



北京利维宁生物科技有限公司

Lip2000 Transfection Reagent			
CAT#	A1020	CAS#	N/A
Storage	4° C, desiccation and avoid light	Shelf Life	12 months
Ex (nm)	N/A	N/A Em (nm)	N/A
MW	N/A	N/A Solvent	H2O

Lip2000 是一种阳离子脂质体，独特的配方使其在转染 DNA 或 RNA 到真核细胞时有以下优点：

- l 对多数细胞具有很高的转染率。
- l 可直接加入培养基，血清不影响转染。
- l 转染后不必立即除去转染剂，可在 4~6 小时后除去。

注意事项：

- l 用 Reduced Serum Medium 稀释 Lip 2000 和核酸。
- l 在培养基中不要加入抗生素，以免细胞死亡。
- l 实验之间保持相同的生长条件。
- l 测试无血清培养基与 Lip 2000 的相容性，有的无血清培养基抑制阳离子脂质体的转染。

操作流程：

转染前一天，胰酶消化细胞并计数，细胞铺板，使其在转染日密度为 90%。细胞铺板在 0.5ml 含血清，不含抗生素的正常生长的培养基中。

对于每孔细胞，使用 50 μ l 无血清培养基(如 OPTI-MEM I 培养基)稀释 0.8 μ g-1.0 μ g DNA。

对于每孔细胞，使用 50 μ l OPTI-MEM I 培养基稀释 1 μ l-3 μ l LIP2000 试剂。Lip2000 稀释后保温 5 分钟(在 30 分钟内同稀释的 DNA 混合。保温时间过长会降低活性。)注意：即使 Lipo 2000 使用 OPTI-MEM I 稀释，细胞也可以使用 D-MEM 培养。如果 D-MEM 做为 Lip 2000 的稀释液，必须在 5 分钟内同稀释的 DNA 混合。

混合稀释的 DNA (第 2 步)和稀释的 Lip2000 (第 3 步)。在室温保温 20 分钟。

注意：溶液可能会混浊，但不会影响转染。复合物可以在室温保持 6 小时稳定。

直接将复合物加入到每孔中，摇动培养板，轻轻混匀。

注意：如果在无血清条件下转染，使用含血清的正常生长培养基进行细胞铺板。在加入复合物前移去生长培养基，替换为 0.5ml 无血清培养基。

在 37°C，5%的 CO₂ 中保温 24-48 小时，无须去掉复合物或更换培养基或者在 4-5 小时后更换生长培养基也不会降低转染活性。

在细胞中加入复合物 24-72 小时后，分析细胞抽提物或进行原位细胞染色，检测报告基因活性。这依赖于细胞类型和启动子活性。对稳定表达，在开始转染一天后将细胞传代至新鲜培养基中，两天后加入筛选抗生素。进行稳定表达需要数天或数周。

对于 96 孔板培养，不再需要提前一天进行细胞铺板，而可以直接在平板中制备复合物，然后将细胞悬浮液加入到复合物就可以了，这样进一步减少了转染时间。这种改进步骤已经过 293-H，293-F，COS-7L 和 CHO 细胞的试验，同传统方法相比活性稍低。快捷的步骤和蛋白表达细胞系的高效转染使得 Lip2000 非常适用于 96 孔板的高通量转染，比如 cDNA 文库的筛选和蛋白瞬时表达。

I 用量: 24 孔板转染每次用 2ul 左右，1.5ml Lip2000 大约可做 750 次 24 孔板转染，或者大约 150 次 6 孔板转染。

I 注意事项:

Lip2000 要求细胞铺板密度较高，以 90%-95%为佳，这有助于减少阳离子脂质体细胞毒性造成的影响。2) Lip2000 可用于有血清培养基的转染，并且转染前后不需要换培养基，使得操作方便了许多，但是要注意制备转染复合物时要求用无血清培养基稀释 DNA 和转染试剂，因为血清会影响复合物的形成。3)复合物形成后是可以加入血清。这里要特别注意检测所用的无血清培养基是否能和 Lip2000 匹配，比如已知 CD293, SFM II, VP-SFM 就不行。此外还应该注意，如果你研究的基因要求比较长的表达时间，比如细胞周期相关基因，或者是细胞表面蛋白，最好选择细胞铺板密度较低的转染试剂，不适合用 Lip2000。4)还有转染的时候培养基中不能添加抗生素。5)阳离子脂质体应该在 4 度保存，要注意避免多次反复长时间开盖，因为可能会导致脂质体氧化而影响转染效率。6)注意质粒的质量，质粒的内毒素是转染的大敌。7)应优化 DNA 浓度和阳离子脂质体试剂量以得到最大的转染效率。DNA 和转染试剂的比例，通常推荐是 1:2 或者 1:3，优化可以从 0.5-5 之间慢慢试。使用小剂量确定的优化条件可以用于进行大剂量的转染，只要根据培养板表面比例线性增加铺板细胞的数目、阳离子脂质体试剂和 DNA 量就可以了。