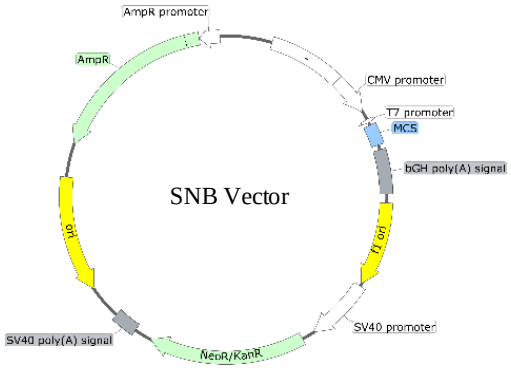
过表达质粒使用说明书

产品简介



载体图谱示例

主要元件：

CMV promoter：CMV 启动子,可启动插入至多克隆位点处的基因的转录；

AmpR：氨苄青霉素抗性基因，用于含质粒宿主菌筛选；　　*NeoR*：

新霉素抗性基因；

KanR: 卡那霉素抗性基因；

EGFP：增强型绿色荧光蛋白，可用荧光显微镜等荧光检测系统或流式细胞仪等检测转染成功的哺乳动物细胞；

产品内容

质粒	体积	数量	总含量
SNB-pcDNA序列过表达质粒（纯化质粒）	100 μl	1tube	100 μg
SNB -pcDNA序列过表达质粒（甘油菌）	100 μl	1tube	100 μg
运输条件：质粒和菌液为冰袋运输。 储存条件：质粒为-20℃或者更低的温度保存，菌液部分长期保存建议为-80℃。			

注：1）根据项目构建的具体质粒而不同；

2）质粒可以直接用来实验，甘油菌可以进行质粒抽提。

3）本司提供的过表达质粒均为去内毒素后的质粒，可以直接搭配转染试剂用于细胞转染实验

以赛恩宝生物的SNB-DNA Transfection转染试剂（转染试剂组成见表1）转染质粒（6孔板）为例，其他规格容器的试剂用量请参考表2/4，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

赛恩宝生物的SNB-DNA Transfection Kit转染试剂介绍

SNB-DNA Transfection Kit转染试剂是一种专门用于DNA质粒的高效低毒转染试剂，极具生物相容性，转染效率优异，细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便，快捷，高效。

SNB-DNA Transfection Kit组成	100ul	0.5ml	1ml
SNB-DNA Reagent	100ul	0.5ml	1ml

表1 SNB-DNA Transfection Kit转染试剂成分组成及规格

注）SNB-DNA Transfection Kit转染试剂为常温运输，长期储存为4℃保存，可稳定保存一年。

第一部分：普通细胞转染质粒的通用protocol

存储：SNB DNA体外转染试剂在4°C 可稳定保存12个月。此物品在常温下运输。

步骤一. 细胞接种：

细胞应在转染前18到24小时接种，以便在转染时单层细胞密度达到最佳的70~80%。在转染前30~60分钟，向每个孔中加入含血清和抗生素的完全培养基。

注意：高血清含量（>5%）与抗生素通常不会对转染效率产生抑制作用。对于某些特定的细胞，最大的转染效率是在含有血清和抗生素的情况下观察到的。我们建议最初使用含血清/抗生素的完全培养基。

步骤二. SNB-DNA Reagent ~DNA复合物的制备和转染步骤

对于不同的细胞类型，SNB-DNA Reagent（μL）：DNA（μg）的最佳比例约为3：1，对于较难转染的细胞可以调整为SNB-DNA Reagent（μL）：DNA（μg）的比例约为3-4：1. 我们建议以SNB-DNA Reagent（μL）：DNA（μg） 比例为3：1作为起点，通常可以在不引起细胞毒性的情况下获得令人满意的转染效率。为确保SNB-DNA Reagent/DNA复合物颗粒的最佳大小，**稀释DNA和SNB-DNA Reagent的稀释液的选择至关重要。初次尝试优先建**

议尝试不含血清，不含蛋白的高糖DMEM培养基来稀释DNA和SNB-DNA Reagent试剂。您应该会得到满意的转染效率。（如未能得到较高的转染效率，你可以尝试更换培养该实验细胞所用的培养基，但培养基不可含血清，蛋白）。请不要使用未知成分的培养基来稀释DNA和QM-DNA Reagent，**一定不能用Opti-MEM™来稀释DNA和SNB-DNA Reagent**，会极大的降低细胞的转染效率，Opti-MEM™可能含有少量的血清，导致转染效率的大幅降低。

