

Neon™ 转染系统

货号: MPK5000

修订日期: 2009 年 3 月 17 日; Part No: 25-1056 MAN0001632

使用 Neon™ 转染系统进行哺乳动物细胞转染的简介如下。如欲了解更详细的使用说明, 请参考产品所附的使用手册或从 www.invitrogen.com 网站下载该手册。

一般准则

- 制备浓度为 1–5 µg/µl 的高质量质粒 DNA, 以去离子水或 TE 缓冲液溶解, 或者制备浓度为 500µM–1 mM 的高质量 RNA i 双链并将其溶解于无核酸酶的水中。
- 使用适当的 GFP (绿色荧光蛋白, Clontech, 货号: 6085-1) 或 siRNA 对照 (Invitrogen 公司, 货号: 13750062), 确定转染的效率。
- 根据初步结果, 您可能需要优化实验的电转染参数。仪器预设了 24 孔板的优化方案, 方便使用。
- Neon™ 吸头使用两次后, Neon™ 管使用 10 次后, 都应被视作生物危害物丢弃。处理不同的质粒 DNA/siRNA 或细胞类型时, 请更换试管和缓冲液。
- 质粒 DNA 或 siRNA 的量不能超过转染总体积的 10%。
- 访问 www.invitrogen.com/neon 查看各种常用细胞类型的电转染方案信息库。

细胞制备

1. 培养适量的细胞 (细胞数量参见下表), 待细胞生长至 70–90% 满时, 开始实验。
2. 在实验当天, 收获细胞, 并用不含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 漂洗细胞。
3. 在重悬缓冲液 R (Neon™ 试剂盒中带有) 中重悬细胞沉淀, 使其终密度为 1.0 × 10⁷ 个细胞/ml (贴壁细胞) 或 2.0 × 10⁷ 个细胞/ml (悬浮细胞)。
4. 在 24 孔板中加入 0.5 ml 含血清和添加剂, 不含抗生素的培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中预孵育。如果使用其它培养板, 则需相应调整培养基体积。

试剂量

有关每个电转染样本所需的质粒 DNA/siRNA 量、细胞数量和每孔平板培养基体积, 请见下表。

规格	每孔表面积	DNA (µg)	siRNA (nM)	Neon™ 吸头	平板培养基的体积	细胞数量	重悬缓冲液 R
96-孔	0.3 cm ²	0.2-0.3	10-200	10 µl	100 µl	1-3 × 10 ⁴	10 µl
48-孔	0.7 cm ²	0.3-0.7	10-200	10 µl	250 µl	5-7.5 × 10 ⁴	10 µl
24-孔	2.0 cm ²	0.5	100	10 µl	500 µl	0.5–2 × 10 ⁵ 贴壁细胞	10 µl
		1.0	200	10 µl		0.5–5 × 10 ⁵ 悬浮细胞	10 µl
12-孔	4.0 cm ²	0.5-3.0	10-200	10 µl	1 ml	1-3 × 10 ⁵	10 µl
6-孔	10 cm ²	2-4	10-200	10 µl/100 µl	2 ml	0.5-1 × 10 ⁶	10 µl/100 µl
60 mm	20 cm ²	4-8	10-200	100 µl	5 ml	2-4 × 10 ⁶	100 µl
10 cm	60 cm ²	8-16	10-200	100 µl	10 ml	4-8 × 10 ⁶	100 µl

选择电转染实验方案

参考使用手册, 了解 Neon™ 仪器和 Neon™ 移液器吸头架的设置详情。

可从以下 3 种选项中选择与您所用细胞类型相适合的电转染方案:

- 如果您已知所用细胞类型的电转染参数, 则在输入窗口中输入电转染参数。
- 在触摸屏上按 **Database (数据库)** 键, 从事先已经添加好的, 针对多种细胞类型建立的电转染方案数据库中为某种细胞所设定的参数。
- 在触摸屏上按 **Optimization (优化)** 键, 为您所用细胞类型进行 24-孔优化方案。



