

# GenomONE™-Neo EX

## 操作手册

使用注意事项.....	2
<b>1. 概况.....</b>	<b>3</b>
1-1：转染的原理.....	3
1-2：规格.....	3
<b>2. 规格.....</b>	<b>5</b>
2-1：单位的定义（AU：活性单位）.....	5
2-2：每种规格细胞板的推荐细胞密度.....	5
2-2-1：贴壁细胞.....	5
2-2-2：悬浮细胞.....	5
<b>3. 贴壁细胞的转染.....</b>	<b>6</b>
3-1：质粒DNA的转移.....	6
3-1-1：推荐流程.....	6
3-1-2：低浓度DNA的流程.....	7
3-2：siRNA的转移.....	8
3-3：反义/诱饵寡聚脱氧核苷酸（ODN）转染.....	9
3-4：蛋白转染.....	10
3-5：问题.....	11
<b>4. 悬浮细胞的转染.....</b>	<b>12</b>
4-1：质粒DNA的转移.....	12
4-1-1：推荐流程.....	12
4-1-2：低浓度DNA的流程.....	13
4-2：siRNA转移.....	14
4-3：反义/诱饵寡聚脱氧核苷酸（ODN）转移.....	15
4-4：蛋白转移.....	16
4-5：问题.....	17
<b>5. 活体动物转染（体内实验）.....</b>	<b>18</b>
5-1：质粒DNA或者siRNA转移.....	18
5-2：反义/诱饵寡聚脱氧核苷酸（ODN）或者蛋白转移.....	19
<b>6. 多样品快速转染.....</b>	<b>20</b>
6-1：质粒DNA转移.....	20
6-2：siRNA转移.....	21

## 使用注意事项：

1. 该产品只能用于实验室科研。不可用于人或者动物的临床或者诊断。
2. 使用该产品进行重组 DNA 实验时，必须遵守重组 DNA 实验的相关规定。实验室必须配置相应的设备。
3. 使用者必须有实验室操作经验，并且在细胞培养和分子生物学实验方面具有一定技能和知识。
4. 在 HVJ-E 实验区域进行实验的人员必须告知 HVJ-E 的特点，防止错误处理引起的突发事件。
5. 该试剂盒中 HVJ 包膜含有的 HVJ（仙台病毒）已经灭活，不具有增殖和感染的特点，但是 HVJ 包膜仍然保留有膜融合的活性。为了防止吸入、吞噬 HVJ-E 颗粒，HVJ 颗粒接触皮肤、眼睛和鼻子，该产品必须在安全的实验室内操作，穿合适的衣服（实验室工作服）还有防护装备（比如塑料或者乳胶手套，口罩，防护面具）。
6. 不要用嘴分装 HVJ-E。避免溅出或者产生水溶胶。避免 HVJ-E 和试剂盒其他成分与皮肤接触或者与唾液接触。如果接触了皮肤或者眼睛，立即用水清洗。采用高压灭菌或者用表面清洗剂或者 70%乙醇灭活 HVJ-E 的膜融合活性。
7. 接触到 HVJ-E 的耗材（枪头，盘子等）和容器必须小心处置，高压灭菌后处理掉。
8. 其他试剂不属于有毒物质，所以处理时做好防护措施即可。
9. HVJ 悬浮液已经经过滤测试确认不含有细菌或者支原体污染。但是不能保证完全没有微生物的污染，所以使用该产品时必须注意。
10. 冻干的 HVJ-E 和重悬的溶液放置在 2~8°C 保存，不要使用过保质期的 HVJ-E。
11. 请按照包装里面的说明书进行操作。如果不按照操作手册使用而引起的事故，厂家和经销商均不负责。
12. 该产品已经申请专利。不能用于商业用途。

## 1. 概况

### 1-1 : 转染的原理

GenomONE™-Neo EX 是根据下列文献研发的非病毒转染试剂。

· Kaneda, Y., *et al.*: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy*, 6, 219-226 (2002).

· Kaneda, Y., *et al.*: New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets*, 4, 599-602 (2003).

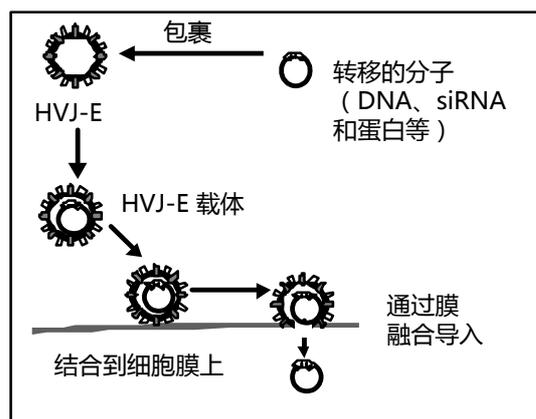


Fig.1 转染原理

转移的生物大分子 (DNA, 蛋白, 反义寡核苷酸, siRNA 等) 包裹在 HVJ-包膜蛋白 (HVJ-E) 内形成 HVJ-E 载体, 利用融合 (F) 蛋白的膜融合活性 (Fig.1) 导入目标细胞或者组织。

\*HVJ : 日本仙台病毒 (日本血凝病毒 SeV)