表2. 不同培养皿的推荐转染用量

Culture Dish	Culture Medium（ml）	Plasmid DNA（ug）	Diluent Volume（ul）	SNB-DNA Reagent（ul）
48well plate	0.3	0.25	2x15	0.75
12well plate	0.75	0.75	2x38	2.25
6-well plate	1.0	1.0	2x50	3.0
35mm dish	1.0	1.0	2x50	3.0
60mm dish	2.8	2.5	2x100	7.5
10cm dish	5.0	5.0	2x250	15

注：1）实验前请确认细胞的转染率，只有在比较高的转染率情况下才能得到有效的基因过表达效果；

2）SNB-pcDNA-EGFP等带荧光标签的质粒可在转染后用荧光显微镜等荧光检测系统或流式细胞仪等检测细胞转染率；

3）一般需以基因表达质粒空载组作为对照组方能比较分析基因过表达产生的效果。

以下步骤适用于在6孔板中进行转染（其他培养孔板的转染用量请参考表2）。对于大多数贴壁细胞，标准protocol中给出了最佳转染条件。

-转染前30~60分钟，更换含血清和抗生素的完全培养基（1ml/孔）。

-将1~2ug的DNA稀释到50ul的无血清高糖DMEM中。轻轻振荡并短暂离心，使液滴沉到管底。

-将3~6ul SNB-DNA Reagent试剂（Ver.II）稀释到50ul无血清高糖DMEM中。上下移液3~4次混匀。

注意:请勿使用Opti-MEM稀释SNB-DNA Reagent试剂和DNA，它会破坏转染复合物。

-立即将稀释后的SNB-DNA Reagent试剂加入到稀释后的DNA溶液中 (**注意:不要反向混合溶液**)

-立即上下移液3~4次混匀或旋涡至混匀后，室温孵育约15分钟直至形成SNB-DNA Reagent ~DNA复合物。

注意: SNB-DNA Reagent ~DNA复合物保存时间不要超过20分钟。

- 将100ul的SNB-DNA Reagent ~DNA复合物滴加到对应的6孔板的的细胞培养基中，并轻轻旋转混匀。

- 在转染后12~18小时，可更换含有血清/抗生素的完全培养基（去除掉未转染进去细胞里面的SNB-DNA Reagent ~DNA转染复合物）。对于较敏感的细胞，为了降低细胞毒性，转染后5-6小时即可更换完全培养基。

- 在转染后一般24至96小时检测转染效率（具体依据后续检测的指标和类型来确定）。

第二部分. 难转染细胞转染质粒的转染protocol

第一步：细胞接种：细胞培养至少24h后再进行转染，以使在转染时单层细胞密度达到最佳的95~100%的密度。

表3. 不同培养器皿中每孔最佳细胞数的指导原则

Culture Dish	Surface Area（cm^2）	Optimal Cell Number
96well plate	0.3	$0.31x10^5$
48well plate	1.0	$0.11x10^6$
24-well plate	1.9	$0.24x10^6$
12-well plate	3.5	$0.44x10^6$
6-well plate	9.6	$1.2x10^6$
60mm dish	21	$2.7x10^6$
10cm dish	58	$7.3x10^6$

表4. 不同培养容器的转染推荐量

Culture Dish	Culture Medium（ml）	Plasmid DNA（ug）	Transfection Complex Volume（ul）	SNB-DNA Reagent（ul）
96well plate	0.1	0.2	2x10	0.8
48well plate	0.3	0.5	2x20	2.0
24-well plate	0.5	1.0	2x50	4.0
6-well plate	1.0	2.0	2x100	8.0
60mm dish	2.8	5.0	2x250	20
10cm dish	5.0	8	2x500	32

第二步：细胞悬液的制备：以下protocol适用于6孔板，较难转染的哺乳动物细胞，参考表3以获取每个培养器表面积/每孔的最佳细胞数量。哺乳动物细胞的最佳转染条件在下面的标准protocol中描述。

