原代皮肤细胞核酸转染试剂

Gentle F30

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，开发了针对原代皮肤细胞的 Gentle F30 原代皮肤细胞核酸转染试剂。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皮肤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 DNA, 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
1050001	Gentle F30 原代皮肤细胞核酸转染试剂	3.6 mL
1050002	Gentle F30 原代皮肤细胞核酸转染试剂	15.0 mL
1050003	Gentle F30 原代皮肤细胞核酸转染试剂	40.0 mL

04/保存条件

短期 4℃保存，长期-20℃保存。

05/产品组分

- Gentle F30 原代皮肤细胞核酸转染试剂

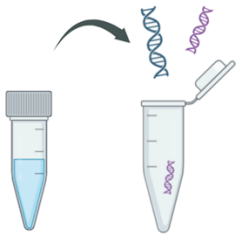
06/实验前准备

待转染的原代皮肤细胞，细胞汇合率达到 70-80%，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。

07-1/实验步骤图解（96 孔板，悬浮操作）

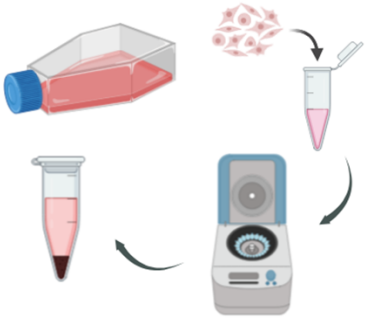
1 配制转染混合液:

- 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 F30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:

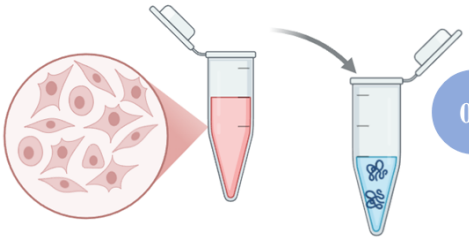
- 取待转染的细胞，弃去上清，1xPBS清洗，胰酶消化，离心（300g，5min），弃上清，**用Opti-MEM重悬细胞，再次离心弃上清**，Opti-MEM重悬，**调整细胞密度至1×10⁶cells/mL。**

（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:

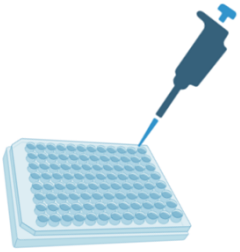
- 按照96孔每孔20 μL细胞悬液，加入至转染混合液中，**轻柔混匀，**37℃孵育30分钟。

（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



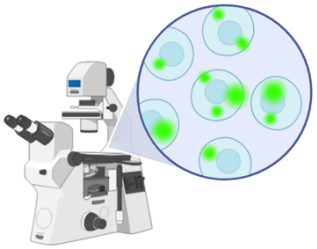
4 终止转染:

- 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。



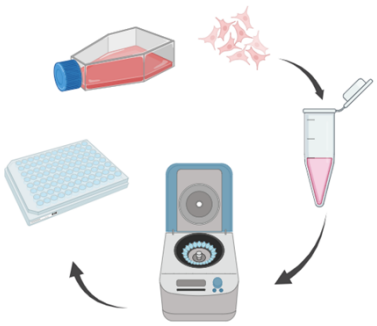
05

07-2/实验步骤图解（96 孔板，贴壁操作）

1 提前种板：

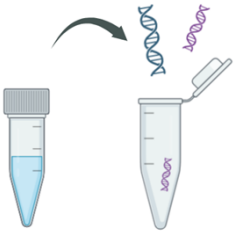
- **贴壁细胞：**提前一天进行细胞传代种板，**建议转染使用细胞汇合度70%-90%。**

(Note: 确保细胞活率>90%，以获得更高转染效率)



01

02



2 配制转染混合液：

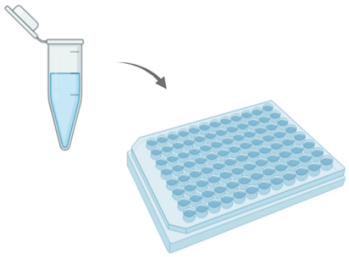
- 取1.5 mL Nuclease free离心管，**使用前混匀转染试剂**，按每个96孔转染体积，往离心管中40 μL Gentle F30转染试剂，再加入0.5-1 μg核酸，**温和吹打30-60秒**，室温静置3分钟。

3 细胞转染：

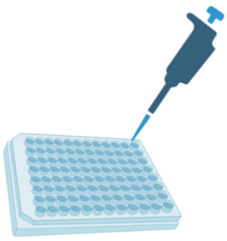
- 取需要转染的细胞，弃去培养上清，**加入无血清Opti-MEM培养液洗涤1-2次。** **(Note：需去除完全培养基，避免因FBS/蛋白影响实验结果；无Opti-MEM时，可以使用PBS替代)**
- 加入20 μL Opti-MEM培养液到离心管中，再**缓慢加入40 μL**混合好的转染复合物，轻柔吹打30-60s，将混合物**缓慢加入**到96孔板中，**轻轻震荡**96孔板，使液体分布均匀。 **(Note:需保证转染试剂与Opti-MEM的体积比为2：1，Opti-MEM与转染复合物需充分混匀，防止因局部浓度过高造成细胞死亡)**
- 37℃孵育30分钟。 (Note: 孵育时间可根据细胞状态调整，**最高不超过2小时**，孵育过长易造成细胞损伤)

(Note:进行放大体系转染时，用量按照推荐比例进行放大即可)

03



04



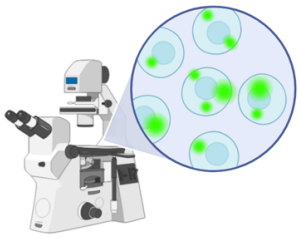
4 终止转染：

- 孵育完成后加入100 μL完全培养基终止转染，轻轻吸弃上清。加入150-200 μL完全培养基，放入37℃，5% CO^2培养箱继续培养。

(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. DNA/mRNA 转染体系推荐

孔板规格	转染试剂（μL）	DNA/mRNA (μg)	细胞悬液（μL）	细胞数量（cells）
96 孔	40	0.5-1	20	2×10^4
48 孔	80	1-2	40	4×10^4
24 孔	200	2.5-5	100	1×10^5
12 孔	500	7.5-15	250	2.5×10^5
6 孔	800	10-20	400	4×10^5

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	2×10^4
48 孔	80	80	40	4×10^4
24 孔	200	200	100	1×10^5
12 孔	500	600	250	2.5×10^5
6 孔	800	800	400	4×10^5

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，即使是在贴壁细胞的转染孵育时也要加入一定比例的无血清培养基。

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

- **转染试剂用量怎么确定?**

原代皮肤细胞为贴壁细胞，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。

- **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;（用量范围可在推荐用量的 1-2 倍）

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。

- **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 F30 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。

- **原代皮肤细胞操作要点**

原代皮肤细胞无需提前铺板，可大大简化实验步骤；经大量实验发现，制备的细胞悬液在 EP 管中与转染混合液孵育可使转染效率最大化。

- **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).