换新鲜完全培养基;
(注: 半量换液时, 吸弃一半原有完全培养基, 补加一半新鲜完全培养基);

(5) 细胞转染 24-48 小时后, 即可使用适当方式进行检测, 如 RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等。

4.4 慢病毒包装及感染 (以 A549 细胞为例)

(1) 第一天, 将 293T 细胞接种到 10cm 培养皿中, 细胞密度控制在 70%-90% 为宜;

(2) 第二天, 先分别取慢病毒包装质粒 pMD2G 4 μ g, 慢病毒包装质粒 pSPAX2 3 μ g, 表达质粒 6 μ g 加入到盛有 1mL 无血清 DMEM 基础培养基离心管中, 吹打混合均匀, 然后加入 26 μ L HighGene 转染试剂, 吹打混合均匀;

(3) 将 1mL 质粒/HighGene 转染试剂复合物均匀滴加到 10cm 培养皿中, 轻轻晃动细胞培养皿使其均匀分布;

(4) 细胞转染 4-6 小时后, 半量更换新鲜完全培养基;

(5) 细胞转染 48 小时后, 常规离心收集细胞培养上清液, 用 0.45 μ m 滤器过滤细胞上清液, 200 μ L 分装后 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用;

(6) 将待感染的 A549 接种到 6 孔板中, 细胞密度控制在 70%-90% 为宜;

(7) 细胞贴壁后, 将 200 μ L 慢病毒液均匀滴加到 6 孔板中, 轻轻晃动细胞培养板使其均匀分布;

(8) 慢病毒感染 18 小时后, 更换新鲜完全培养基;

(9) 慢病毒感染 48 小时后, 即可使用适当方式进行

检测，如 RT-PCR、Western、ELISA、报告基因等，或加入

相应筛选药物（G418 或 Puromycin）可获得稳定表达细胞

株。

◆ 5. 注意事项

（1）转染前细胞应处于良好的生长状态，以对数生长期为佳，推荐细胞传代后 12-24 小时内、细胞密度为 70-90% 时进行转染；

（2）使用高质量的质粒有利于获得较高的转染效率，推荐使用无内毒素质粒抽提试剂盒抽提质粒，A260/A280 比值为 1.8 ~ 2.0，质粒浓度在 300ng/μL 以上；

（3）在配制转染试剂与质粒复合物时，需使用无血清、无抗生素的基础培养基作为溶剂，细胞培养孔中的完全培养基不影响细胞转染效率；

（4）在细胞转染实验中，根据细胞转染效率可适当调整质粒与转染试剂的用量比例，一般质粒的量（μg）与 HighGene 转染试剂剂量（μL）使用比例在 1:1 ~ 1:4 之间，**推荐比例为 1:2**；对于毒性比较敏感的细胞，建议转染 4-6 小时后，半量更换新鲜完全培养基；转染试剂如遇沉淀，轻轻摇动管身，至沉淀溶解即可使用；

（5）建议转染试剂复合物制备后室温静置 15-20min，再进行细胞转染；

（6）本产品仅限于科学研究，不得用于临床诊断和治疗。

附表 1

常用细胞培养装置转染前一天细胞接种的推荐数量和培养体积

细胞培养装置	接种细胞数量	细胞培养液体积
96 孔板	(1-3)×10 ⁴	0.1-0.2mL
24 孔板	(1-3)×10 ⁵	0.5-1mL
12 孔板	(2-4)×10 ⁵	1-2mL
6 孔板	(3-5)×10 ⁵	2-3mL
60mm 培养皿	(5-10)×10 ⁵	3-5mL
100mm 培养皿	(1-3)×10 ⁶	8-10mL
125ml 摇瓶	(1.5-2.5)×10 ⁷	30-35mL
500ml 摇瓶	(6-10)×10 ⁷	120-140mL
1000ml 摇瓶	(1.2-2)×10 ⁸	240-280mL

附表 2

常用细胞培养装置细胞转染时，各组分推荐使用剂量（质粒

细胞转染）

细胞培养装置	质粒（μg）	HighGene 转染试剂（μL）	基础培养基（μL）
96 孔板	0.2	0.4	10
24 孔板	1	2	50
12 孔板	2	4	100
6 孔板	2-4	4-8	200
60mm 培养皿	3-5	6-10	400
100mm 培养皿	5-10	10-20	1000
125mL 摇瓶	30-35	60-70	3000
500mL 摇瓶	120-140	240-280	12000
1000mL 摇瓶	240-280	480-560	24000

附表 3 常用细胞培养装置细胞转染时，各组分推荐使用剂量

（siRNA 细胞转染）

细胞培养装置	siRNA（pmol）	HighGene 转染试剂（μL）	基础培养基（μL）
96 孔板	4	0.2	10
24 孔板	20	1	50
12 孔板	40	2	100
6 孔板	100	5	200
60mm 培养皿	200	10	400
100mm 培养皿	600	30	1000