### 1-2 : 规格表

货号	冻干的HVJ-E (灭活的HVJ) 0.26mL/瓶 (重悬时)	试剂A (包裹增强剂) 0.5mL/瓶	试剂B (包裹试剂) 0.3 mL/瓶	试剂C (导入增强剂) 1.0 mL/瓶	缓冲液 (重悬和稀释) 6.5 mL/瓶
ISK-GN001EX	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)
ISK-GN004EX	4瓶 (26U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)	1 瓶 (6.5U)
ISK-GN040EX	40瓶 (260U)	10 瓶 (65U)	10 瓶 (65U)	10 瓶 (65U)	10 瓶 (65U)

保存 :

冻干的 HVJ-E : 在冰箱 2°C~8°C 保存, 用铝箔包裹, 保持干燥。

试剂 A, B, C 和缓冲液 : 在 2°C~8°C 冷藏保存。

重悬的 HVJ-E 悬浮液 : 在 2°C~8°C 保存, 2 周内用完。不能冷冻。

[ 每种试剂的作用 ]

- 冻干的 HVJ-E : 包含了能够转移生物大分子的载体的主要框架。与细胞膜融合, 使目标分子进入细胞质。
- 试剂 A : 带有正电荷的多肽, 增加了目标生物大分子与 HVJ-E 的亲合力, 有利于 HVJ-E 包裹生物大分子。
- 试剂 B : 增加跨 HVJ-E 膜的渗透性。
- 试剂 C : 带有正电荷的多肽, 增加 HVJ-E 包裹生物大分子 (HVJ-E 载体) 和细胞 (组织) 的亲合力, 提高转染效率。
- 缓冲液 : 重悬或者稀释 HVJ-E 或者其他目的的中性缓冲液 (生理浓度)。

[ HVJ 悬浮液的制备 (重悬冻干的 HVJ-E) ]

- 含有冻干的 HVJ-E 用冰预冷的缓冲液 (0.26mL) 混匀。用枪头轻轻混匀, 不要产生气泡。这样可以制备均一的悬浮液。如果温度超过 8°C, HVJ-E 的活性会逐渐消失。悬浮液必须立即放置在冰上或者冰箱内 2°C~8°C 保存。

[保存, 稳定性和质量保证]

- 在包裹 HVJ-E 的铝箔上标有冻干的 HVJ-E 的保质期。
- 高温或者潮湿环境会让冻干的 HVJ-E 活性下降, 所以需要该试剂用铝箔密封包装后放在冰箱保存。重悬后, HVJ-E 的悬浮液需要在 2°C~8°C 保存, 在 2 周内使用。反复冻融悬浮液会降低活性, 所以不宜冷冻。
- 我们不能保证过了保质期 HVJ-E 的质量, 请按照操作手册进行保存。也不能保证试剂经药物处理或者表面修饰后的质量。

[质量和安全性]

- HVJ-E 使用 HVJ(仙台病毒)作为原材料, 但 HVJ 的基因组 RNA 已经经药物\*处理后完全灭活了。HVJ-E 在人或者动物上不具有病原性。
- \*文献  
Kaneda, Y. *et al.*: "Non-Viral Vectors for Gene Therapy" , Advances in Genetics, Vol. 53, pp 308-332, Ed. Huang Leaf, Hung Mien-Chie, Wagner Ernst, Academic Press (2005).

Related article:

Prior, C. et al.: BioPharm, 22-33 (Oct. 1996)

! HVJ-E 仍然保留有膜融合的活性。因此防止吸入和吞噬 HVJ-E, 与皮肤, 鼻子和眼睛接触 HVJ-E, 该产品必须在安全的实验室进行操作。需要穿戴合适的衣服 (实验室服) 和防护措施 (塑料或者乳胶手套, 面具, 防护等)。

- 每个批次灭活的 HVJ-E 已经经病毒增殖潜力排除测试 (培养的细胞和受精的鸡蛋)。
- 通过过滤测试确认没有细菌或者病原体的污染。

! 不能保证完全不含有微生物污染, 使用该产品必须按照适当的流程操作。

- 内毒素含量确认低于 2.5EU/mL (鲎试验法检测)
- 在含有血清的培养基中培养的细胞 (BHK-21; ATCC CCL-10), 转染基因后的表达水平已经确认。

[使用次数]

按照此说明书操作, 该产品可使用的次数如下:

货号	每个试剂盒含有的 HVJ-E 的瓶数	转染的生物大分子	
		质粒 DNA, ODN, 蛋白	siRNA (寡核苷酸类型)
ISK-GN001EX	1	6 次 (孔)	25~50 次 (孔)
ISK-GN004EX	4	25 次 (孔)	100~200 次 (孔)
ISK-GN040EX	40	250 次 (孔)	1000~2000 次 (孔)

## 2. 试剂盒内的操作方法

操作方法介绍了该产品用于贴壁细胞，悬浮细胞和动物的转染，也介绍了用于多样品的快速操作方法。

具体的流程取决于转移的生物大分子和转移的靶向。该操作方法介绍了不同的生物大分子转移不同靶向的流程。步骤有所区别，主要取决于生物大分子的种类和浓度。

### 2-1：单位的定义（AU：活性单位）

HVJ-E 的数量用 AU 表示（活性单位）。1 个 AU 代表在使用 6 孔板培养细胞时，转染质粒 DNA 用到的标准数量（40ul）。

### 2-2：每孔推荐的细胞密度

操作方法上写的是 6 孔板内培养细胞的密度。其他多孔板的密度如下：

#### 2-2-1：贴壁细胞

板的规格	细胞密度（接种在细胞板上时*）
6孔板	0.4~2.0×10 <sup>5</sup> 细胞/2.0mL培养基/孔
24孔板	1.0~5.0×10 <sup>4</sup> 细胞/0.5mL培养基/孔
96孔板	0.25~1.25×10 <sup>4</sup> 细胞/0.125mL培养基/孔

