

全能难转细胞核酸转染试剂

Gentle A30

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，开发了针对难转细胞系的 Gentle A30 全能难转细胞核酸转染试剂。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难转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，即可完成转染配置。

03/产品规格

货号	名称	包装
1000001	Gentle A30 全能难转细胞核酸转染试剂	0.3 mL
1000002	Gentle A30 全能难转细胞核酸转染试剂	1.8 mL
1000003	Gentle A30 全能难转细胞核酸转染试剂	5.0 mL

04/保存条件

短期 4°C保存，长期-20°C保存-。

05/产品组分

- Gentle A30 全能难转细胞核酸转染试剂：试剂 A, 试剂 B

06/实验前准备

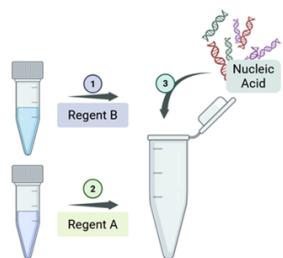
待转染的贴壁细胞（细胞汇合率达到 70-80%）或悬浮细胞，确保细胞活率 > 90%，无菌无酶 EP 管。将完全培养基、Opti-MEM 培养液、胰酶、核酸转染试剂恢复至室温，核酸保持低温，转染试剂在使用前充分混合。如果核酸为粉末状态，请提前用无核酶水溶解，混合均匀，此过程在超净台操作。

07-1/实验步骤图解 (96 孔板, 悬浮操作)

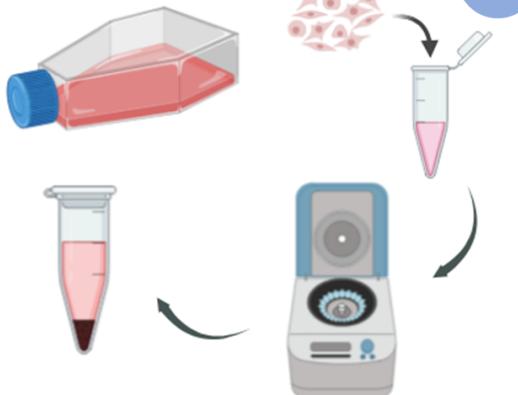
1 配制转染混合液:

- 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, 往离心管中加入40 μ L试剂B, 再加入1 μ L试剂A, 温和吹打30-60秒, 再加入0.5-1 μ g核酸, 温和吹打30-60秒, 室温静置3分钟。

(Note: 放大体系转染时, 确保转染试剂A:转染试剂B=1:40)



01



2 细胞样品准备:

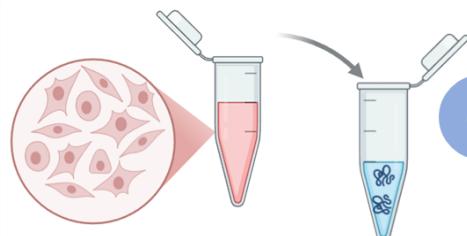
- **悬浮细胞:** 取待转染的细胞, 离心 (300g, 5min), 弃去上清, 用Opti-MEM重悬细胞, 再次离心弃上清, Opti-MEM重悬, 调整细胞密度至 5×10^6 cells/mL。
- **贴壁细胞:** 取待转染的细胞, 弃去上清, 1xPBS清洗, 胰酶消化, 离心 (300g, 5min), 弃上清, 用Opti-MEM重悬细胞, 再次离心弃上清, Opti-MEM重悬, 调整细胞密度至 1×10^6 cells/mL。

(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:

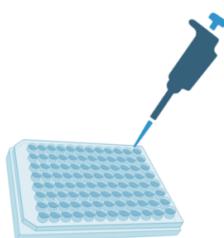
- 按照96孔每孔20 μ L细胞悬液, 加入至转染混合液中, 轻柔混匀, 37°C孵育60分钟。

(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。)



02

04



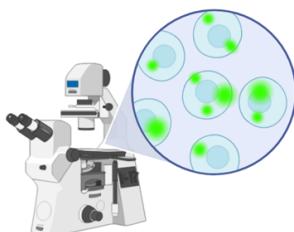
4 终止转染:

- 加1 mL完全培养基终止, 离心弃上清, 吸取上清时可留20-30 μ L液体, 防止吸取到细胞。重悬于200 μ L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

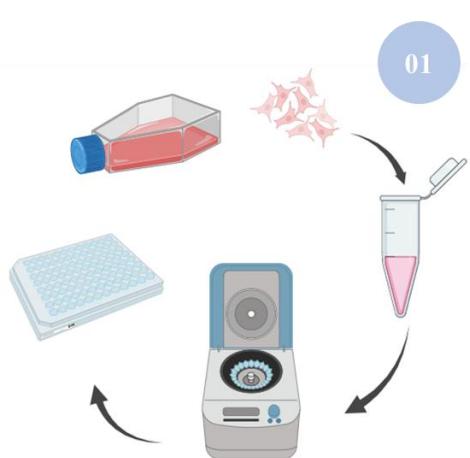
02

07-2/实验步骤图解 (96 孔板, 贴壁操作)

