

### Labfect5000 transfection reagent

货号：T2123

存储条件：4-8°C保存，有效期一年。每次使用前请先将本品轻轻混匀。

#### 产品组分：

组分	LabFectPM Prime	Trans buffer S	溶液 A
T2123-0.5 ml	0.5 ml	20 ml	1 ml
T2123-1 ml	1.0 ml	40 ml	2 ml
T2123-1.5 ml	1.5 ml	60 ml	3 ml

#### 产品简介：

LabFect5000 是一款通用型核酸转染试剂，适用于将质粒 DNA 转染入哺乳动物细胞。LabFect5000 具有非常优异的转染性能，可转染绝大多数贴壁细胞和部分悬浮细胞。LabFect5000既可高效转染质粒DNA分子，也可高效转染siRNA、miRNA、inhibitor等小分子核酸。同时也可高效转染绝大多数贴壁细胞和悬浮细胞。在部分贴壁细胞中，LabFect5000 Prime 质粒DNA的转染阳性率可高达90%以上，Fam-siRNA的转染阳性率可高达95%以上。即使对于较难转染的细胞，如神经细胞HT-22、N2A、神经胶质细胞BV2、巨噬细胞Raw264.7、白血病细胞K562、结肠癌细胞HCT116、SW480、胃癌细胞AGS等也有较为显著的转染效果。

LabFect5000采用可降解材料配制，对细胞的毒性很低，转染后24小时细胞几乎无明显死亡。本试剂使用也非常方便，先将转染试剂与DNA或siRNA混合，再将该转染复合物直接加入培养细胞中，血清不影响其转染效果，不必再刻意添加或更换培养液，操作十分简单。

#### LabFect5000 转染试剂的特点：

可高效转染多种贴壁细胞和部分悬浮细胞等，在部分贴壁细胞中的质粒DNA转染阳性率可高达90%以上，Fam-siRNA的转染阳性率可高达95%左右。

极低的细胞毒性：使用可降解生物材料，细胞毒性低，转染细胞死亡率不到10%，大大降低了因细胞毒性对实验结果的影响。

#### 转染注意事项：

- 首次使用，建议进行优化实验，以摸索最优搭配比例。如24孔培养板，每孔质粒用量 0.8ug，转染试剂用量可选择0.8ul、1.0ul、1.2ul 进行优化。24孔板 siRNA 转染，LabFect5000 Prime 用量1ul， siRNA用量可选24pmol、36pmol、48pmol进行优化。
- 进行质粒转染，接种细胞的数量应以确保转染时的细胞汇合度在80-90%为准，过高或过低均会影响转染效率。进行siRNA转染，接种细胞的数量应以确保转染时的细胞汇合度在40-60%为准。
- 溶液A仅用于质粒转染，RNA或siRNA转染不需加入
- 注意质粒转染和siRNA转染时对细胞密度要求的差异，不要混用同一条件。
- 如果需要质粒稳转，请在转染24-48h后加入筛选培养基
- 如要转染多个细胞孔，可在同一管内配制转染复合物，再分到各个细胞孔。

#### 操作步骤：

##### 一、质粒DNA转染（以24孔板转染为例）：

###### 细胞接种：

1. 转染前一天对细胞进行转接，每孔接种 $0.8-1.5 \times 10^5$ 个细胞，使转染时细胞密度为85%左右，且生长良好（非常重要）；

2. 最好在转染开始之前更换新鲜的含血清培养基，以防转染后孵育阶段细胞密度太大、营养不足导致细胞死亡。

###### DNA转染复合物制备(该步完成后应立即进行转染)：

1. 在1.5 ml无菌离心管中加入40 $\mu$ l Trans buffer S，再加入1uL转染试剂，其它规格培养板用量见附表，用移液器轻轻混匀。

2. 向上述离心管中加入2uL溶液A，轻轻混匀，再加入0.8ug DNA，用移液器再次轻轻混匀，室温静置15分钟。其它规格培养板溶液A和DNA具体用量见附表。

注：离心管最好使用洁净的聚丙烯离心管。

###### 转染：

1. 将步骤B制备的转染复合物滴加至细胞培养孔中，边加边轻轻晃动培养板以使复合物均匀分布，再立即将培养板转入培养箱继续培养。

2. 培养24小时后即可观察，但最佳观察时间为36-48小时。如果需要，细胞培养24小时后可以更换新鲜完全培养基，但不是必须。





3. 收获细胞，进行后续实验。如需进行稳定转染，在转染24~48小时后，可选用选择培养基传代培养。

注：LabFect5000在完全培养基中仍有较高的转染效率，因此转染前后细胞培养板内不需要换成无血清或低血清培养基。

## 二、siRNA转染（以24孔板转染为例）：

### 细胞接种：

1. 转染前一天对细胞进行转接，使转染时细胞密度为50%左右，且生长良好、无支原体污染（非常重要）；
2. 最好在转染开始之前更换新鲜的含血清培养基，以防转染后孵育阶段细胞密度太大、营养不足导致细胞死亡。

### siRNA转染复合物制备（该步完成后应立即转染）：

1. 在1.5 ml无菌洁净离心管中加入40 $\mu$ l Trans buffer S, 再加入1 $\mu$ L转染试剂，其它规格培养板用量见附表，用移液器轻轻混匀。
2. 向上述离心管中加入36 pmol siRNA，用移液器轻轻混匀，室温静置15分钟。其它规格培养板 siRNA 具体用量见附表。

注意：离心管最好使用洁净的聚丙烯离心管。

### 转染：

1. 将上述步骤制备的转染复合物滴加至培养基中，边加边轻轻晃动培养板混匀，再立即将培养板转入培养箱继续培养。
2. 37°C培养24-72h，检测基因抑制效果。如果需要，细胞培养24h后可以更换培养基，但不是必须。如要观察Fam-siRNA 转染情况，请吸去含荧光的老培养基，用0.01M PBS或新鲜培养基清洗细胞2次，以防荧光背景过高，影响观察效果。

注1：LabFect5000 Prime在完全培养基中仍有较高的转染效率，因此转染前后不需要换成无血清或低血清培养基。

**附表1：质粒转染不同培养体系推荐初始转染条件**

培养皿	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	10cm 皿
表面积 (cm <sup>2</sup> )	0.35	1.0	1.9	3.8	9.6	59
Trans buffer、试剂、DNA 量	Trans buffer S( $\mu$ l)	10	20	40	80	160
	溶液A( $\mu$ l)	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
	LabFect5000 ( $\mu$ l)	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
	1 $\mu$ g/ $\mu$ l plasmid ( $\mu$ l)	0.2	0.1	0.8	1.6	3.2
完全培养基(ml)	0.12	0.25	0.5	1	2	10

**附表2：siRNA转染不同培养体系推荐初始转染条件**

培养皿	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	10cm 皿
Trans buffer、试剂、DNA 量	Trans buffer S( $\mu$ l)	10	20	40	80	160
	LabFect5000 ( $\mu$ l)	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
	siRNA (pmol)	9	18	36	72	140
完全培养基(ml)	0.12	0.25	0.5	1	2	10