\*1天培养细胞达到50%~80%汇合度时转染。

#### 2-2-2：悬浮细胞

当转染悬浮细胞时，在管内细胞和HVJ-E载体混合。离心，促使细胞和HVJ-E载体充分接触，提高转染的效率。

板的规格	细胞密度		
	离心（管子）	重悬的培养基	接种在细胞板的密度
6孔板	0.4~2.0×10 <sup>6</sup> 细胞/0.5mL培养基/管	2.0mL	0.4~2.0×10 <sup>6</sup> 细胞/2.0mL培养基/孔
24孔板	0.2~1.0×10 <sup>6</sup> 细胞/0.25mL培养基/管	1.0mL	1.0~5.0×10 <sup>5</sup> 细胞/0.5mL培养基/孔
96孔板			0.25~1.25×10 <sup>5</sup> 细胞/0.125mL培养基/孔

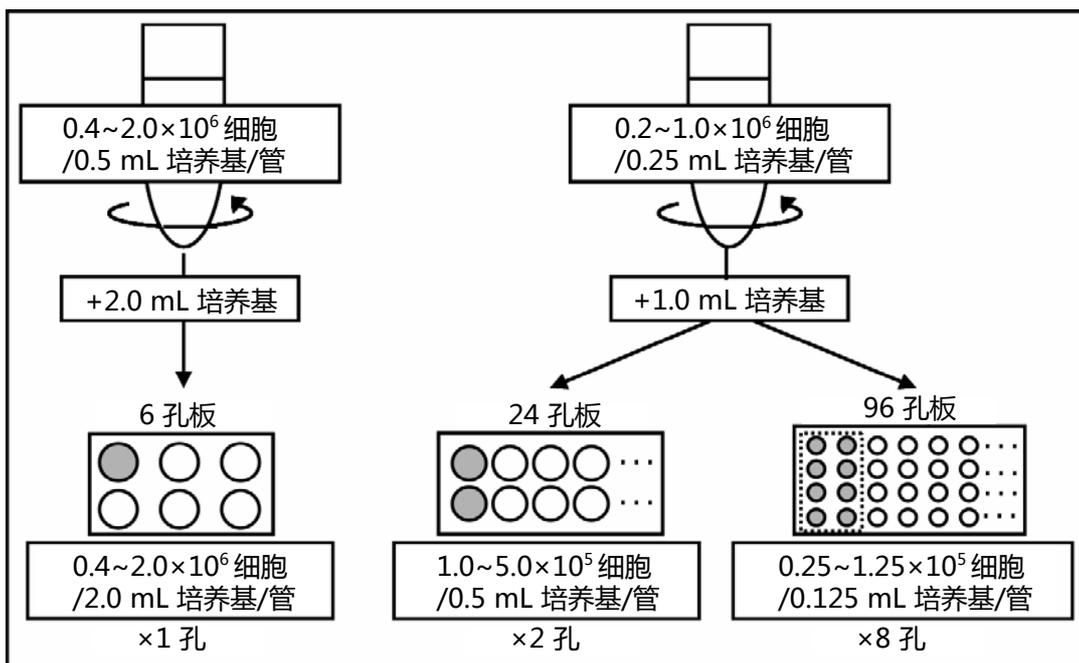


Fig. 2 悬浮细胞的转染

### 3. 贴壁细胞的转染

#### 3-1: 质粒 DNA 的转移

##### 3-1-1: 推荐流程

下面的流程适合于 6 孔板的实验（每个孔的操作流程）。其他多孔板的细胞密度见 P5。

- 推荐的 DNA/TE 溶液的浓度：2~4ug/ul
- 细胞密度：0.4~2.0×10<sup>5</sup> 细胞/2.0mL 培养基/孔（6 孔板）
- 操作流程（方法 2）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

用冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到冻干的 HVJ-E。用枪头轻轻混匀，避免产生气泡。获得均一的溶液后放置在冰箱保存。使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂和管子都必须在冰上充分冰浴。接着按照下面步骤制备载体。

步骤（维持在0°C~8°C）		试剂的用量	
包装	(1)	HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
	(3)	加入DNA/TE溶液重悬HVJ-E（用枪头搅拌20~30次似的悬浮液变成均一白色）	DNA/TE溶液：10~20ul
	(4)	加入试剂B，搅拌 <sup>1</sup> （轻拍管子）	试剂B：1~2ul
	(5)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉淀物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体）	缓冲液：30ul
	(7)	加入试剂C，搅拌 <sup>3</sup> （轻拍管子）	试剂C：5ul
	(8)	在每个孔内，HVJ-E悬浮液和细胞培养基混匀，在5%CO <sub>2</sub> ，37°C孵育（如果需要，可以更换培养基） <sup>4</sup>	重悬 ( (6) + (7) )：35ul
	(9)	5%CO <sub>2</sub> ，37°C孵育	

