原代T细胞核酸转染试剂

Gentle T30

使用说明书

Version 1.3

金简达生物科技（金华）有限公司
Genda Biotechnology (Jinhua) Co., Ltd.
Tel： +86 19357360203
E-mail： sales@genda-bio.com

01/产品概述

基于多肽的核酸递送是一种最新的递送技术，能够显著提升各类细胞，包括原代细胞、难转细胞系的核酸转染[1][2]。GentleFect™ 技术基于高通量多肽筛选平台，精准识别具有相分离潜力的内源多肽序列，开发了针对常见原代 T 细胞的 Gentle T30 原代 T 细胞核酸转染试剂。多肽通过液-液相分离自组装形成纳米级微滴，借助细胞膜胞饮作用实现高效内化，在维持细胞活性前提下显著提升各类物种原代 T 细胞的核酸递送效率，尤其是提高大片段基因的递送效率。

02/产品特性

- 同时适用于各类核酸分子转染，包括 mRNA, siRNA, circRNA, Crispr 等；
- 预混合转染液和转染缓冲液，仅需往试剂中加入核酸，即可一步完成转染配置。

03/产品规格

货号	名称	包装
1030001	Gentle T30 原代 T 细胞核酸转染试剂	3.6 mL
1030002	Gentle T30 原代 T 细胞核酸转染试剂	15.0 mL
1030003	Gentle T30 原代 T 细胞核酸转染试剂	40.0 mL

04/保存条件

短期 4℃保存，长期-20℃保存。

05/产品组分

- Gentle T30 原代 T 细胞核酸转染试剂

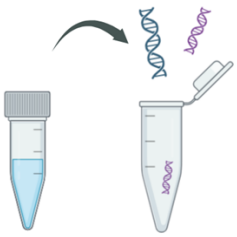
06/实验前准备

分选后激活的 2-8 天原代 T 细胞，确保细胞活率 > 90%，无菌无酶 EP 管。将完全培养基、Opti-MEM 培养液、胰酶、核酸转染试剂恢复至室温，核酸保持低温，**转染试剂在使用前充分混合。**如果核酸为粉末状态，请提前用无核酶水溶解，，混合均匀，此过程在超净台操作。

07/实验步骤图解（96 孔板）

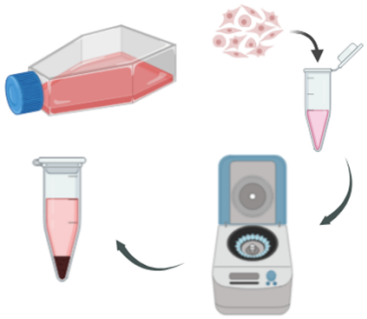
1 配制转染混合液：

- 取1.5 mL Nuclease free离心管，**在使用前充分混匀转染试剂**，按每个96孔转染体积，往离心管中40 μL Gentle T30转染试剂，再加入0.5-1 μg核酸，**温和吹打30-60秒**，室温静置3分钟。



01

02



2 细胞样品准备：

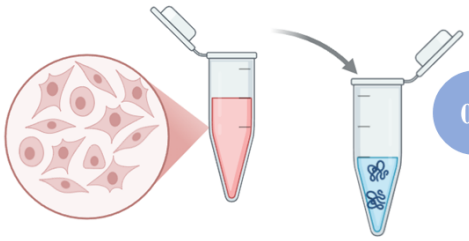
- 取待转染的细胞，离心（300g，5min），弃去上清，**用Opti-MEM重悬细胞**，**再次离心弃上清**，Opti-MEM重悬，**调整细胞密度至5×10^6cells/mL。**

（Note：细胞活率>90%，去除完全培养基，避免因FBS/蛋白影响实验结果；无Opti-MEM时，可以使用PBS替代）

3 细胞转染：

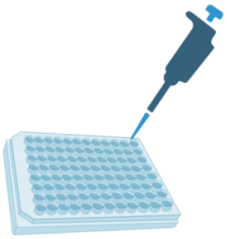
- 按照96孔每孔20 μL细胞悬液，加入至转染混合液中，**轻柔混匀，**37℃孵育30分钟。

（Note：**需保证转染试剂与细胞悬液的体积比为2：1，转染试剂与细胞悬液需充分混合**；此次孵育可在孔板或EP管（离心管）中完成，时间可根据细胞状态调整，**最好不要超过2小时**，孵育太久易造成细胞损伤。）