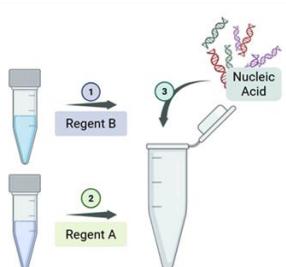
1 提前种板:

- **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)



02



2 配制转染混合液:

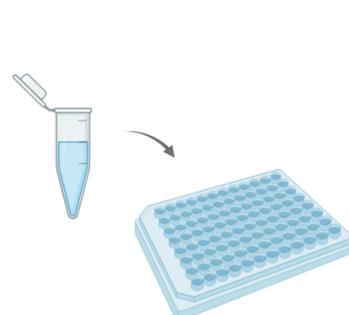
- 取1.5 mL Nuclease free离心管, **使用前混匀转染试剂**, 按每个96孔转染体积, 往离心管中加入40 μ L试剂B, 再加入1 μ L试剂A, **温和吹打30-60秒**, 再加入0.5-1 μ g核酸, **温和吹打30-60秒**, 室温静置3分钟。

(Note: 放大体系转染时, 确保转染试剂A:转染试剂B=1:40)

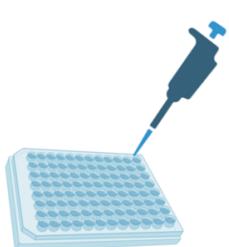
3 细胞转染:

- 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 μ L Opti-MEM培养液到离心管中, **再缓慢加入40 μ L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°C孵育60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)



04



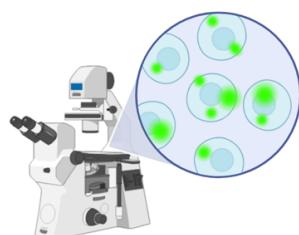
4 终止转染:

- 孵育完成后加入100 μ L完全培养基终止转染, 轻轻吸弃上清。加入150-200 μ L完全培养基, 放入37°C, 5% CO₂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

03

08/转染体系

表 1. DNA/mRNA 转染体系推荐

孔板规格	试剂 A (μL)	试剂 B (μL)	DNA/mRNA (μg)	细胞悬液 (μL)	悬浮细胞 细胞数量 (cells)	贴壁细胞 细胞数量 (cells)
96 孔	1-2	40	0.5-1	20	1 x10 ⁵	2 x10 ⁴
48 孔	2-4	80	1-2	40	2 x10 ⁵	4 x10 ⁴
24 孔	5-10	200	2.5-5	100	5 x10 ⁵	1 x10 ⁵
12 孔	12.5-25	500	7.5-15	250	1 x10 ⁶	2.5 x10 ⁵
6 孔	20-40	800	10-20	400	2 x10 ⁶	4 x10 ⁵

表 2. siRNA 转染体系推荐

孔板规格	试剂 A (μL)	试剂 B (μL)	siRNA (pmol)	细胞悬液 (μL)	悬浮细胞 细胞数量 (cells)	贴壁细胞 细胞数量 (cells)
96 孔	1	40	40	20	1 x10 ⁵	2 x10 ⁴
48 孔	2	80	80	40	2 x10 ⁵	4 x10 ⁴
24 孔	5	200	200	100	5 x10 ⁵	1 x10 ⁵
12 孔	12.5	500	600	250	1 x10 ⁶	2.5 x10 ⁵
6 孔	20	800	800	400	2 x10 ⁶	4 x10 ⁵

Tips:

- ①配置转染复合物时，注意试剂 A：试剂 B 的比例为 1 : 40。
- ②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。
- ③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

- 贴壁细胞和悬浮细胞操作有什么区别？**

悬浮细胞为悬浮培养，故相对于贴壁细胞每孔可以培养更多的细胞，可以根据细胞情况进行调整。此外，这两类细胞都可在细胞传代时进行转染操作，贴壁细胞无需提前铺板，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。

- 转染试剂用量怎么确定？**

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，其中悬浮细胞可以根据客户细胞培养时的常用密度进行转染。

- 可以直接用无血清培养基替代 Opti-MEM 进行转染吗？**

建议还是使用 Opti-MEM，虽然有些培养基称为无血清培养基，但某些无血清培养基可能仍含有特定的蛋白质或蛋白质组分，以满足细胞生长的需求，因此此类无血清培养基，在转染时还是使用 Opti-MEM 进行转染。

● 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。一般建议在 1 小时到 2 小时之间。

● 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 A30 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).