步骤（1）到步骤（7）应该在冰上操作。

- 各种规格板的试剂用量（每个孔）

板的规格	包裹步骤			转染步骤		
	HVJ-E (1)	DNA/TE溶液 (3)	试剂B (4)	缓冲液 (6)	试剂C (7)	处理的HVJ用量
6孔板	1AU (40ul)	20ul	2ul	30ul	5ul	35ul×1孔
24孔板	0.5AU (20ul)	10ul	1ul	15ul	2.5ul	8ul×2孔
96孔板	0.5AU (20ul)	10ul	1ul	15ul	2.5ul	2ul×8孔

<sup>1</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>2</sup> 当用缓冲液重悬沉淀物时，轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮物变成均一白色。剧烈震荡应该避免，防止产生气泡。建议用枪头混匀。

<sup>3</sup> 试剂 C 的优化浓度取决于细胞的类型。建议根据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量（2.5~25ul）。缓冲液（步骤 6）的体积调整到最终悬浮液体积达到 35ul。

<sup>4</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液（步骤（6）+（7））后不需要更换培养基。如果观察到有细胞状态不好，加入 HVJ-E 载体悬浮液后10分钟~3小时更换培养基。

### 3-1-2 : 低浓度 DNA 的操作流程

如果 DNA/TE 溶液的浓度低于推荐的浓度 ( 0.5~2ug/ul ), 加入试剂 A。试剂 A 可以促进 DNA 包裹进 HVJ-E。以下是 6 孔板的操作 ( 每孔的操作流程 )。其他规格板子的细胞密度见 P5。

- 推荐 DNA/TE 的浓度 : 0.5~2ug/ul。
- 细胞密度 : 0.4~2.0×10<sup>5</sup> 细胞/2.0mL 培养基/孔 ( 6 孔板 )
- 操作流程 ( 方法 1 )

#### HVJ-E 悬浮液的制备 ( 重悬冻干的 HVJ-E )

冰预冷的缓冲液 ( 0.26mL ) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 ( 维持在 0°C~8°C )			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 1AU ( 40ul )
	(2)	加入试剂 A, 搅拌(轻拍管子)。在冰上放置 5 分钟。	试剂 A : 10ul
	(3)	加入 DNA/TE 溶液重悬 ( 轻拍管子 )	DNA/TE 溶液 : 10ul
	(4)	加入试剂 B, 搅拌 <sup>5</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 B : 6ul
	(5)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉积物用缓冲液重悬 ( 用枪头搅匀 20~30 次直到形成均一白色的液体 ) <sup>6</sup>	缓冲液 : 30ul
	(7)	加入试剂 C, 搅拌 <sup>7</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 C : 5ul
	(8)	在每个孔内, HVJ-E 悬浮液和细胞培养基混匀, 在 5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育 ( 如果需要, 可以更换培养基 ) <sup>8</sup>	重悬 ( ( 6 ) + ( 7 ) ) : 35ul
	(9)	5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育	

步骤 ( 1 ) 到 ( 7 ) 应该在冰上操作。

#### ■ 各种规格板的试剂用量 ( 每个孔 )

板的规格	包裹步骤				转染步骤		
	HVJ-E ( 1 )	试剂 A ( 2 )	DNA/TE 溶液 ( 3 )	试剂 B	缓冲液 ( 6 )	试剂 C ( 7 )	处理的 HVJ 用量
6孔板	1AU ( 40ul )	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	35ul×1孔
24孔板	0.5AU ( 20ul )	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	8ul×2孔
96孔板	0.5AU ( 20ul )	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	2ul×8孔

<sup>5</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>6</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 ( 避免产生气泡 ) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>7</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量 ( 2.5~25ul )。缓冲液的体积 ( 步骤 ( 6 ) 调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>8</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液 ( 步骤 ( 6 ) + ( 7 ) ) 后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好, 在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

### 3-2 : 转染 siRNA

由于 siRNA ( 寡核苷酸类型 ) 具有胞质活性以及活性具有特异性, 所以可低浓度使用。HVJ-E 的用量可减少到质粒 DNA 的 1/4~1/8 ( 0.25~0.125AU )。下面提供 6 孔板的操作。其他规格板的细胞密度见 P5。

- 推荐的 siRNA ( 寡核苷酸类型 ) 的浓度 : 0.1~0.5ug/ul
- 细胞密度 : 0.4~2.0×10<sup>5</sup> 细胞/2.0mL 培养基 /孔 ( 6 孔板 )
- 操作方法 ( 见 siRNA 方法 )

#### HVJ-E 悬浮液的制备 ( 重悬冻干的 HVJ-E )

冰预冷的缓冲液 ( 0.26mL ) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 ( 维持在 0°C~8°C )			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 0.25AU ( 10ul )
	(2)	与 siRNA 溶液混合, 搅拌 <sup>9</sup> ( 轻拍管子 )。	siRNA 溶液 : 10ul
	(3)	与试剂 B 混合, 搅拌 <sup>10</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 B : 2ul
	(4)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
转染	(5)	沉积物用缓冲液重悬 ( 用枪头搅匀 20~30 次直到形成均一白色的液体 ) <sup>6</sup>	缓冲液 : 30ul
	(6)	加入试剂 C, 搅拌 <sup>12</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 C : 5ul
	(7)	在每个孔内, HVJ-E 悬浮液和细胞培养基混匀, 在 5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育 ( 如果需要, 可以更换培养基 ) <sup>13</sup>	重悬 ( ( 6 ) + ( 7 ) ) : 35ul
	(8)	5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育	

