



Effectene® Transfection Reagent(货号: 301425) 快速操作手册

2012-5-28

Luly King

Effectene 操作前注意事项

本操作手册系内部员工翻译，仅供参考，如有疑问，请参考英文原版Handbook，并立即联系我们！

收到货后，请即储存于2-8 摄氏度下！

使用前须知：

- ❖ 适用于贴壁细胞的瞬时或稳定转染，以6孔板的形式。若转染使用其他培养板的形式，请参照表1的用量。
- ❖ 转染期间，细胞应保持最佳的生理形态。
- ❖ 质粒DNA的质量对转染参数有很重要的影响，比如转染效率、重复性以及毒性。对于所有的细胞系，为得到重复性高、最佳的结果，建议纯化DNA时使用EndoFree Plasmid Kit(货号：12362和12381)，此试剂盒可快速有效除去细菌内毒素，从而保证最佳的转染结果。
- ❖ 转染试剂与DNA的比例要求，取决于细胞系和目标基因。表2提供了转染试剂与DNA的比例优化参照。DNA与Enhancer（试剂盒内提供）的比例不应改变。



- 1、转染前一天，6孔板每孔接种 $0.9-4 \times 10^5$ 的细胞（取决于细胞系类型），加入1.6 ml 合适的生长培养基，包含血清和抗生素。
- 2、在正常的生长条件下孵育细胞（一般为37°C和5% CO₂）。转染当天，细胞密度应达到40–80%。
- 3、转染当天，稀释0.4µg DNA（DNA最小浓度为0.1 µg/µl）将其溶解在TE buffer中调节pH到7-8，加入EC buffer至终体积为100 µl。再加入3.2 µl Enhancer，用涡旋仪混匀1 s。

重要：要始终保持DNA与Enhancer的比例（1:8）恒定。

- 4、室温下（15–25°C）孵育2-5 min，然后短暂离心，将试管顶部的液滴离下来。
- 5、加10 µl Effectene 转染试剂到 DNA与Enhancer （1:8）混合物中。

注意：没有必要在整个操作中保持转染试剂在冰上，室温下放置5-10分钟不会影响其稳定性。

- 6、室温下孵育样本5-10 min，以形成转染复合物。

- 7、在复合物形成期间，轻轻得吸出培养板中的生长培养基，用3 ml PBS清洗细胞1次加入1.6 ml 新鲜培养基（可包含血清和抗生素）。
- 8、将 600 μ l 培养基（可包含血清和抗生素）加到含有转染复合物的试管中，用吸管上下混匀2次，然后立即将转录复合物逐滴加入6孔板的细胞中。轻轻得旋转6孔板确保转染复合物均匀分布。
- 9、将含有转染复合物的细胞在正常生长条件下孵育适当时间，使转进去的目的基因得到表达，孵育时间由预试验以及目的基因来定。

可选：一般情况下，除去转染复合物是没有必要的。但是，如果观察到有毒性，可在6-18个小时后除去 Effectene-DNA 复合物，用PBS清洗细胞，再添加3 ml 新鲜培养基。
- 10、**瞬时转染：**检测转染的目的基因表达情况。一般转染 β -gal（ β -半乳糖苷）或 cat（氯霉素乙酰转移酶）报告基因载体的细胞可在转染24-48后检测到基因最高水平表达。

稳定转染：转染24-48 h 后，将细胞接种（比例：**1:5-1:10**）到适当的选择性培养基中，保持细胞在选择性培养基中生长，直到克隆斑形成。

注意：我们推荐结合细胞系和选用的抗生素建立一个致死曲线（剂量效应曲线）。值得注意的一点是，致死曲线也会受到细胞密度的影响。尽量将刚转染的细胞用正常生长培养基培养（例如，不含选择性药物），孵育**1-2 d**之后再换成选择性培养基。

Table 2. Starting points for optimizing transfection of adherent cell lines in 6-well plates

Amount of DNA	0.2 µg	0.2 µg	0.2 µg
Volume of Effectene Reagent	2 µl	5 µl	10 µl
Volume of Enhancer	1.6 µl	1.6 µl	1.6 µl
Amount of DNA	0.4 µg	0.4 µg	0.4 µg
Volume of Effectene Reagent	4 µl	10 µl	20 µl
Volume of Enhancer	3.2 µl	3.2 µl	3.2 µl
Amount of DNA	0.8 µg	0.8 µg	0.8 µg
Volume of Effectene Reagent	8 µl	20 µl	40 µl
Volume of Enhancer	6.4 µl	6.4 µl	6.4 µl

Table 1. Suggested volumes for transfection using Effectene Transfection Reagent with various multiwell formats

Step	1	3	3	3	5	8
Format	Number of seed cells	DNA (μg)	Enhancer (μl)	DNA-Enhancer mixture (μl)	Effectene Transfection Reagent (μl)	Medium added to complex (ml)
96-well plate	$0.5-2 \times 10^4$	0.1	0.8	30	2.5*	0
48-well plate	$1-4 \times 10^4$	0.15	1.2	50	4*	200
24-well plate	$2-8 \times 10^4$	0.2	1.6	60	5	350
12-well plate	$0.4-2 \times 10^5$	0.3	2.4	75	6	400
6-well plate	$0.9-4 \times 10^5$	0.4	3.2	100	10	600
60 mm dish	$2-8 \times 10^5$	1.0	8.0	150	25	1000

* If transfections are performed in 96- or 48-well plates, dilute Effectene Transfection Reagent with Buffer EC to a total volume of 20 μl or 50 μl , respectively, before addition to the diluted DNA-Enhancer mixture prepared in step 3.