03

04



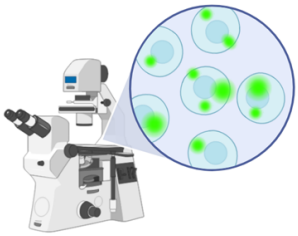
4 终止转染：

- 加1 mL完全培养基终止，离心弃上清，**吸取上清时可留20-30 μL液体，防止吸取到细胞**。重悬于200 μL完全培养基，加入细胞培养板中，继续培养。

（Note：进行放大体系转染时，建议加入的终止液完全培养基体积大于转染混合物体积的2倍，换液后再加入正常量的完全培养基即可）

5 结果检测：

- 在转染后的12-48小时内检测目的基因表达情况。



05

08/转染体系

表 1. mRNA 转染体系推荐

孔板规格	转染试剂（μL）	mRNA (μg)	细胞悬液（μL）	细胞数量（cells）
96 孔	40	0.5-1	20	1 x10^5
48 孔	80	1-2	40	2 x10^5
24 孔	200	2.5-5	100	5 x10^5
12 孔	500	7.5-15	250	1 x10^6
6 孔	800	10-20	400	2 x10^6

表 2. siRNA 转染体系推荐

孔板规格	转染试剂（μL）	siRNA (pmol)	细胞悬液（μL）	细胞数量（cells）
96 孔	40	40	20	1 x10^5
48 孔	80	80	40	2 x10^5
24 孔	200	200	100	5 x10^5
12 孔	500	600	250	1 x10^6
6 孔	800	800	400	2 x10^6

①在转染复合物和细胞孵育时，转染试剂的用量和加入的细胞悬液体积比保持在 2：1。

②多个核酸共转染时，每孔转入的核酸量为多个核酸的总和，如 96well 每个孔应转入 0.5-1 μg 核酸，则加入的核酸总量为 0.5-1 μg。

09/常见问题及解答

- **原代 T 细胞可以转染质粒 DNA 吗?**

不可以，原代 T 细胞因自身独特的免疫特性，其细胞内的 cGAS-STING 信号通路对外源双链 DNA 较为敏感，不仅引发细胞周期阻滞，还会通过内源性凋亡途径导致细胞死亡，常规转染条件下，其细胞活率和阳性率会显著降低。见参考文献：Enhancement of the viability of T cells electroporated with DNA via osmotic dampening of the DNA-sensing cGAS–STING pathway. Nature Biomedical Engineering.

- **转染试剂用量怎么确定?**

原代 T 细胞为悬浮细胞，本试剂可以深度覆盖转染更多的 T 细胞数量，如 96 孔板转染，可以实现从 1x10^4 到 2x10^5 细胞数范围的高效低毒转染。建议按照表 1、表 2 推荐的转染试剂用量进行转染或根据细胞量来等比增加/减少转染试剂的用量，最低可以转染 5x10^3 个细胞。

- **如何提高转染效率?**

① 转染前应确保细胞处于良好的生长状态，建议细胞活率大于 90%;

② 适当增加转染试剂和核酸的用量。

③ 适当延长转染时间，孵育时间长短影响阳性率和细胞活率，根据细胞特性可尝试更短或更长孵育时间。

④ 不同物种的 T 细胞衰老速度不同，建议在激活后的 2-4 天内转染，防止因细胞衰老导致转染效率的下降

- **哪些实验操作会影响转染效率？**

① 细胞转染孵育时请勿使用含 FBS 的培养基，FBS 会严重影响细胞转染效果；

② Gentle T30 转染试剂不建议剧烈涡旋，推荐使用移液器温和反复吹打混匀。

- **实验中离心可能出现的问题**

① 本文中出现的离心程序设置均为室温，300g，5 分钟；

② 在转染结束后，可加入 1 mL 完全培养基轻吹混匀，终止转染的同时可去除转染试剂对细胞离心的影响（转染试剂轻微粘稠是属于正常现象）；

③ 在转染结束时，EP 管离心后没有看到细胞沉淀是正常现象，这是细胞量较少导致的，可在吸取上清液时留 20-50 μL 液体，防止吸取到细胞。

本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

如果在实验过程中遇到任何问题，可通过下方邮箱及电话获取我们的技术支持，同时也真诚地欢迎大家对本试剂产品提出宝贵的建议！

E-mail：sales@genda-bio.com

Tel：+86 19357360203

参考文献

【1】Sun, Y., Wu, X., Li, J. *et al.* Phase-separating peptide coacervates with programmable material properties for universal intracellular delivery of macromolecules. *Nat Commun* 15, 10094 (2024).

【2】Sun, Y., Lau, S.Y., Lim, Z.W. *et al.* Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics. *Nat. Chem.* 14, 274–283 (2022).