步骤 ( 1 ) 到步骤 ( 6 ) 均需在冰上操作。

#### ■ 各个规格板的试剂用量 ( 每个孔 )

板的规格	包裹步骤			转染步骤		
	HVJ-E ( 1 )	siRNA 溶液 ( 2 )	试剂 B ( 3 )	缓冲液 ( 5 )	试剂 C ( 6 )	处理的 HVJ 用量 ( 7 )
6 孔板	0.25AU ( 10ul )	10ul	2ul	30ul	5ul	35ul×1 孔
24 孔板	0.125AU ( 5ul )	5ul	1ul	15ul	2.5ul	8ul×2 孔
96 孔板	0.125AU ( 5ul )	5ul	1ul	15ul	2.5ul	2ul×8 孔

#### ● 优化建议

HVJ-E 的用量取决于细胞的类型和目标基因。如果转移或者敲除的效率低, 调整在步骤 1 HVJ-E 的用量 ( 1AU ( 40ul ) ~0.125AU ( 5ul ) )。同时, 添加的试剂 B 需要调整到添加 ( 步骤 1+2 ) 前液体体积的 1/10

<sup>9</sup> 添加的试剂 B 相当于添加 ( 步骤 3 ) 前液体体积的 1/10。

<sup>10</sup> 添加的试剂 B 相当于添加 ( 步骤 3 ) 前液体体积的 1/10。

<sup>11</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 ( 避免产生气泡 ) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>12</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量 ( 2.5~25ul )。缓冲液的体积 ( 步骤 ( 6 ) 调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>13</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液 ( 步骤 ( 6 ) + ( 7 ) ) 后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好, 在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

### 3-3 : 反义/诱饵 寡聚脱氧核苷酸 (ODN)

下面提供的 6 孔板的操作 (每个孔的操作流程)。其他规格板的细胞密度见P5。

- 推荐的 ODN 浓度 : 0.5~2ug/ul
- 细胞密度 : 0.4~2.0×10<sup>5</sup> 细胞/2.0mL 培养基/孔 (6 孔板)
- 操作方法 (见方法 1)

### HVJ-E 悬浮液的制备 (重悬冻干的 HVJ-E)

冰预冷的缓冲液 (0.26mL) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。

使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 (维持在 0°C~8°C)			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 1AU (40ul)
	(2)	与试剂A混合, 搅拌 (轻拍管子)。冰上放置5分钟。	试剂A : 10ul
	(3)	加入DNA/TE溶液重悬HVJ-E (轻拍管子)	DNA/TE溶液 : 10ul
	(4)	加入试剂B, 搅拌 <sup>14</sup> (轻拍管子)	试剂B : 6ul
	(5)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉积物用缓冲液重悬 (用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体) <sup>15</sup>	缓冲液 : 30ul
	(7)	加入试剂C, 搅拌 <sup>16</sup> (轻拍管子)	试剂C : 5ul
	(8)	在每个孔内, HVJ-E 悬浮液和细胞培养基混匀, 在5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育 (如果需要, 可以更换培养基) <sup>17</sup>	重悬 ( (6) + (7) ) : 35ul
	(9)	5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育	

步骤 (1) 到步骤 (7) 应该在冰上操作。

### ■ 各个规格板的试剂用量 (每个孔的用量)

板的规格	包裹步骤				转染步骤		
	HVJ-E (1)	试剂A (2)	ODN溶液 (3)	试剂B	缓冲液 (6)	试剂C (7)	处理的HVJ用量 (8)
6孔板	1AU (40ul)	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	35ul×1孔
24孔板	0.5AU (20ul)	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	8ul×2孔
96孔板	0.5AU (20ul)	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	2ul×8孔

<sup>14</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>15</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 (避免产生气泡) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>16</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量 (2.5~25ul)。缓冲液的体积 (步骤 (6) 调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>17</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液 (步骤 (6) + (7)) 后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好, 在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

### 3-4 : 转移蛋白

下面提供 6 孔板的操作（每个孔的操作流程）。其他规格板的细胞密度见P5。

- 推荐的蛋白浓度：0.5~2ug/ul
- 细胞密度：0.4~2.0×10<sup>5</sup> 细胞/2.0mL 培养基/孔（6 孔板）
- 操作方法（见方法 1）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。

使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（维持在0°C~8°C）		试剂的用量	
包裹	(1)	HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
	(3)	用缓冲液重悬沉积物（用枪头搅拌20~30次似的悬浮液变成均一白色） <sup>18</sup>	缓冲液：40ul
	(4)	加入试剂A，搅拌（轻拍管子），在冰上放置5分钟。	试剂A：10ul
	(5)	加入蛋白溶液，搅拌（轻拍管子）	蛋白溶解：10ul
	(6)	加入试剂B，搅拌 <sup>19</sup> （轻拍管子）	试剂B：6ul
	(7)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
转染	(8)	沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体）	缓冲液：30ul
	(9)	加入试剂C，搅拌 <sup>20</sup> （轻拍管子）	试剂C：5ul
	(10)	在每个孔内，HVJ-E悬浮液和细胞培养基混匀，在5%CO <sub>2</sub> ，37°C 孵育（如果需要，可以更换培养基） <sup>21</sup>	重悬 （（6）+（7））：35ul
	(11)	5%CO <sub>2</sub> ，37°C孵育	