（1） 使用胰蛋白酶（含EDTA）消化细胞，并用完全培养基终止消化。

注意：对于难消化的细胞可以放置在37°C 下5~15min以促进消化，对于一些无法使用胰蛋白酶消化（如原代神经元）的原代细胞，直接进行第2步，跳过胰蛋白酶消化步骤，将新鲜制备的原代细胞沉淀与转染复合物一起孵育。

（2） 取适量的细胞悬液进行细胞计数。

（3） 在室温下，150xg离心10min，每孔接种$1.2x10^6$个细胞至6孔板中。

（4） 使用移液管完全去除上清液，以便细胞沉淀上没有残留的培养基。

第三步：转染复合物的制备和应用

对于难以转染的哺乳动物细胞，SNB-DNA Reagent（μL）：DNA（μg）的最佳比例为4：1。为确保复合物颗粒的最佳大小，建议使用无血清DMEM高糖稀释DNA和SNB-DNA Reagent试剂。以下protocol适用于6孔板的转染（其他培养孔板的转染请参考表4）。

（1） 对于6孔板每孔，将2 μg的DNA稀释到100 μl无血清高糖DMEM中。轻轻振荡混匀并短暂离心，使液滴沉到管底。

（2） 对于6孔板每孔，将8 μl的SNB-DNA Reagent试剂（Ver. II）稀释到100 μl无血清高糖DMEM中。轻轻振荡并短暂离心。

（3） 立刻将稀释后的SNB-DNA Reagent试剂一次性加入稀释后的DNA溶液中。立即用移液器3~4次上下混匀或轻轻振荡混合，然后在室温下孵育约15分钟，以便形成转染复合物。

注意: SNB-DNA Reagent ~DNA复合物保存时间不要超过15分钟。

（4） 立即将第二步制备的细胞沉淀轻轻悬浮于200 μl的转染复合物中，并在37°C下孵育20分钟。孵育结束后，向细胞中加入2.0 ml预热的完全细胞培养基，并将其转移至6孔板每孔中。

（5） 在转染5~12h后，轻轻地移除含有转染复合物的培养基，并更换完全培养基。在转染后24h-96h内检测转染效率。

细胞处理: 按实验设计对细胞进行分组并处理。

基因表达效果检测

质粒转染24-72小时后可提取RNA进行目的基因的qRT-PCR检测，以对照质粒组比较计算基因的过表达程度，当表达的基因为蛋白编码基因时，可在质粒转染 48-96小时后提取蛋白进行Western Blot检测蛋白过表达程度。

其它检测: 根据实验设计进行细胞功能或其它指标检测。

使用方法

甘油菌: 甘油菌用于质粒的扩大提取。

涂板: 将甘油菌于含氨苄青霉素的LB固体培养基上涂板或划线。

摇菌: 挑取单克隆，于含氨苄青霉素的LB液体培养基中摇菌扩培，根据后续实验所需质粒量选择合适的培养基量。

制备甘油菌: 取一定量的菌液，加入甘油，使甘油终浓度为30%，分装，每100μl－300μl甘油菌1 管，-20°C至-80 °C保存。

质粒提取: 使用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒，该菌为 DH5α 大肠杆菌，请根据质粒提取试剂盒中的 DH5α 大肠杆菌样品提取方法提取。 备注：必要时可选择对质粒进行测序重新鉴定

常见问题

1. 转染基因表达质粒后， 能达到多少倍的基因过表达效果？

答：具体过表达倍数跟细胞性质、转染率、细胞中目的基因的本底表达丰度等有关，一般转染率比较好的情况且基因本底表达水平不高 的，目的基因的过表达倍数一般可达数十倍至上千倍上万倍。

2. 没有过表达效果或过表达程度很低，可能是什么原因？

答：1）可能是转染不成功，需进行转染率检测，若是 QM-EGFP-pcDNA系列骨架的表达载体，可在转染 24-72 小时后使用荧光显微镜等荧光检测系统或流式细胞仪等检测细胞转染率；

2） 质粒质量可能存在问题，可进行质粒浓度检测及琼脂糖凝胶电泳确认质粒质量是否符合转染实验的要求；

3） 检测实验有问题， 如扩增效率，抗体特异性等存在问题；基因在细胞中的本底表达丰度很高。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源， Synbio Co. Ltd, shanghai, China，上海赛恩宝生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper，联系销售或者本公司，可获取对应的科研奖励金。