使用 Neon™ 转染系统

以下使用说明叙述了如何使用 Neon™ 仪器 (包括 Neon™ 移液器吸头架和 Neon™ 试剂盒) 进行哺乳动物细胞的电转染操作。

1. 在 Neon™ 管中加入 3 ml 电解缓冲液 (10 µl Neon™ 吸头使用缓冲液 E, 100 µl Neon™ 吸头使用缓冲液 E2)。
2. 将 Neon™ 管插入 Neon™ 移液器吸头架中, 直到听到咔嗒一声 (图 1)。
3. 取适量的质粒 DNA/siRNA 移至 1.5 ml 无菌微量离心管中。
4. 将细胞加入含有质粒 DNA/siRNA 的管中, 轻轻混匀。有关细胞数量、DNA/siRNA 量和平板使用体积, 请参见背面表格。
5. 按住 Neon™ 移液器上部的按钮至第二档, 从而将藏于移液器头内部的夹钳露出并打开, 将 Neon™ 移液器头插入 Neon™ 吸头中, 直到夹钳完全夹住吸头颈部内的金属杆。缓缓释放按钮, 继续下移移液器, 确保吸头与移液器之间密封无缝隙 (图 2A 和 B)。
6. 按住 Neon™ 移液器上的按钮至第一档, 将 Neon™ 吸头浸入细胞-DNA/siRNA 混合物中。缓缓释放移液器按钮, 吸取细胞-DNA/siRNA 混合物至 Neon™ 吸头中 (图 3)。
7. 将带有样本的 Neon™ 移液器垂直插入位于 Neon™ 移液器吸头架的 Neon™ 管中, 直至听到咔嗒一声 (图 4)。
8. 确保已选择了适当的电转染方案, 并按下触摸屏上的 **Start (开始)** 键 (图 5)。
9. Neon™ 仪器在发出电脉冲前, 会先自动检查 Neon™ 管和 Neon™ 移液器插入是否正确。
10. 触摸屏上显示 **Complete (完成)**, 说明电转染已完成。
11. 将 Neon™ 移液器从 Neon™ 移液器吸头架上移开, 按压移液器上的按钮至第一档, 立即将 Neon™ 吸头中的样本转移至准备好的培养板中, 该培养板中含有血清和添加物但**无抗生素**的预热培养基 (图 6)。将 Neon™ 吸头弃于适当的生物危害废物容器中。
12. 重复操作第 5-11 步, 处理剩余样本。
使用两次后更换 Neon™ 吸头, 使用 10 次后更换 Neon™ 管。操作新的质粒 DNA/siRNA 或改变细胞类型时, 请使用新的 Neon™ 吸头和 Neon™ 管。
13. 轻轻晃动培养板, 确保细胞分布均匀。将培养板置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中孵育。
14. 如果您不再使用 Neon™ 仪器, 请按仪器后面的 **OFF (关闭)** 键, 将电源关闭。
15. 检测样本, 测定转染效率 (例如, 荧光显微镜或功能分析) 或基因沉默率 (siRNA)。
16. 根据初步结果, 您可能需要优化该细胞类型的电转染参数。使用 Neon™ 仪器中的预设 24-孔优化方案, 请参考使用手册。

限制使用标签许可

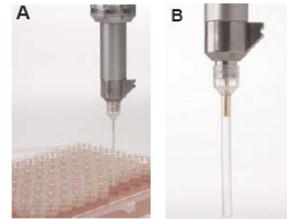
本产品受第 5 号限制使用标签许可的约束。请参见使用手册或登陆 www.invitrogen.com 了解详细信息。

©2009 生命技术公司版权所有。
仅供研究使用。不可用于任何动物或人类的诊断治疗

1. 插入含有缓冲液的 Neon™ 管。



2. 将 Neon™ 吸头插入移液器



3. Neon™ 移液器吸取样本



4. 插入

Neon™ 移液器



5. 按开始键



6. 将样本转移至培养基中



欲了解不同国家的联系信息, 请访问
我们的网站 www.invitrogen.com
或拨打 800-820-8181 咨询技术支持部门