步骤（1）到步骤（9）在冰上操作。

步骤（2）和步骤（3）为了去除冻干HVJ-E含有的防腐剂。

#### ■ 各个规格板的试剂用量（每个孔的用量）

板的规格	包裹步骤				转染步骤		
	HVJ-E（3）	试剂A（4）	蛋白溶液（5）	试剂B（6）	缓冲液（6）	试剂C（9）	处理的HVJ用量
6孔板	1AU（40ul）	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	35ul×1孔
24孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	8ul×2孔
96孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	2ul×8孔

#### ● 优化建议

当使用带正电荷的蛋白时，在包裹步骤（2）减少加入的试剂A的用量（1/2~1/8）或者不加试剂A。同时，在步骤（4）加入的试剂B需要调整到添加（步骤（3）+（4）+（5））前液体体积的1/10。

<sup>18</sup> 用缓冲液重悬沉积物时，必须轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>19</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>20</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依细胞类型调整添加的试剂 C 的用量（2.5~25ul）。缓冲液的体积（步骤（8））调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>21</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液（步骤（8）+（9））后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好，在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

### 3-5 : 问题

#### ■ 转染低效率

建议根据下面内容优化实验，提高转染效率：

- 按照正常用量的 2~4 倍提高试剂 C 的用量。
- 减少转染用的培养基，增加 HVJ-E 载体和试剂 C 的浓度。
- 35°C离心板内的 HVJ-E 载体和细胞混合物 1,500~3,000rpm ，离心 10~60 分钟（有些细胞的温度从 4°C~室温）
- 检查核酸的纯度。用于转染的质粒 DNA 应该是高质量的。通过特定的纯化方式应该去除转染 DNA 的内毒素。

#### ■ 高细胞毒性

如果观察到任何细胞毒性（即细胞状态不好），细胞毒性应通过下列步骤去除：

- HVJ-E 载体加入细胞后 10 分钟~3 小时洗涤 HVJ-E 载体，更换培养基。
- 减少 HVJ-E 的用量或者添加到培养基的 HVJ-E 载体的量。
- 选用适当方法减少内毒素含量。

## 4. 悬浮细胞的转染

### 4-1：质粒 DNA 的转移

#### 4-1-1：推荐流程

进行悬浮细胞转染时，HVJ-E 和细胞的混合物为了增加接触的机会需要离心。下面提供的是 6 孔板的操作方式。其他规格板的细胞密度见 P5。

- 推荐的 DNA/TE 溶液的浓度：2~4ug/ul
- 细胞密度：0.4~2.0×10<sup>6</sup> 细胞/0.5mL 培养基/管
- 操作流程（方法 2，改订版）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。

使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（维持在 0°C~8°C）			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
	(3)	加入 DNA/TE 溶液重悬 (用枪头搅拌 20~30 次甚至更多，直到悬浮液变成均一白色)	DNA/TE 溶液：10ul~20ul
	(4)	加入试剂 B，搅拌 <sup>22</sup> （轻拍管子）	试剂 B：1~2ul
	(5)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀 20~30 次直到形成均一白色的液体） <sup>23</sup>	缓冲液：30ul
	(7)	加入试剂 C，搅拌 <sup>24</sup> （轻拍管子）	试剂 C：5ul
	(8)	HVJ-E 载体与重悬在管内的细胞（含有培养基 0.5mL）混合。	重悬（（6）+（7））： 35ul+细胞：0.5mL
	(9)	在 4°C~35°C 离心 2,000~12,000rpm 10~30 分钟 <sup>25</sup>	
	(10)	去上清。细胞用 2.0mL 培养基重悬，转移到 6 孔板内，在 37°C，5% CO <sub>2</sub> 培养。	重悬培养基：2.0mL

步骤（1）到步骤（7）应该在冰上操作。

- 各个规格板的试剂用量（每个孔的用量）

板的规格	包裹步骤			转染步骤			
	HVJ-E (1)	DNA/TE (3)	试剂 B (4)	缓冲液 (6)	试剂 C (7)	细胞 (8)	重悬培养基 (10)
6孔板	1AU (40ul)	20ul	2ul	30ul	5ul	0.5ml	2.0mL (2.0mL×1孔)
24孔板	0.5AU (20ul)	10ul	1ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL (0.5mL×2孔)
96孔板	0.5AU (20ul)	10ul	1ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL (0.125mL×8孔)

<sup>22</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>23</sup> 用缓冲液重悬沉积物时，必须轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>24</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量（2.5~25ul）。缓冲液的体积（步骤（6）调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>25</sup> 离心的条件（速率，温度和持续时间）应该根据离心对细胞损伤进行调整。

#### 4-1-2 : 低浓度 DNA 的转染流程

如果 DNA/TE 溶液的浓度低于推荐的浓度 ( 0.5~2ug/ul ), 可使用试剂 A。试剂 A 可促进 DNA 包裹进 HVJ-E。以下是 6 孔板的操作。其他规格板子的细胞密度见 P5。

- 推荐 DNA/TE 的浓度 : 0.5~2ug/ul。
- 细胞密度 : 0.4~2.0×10<sup>6</sup> 细胞/0.5mL 每孔培养基/管
- 操作流程 ( 方法 1 )

#### HVJ-E 悬浮液的制备 ( 重悬冻干的 HVJ-E )

冰预冷的缓冲液 ( 0.26mL ) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 ( 维持在 0°C ~ 8°C )		试剂的用量	
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 1AU ( 40ul )
	(2)	加入试剂 A, 搅拌(轻拍管子)。在冰上放置 5 分钟。	试剂 A : 10ul
	(3)	加入 DNA/TE 溶液重悬 HVJ-E ( 轻拍管子 )	DNA/TE 溶液 : 10ul
	(4)	加入试剂 B, 搅拌 <sup>26</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 B : 6ul
	(5)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉积物用缓冲液重悬 ( 用枪头搅匀 20~30 次直到形成均一白色的液体 ) <sup>27</sup>	缓冲液 : 30ul
	(7)	加入试剂 C, 搅拌 <sup>28</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 C : 5ul
	(8)	HVJ-E 载体悬浮液与管内的细胞 ( 重悬在 0.5mL 培养内 ) 混合。	重悬 ( ( 6 ) + ( 7 ) ) : 35ul + 细胞 : 0.5mL
	(9)	在 4°C ~ 35°C 离心 2,000~12,000rpm 10~30 分钟 <sup>29</sup> 。	
	(10)	去除上清。细胞用 2.0mL 培养基重悬, 转移到 6 孔板内, 5%CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育。	重悬培养基 : 2.0mL

步骤 ( 1 ) 到 ( 7 ) 应该在冰上操作。

- 各个规格板的试剂用量 ( 每个孔的试剂用量 )

板的规格	包裹步骤				转染步骤			
	HVJ-E ( 1 )	试剂 A ( 2 )	DNA/TE 溶液 ( 3 )	试剂 B	缓冲液 ( 6 )	试剂 C ( 7 )	细胞 ( 8 )	重悬培养基 ( 10 )
6孔板	1AU ( 40ul )	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	0.5ml	2.0mL ( 2.0mL×1孔 )
24孔板	0.5AU ( 20ul )	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL ( 0.5mL×2孔 )
96孔板	0.5AU ( 20ul )	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL ( 0.125mL×8孔 )

<sup>26</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>27</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 ( 避免产生气泡 ) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>28</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量 ( 2.5~25ul )。缓冲液的体积 ( 步骤 ( 6 ) 调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>29</sup> 离心的条件 ( 速率, 温度和持续时间 ) 应该根据离心对细胞损伤进行调整。

#### 4-2 : siRNA 的转移

由于 siRNA ( 寡核苷酸类型 ) 具有胞质活性以及活性具有特异性, 所以可低浓度使用。HVJ-E 的用量可减少到质粒 DNA 的 1/4~1/8 ( 0.25~0.125AU )。下面提供的 6 孔板的操作。其他规格板的细胞密度见 P5。

- 推荐的 siRNA ( 寡核苷酸类型 ) 的浓度 : 0.1~0.5ug/ul
- 细胞密度 : 0.4~2.0×10<sup>6</sup> 细胞/0.5mL 培养基/管
- 操作方法 ( 见 siRNA 方法, 改订版 )

#### HVJ-E 悬浮液的制备 ( 重悬冻干的 HVJ-E )

冰预冷的缓冲液 ( 0.26mL ) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 ( 维持在 0°C~8°C )		试剂的用量	
包裹	(1)	HVJ-E 悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 0.25AU ( 10ul )
	(2)	与 siRNA 溶液混合, 搅拌 ( 轻拍管子 )。	siRNA 溶液 : 10ul
	(3)	与试剂 B 混合, 搅拌 <sup>30</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 B : 2ul
	(4)	在 4°C 离心 10,000g (10,000~12,000rpm) 5 分钟。去除上清。	
转染	(5)	沉积物用缓冲液重悬 ( 用枪头搅匀 20~30 次直到形成均一白色的液体 ) <sup>31</sup>	缓冲液 : 30ul
	(6)	加入试剂 C, 搅拌 <sup>32</sup> ( 轻拍管子 )	试剂 C : 5ul
	(7)	HVJ-E 载体悬浮液与重悬在 0.5mL 培养基内的细胞在管子内混匀。	重悬 ( ( 6 ) + ( 7 ) ) : 35ul + 细胞 0.5mL
	(8)	在 4°C~35°C 离心 2,000~12,000rpm 10~30 分钟 <sup>33</sup> 。	
	(9)	去除上清。细胞用 0.2mL 培养基重悬后转移到 6 孔板内, 5% CO <sub>2</sub> , 37°C 孵育	重悬培养基 : 2.0mL

步骤 ( 1 ) 到步骤 ( 6 ) 均需在冰上操作。

- 各个规格板的试剂用量 ( 每个孔的试剂用量 )

板的规格	包裹步骤			转染步骤			
	HVJ-E ( 1 )	siRNA 溶液 ( 2 )	试剂 B ( 3 )	缓冲液 ( 5 )	试剂 C ( 6 )	细胞 ( 7 )	重悬培养基 ( 9 )
6孔板	0.25AU ( 10ul )	10ul	2ul	30ul	5ul	0.5ml	2.0mL ( 2.0mL×1孔 )
24孔板	0.125AU ( 5ul )	5ul	1ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL ( 0.5mL×2孔 )
96孔板	0.125AU ( 5ul )	5ul	1ul	15ul	2.5ul	0.25ml	1.0mL ( 0.125mL×8孔 )

#### ● 优化建议

HVJ-E 的用量取决于细胞的类型和目标基因。如果转移或者敲除的效率低, 调整在步骤 1 HVJ-E 的用量 ( 1AU ( 40ul ) ~0.125AU ( 5ul ) )。同时, 添加的试剂 B 需要调整到添加 ( 步骤 1+2 ) 前液体体积的 1/10

<sup>30</sup> 添加的试剂 B 相当于添加 ( 步骤 3 ) 前液体体积的 1/10。

<sup>31</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 ( 避免产生气泡 ) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>32</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量 ( 2.5~25ul )。缓冲液的体积 ( 步骤 ( 6 ) ) 调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>33</sup> 离心的条件 ( 速率, 温度和持续时间 ) 应该根据离心对细胞损伤进行调整。

#### 4-3 : 转移反义/诱饵 寡聚脱氧核苷酸 (ODN)

下面提供的 6 孔板的操作。其他规格板的细胞密度见 P5。

- 推荐的 ODN 浓度：0.5~2ug/ul
- 细胞密度：0.4~2.0×10<sup>6</sup> 细胞/0.5mL 培养基/管
- 操作方法（见方法 1，修改）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。

使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（维持在0°C~8°C）			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	与试剂A混合，搅拌（轻拍管子）。冰上放置5分钟。	试剂A：10ul
	(3)	加入ODN溶液重悬HVJ-E（轻拍管子）	DNA/TE溶液：10ul
	(4)	加入试剂B，搅拌 <sup>34</sup> （轻拍管子）	试剂B：6ul
	(5)	在4°C离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
转染	(6)	沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体） <sup>35</sup>	缓冲液：30ul
	(7)	加入试剂C，搅拌 <sup>36</sup> （轻拍管子）	试剂C：5ul
	(8)	HVJ载体悬浮液和在0.5mL培养基中重悬的细胞在管内混合	重悬（（6）+（7））： 35ul+细胞：0.5mL
	(9)	在4°C~35°C中离心2,000~12,000rpm 10~30分钟。 <sup>37</sup>	
	(10)	去除上清。细胞在2.0mL中重悬后转移到6孔板内，5%CO <sub>2</sub> ，37°C孵育。	重悬培养基：2.0mL

步骤（1）到步骤（7）应该在冰上操作。

- 各个规格板的试剂用量（每个孔的试剂用量）

板的规格	包裹步骤				转染步骤			
	HVJ-E（1）	试剂A（2）	ODN溶液（3）	试剂B（4）	缓冲液（6）	试剂C（7）	细胞（8）	重悬的培养基（10）
6孔板	1AU（40ul）	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	0.5mL	2.0mL （2.0mL × 1孔）
24孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25mL	1.0mL （0.5mL × 2孔）
96孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25mL	1.0mL （0.125mL × 8孔）

<sup>34</sup> 添加的试剂 B 相当于添加(步骤 3)前液体体积的 1/10。

<sup>35</sup> 用缓冲液重悬沉积物时，必须轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>36</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量（2.5~25ul）。缓冲液的体积（步骤（6）调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>37</sup> 离心的条件（速率，温度和持续时间）应该根据离心对细胞损伤进行调整。

#### 4-4：转移蛋白

下面提供的 6 孔板的操作。其他规格板的细胞密度见 P5。

- 推荐的蛋白浓度：0.5~2ug/ul
- 细胞密度：0.4~2.0×10<sup>6</sup> 细胞/0.5mL 培养基/管
- 操作方法（见方法 1，修改版）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（维持在0℃~8℃）			试剂的用量
包裹	(1)	HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	在4℃离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
	(3)	用缓冲液重悬沉积物（用枪头搅拌20~30次似的悬浮液变成均一白色） <sup>38</sup>	缓冲液：40ul
	(4)	加入试剂A，搅拌（轻拍管子），在冰上放置5分钟。	试剂A：10ul
	(5)	加入蛋白溶液，搅拌（轻拍管子）	蛋白溶液：10ul
	(6)	加入试剂B，搅拌 <sup>39</sup> （轻拍管子）	试剂B：6ul
	(7)	在4℃离心10,000g(10,000~12,000rpm)5分钟。去除上清。	
转染	(8)	沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体）	缓冲液：30ul
	(9)	加入试剂C，搅拌 <sup>40</sup> （轻拍管子）	试剂C：5ul
	(10)	HVJ载体悬浮液和在0.5mL培养基中重悬的细胞在管内混合	重悬（（8）+（9））： 35ul+细胞：0.5mL
	(11)	在4℃~35℃中离心2,000~12,000rpm 10~30分钟 <sup>41</sup> 。	
	(12)	去除上清。细胞在2.0mL中重悬后转移到6孔板内，5%CO <sub>2</sub> ，37℃孵育。	重悬培养基：2.0mL

步骤（1）到步骤（9）在冰上操作。

步骤(2)和步骤（3）是为了去除冻干HVJ-E含有的防腐剂。

#### ■ 各个规格板的试剂用量（每个孔的试剂用量）

板的规格	包裹步骤				转染步骤			
	HVJ-E（3）	试剂A（4）	蛋白溶液（5）	试剂B（6）	缓冲液（6）	试剂C（9）	细胞（10）	重悬的培养基（12）
6孔板	1AU（40ul）	10ul	10ul	6ul	30ul	5ul	0.5mL	2.0mL （2.0mL×1孔）
24孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25mL	1.0mL （0.5mL×2孔）
96孔板	0.5AU（20ul）	5ul	5ul	3ul	15ul	2.5ul	0.25mL	1.0mL （0.125mL×8孔）

#### ● 优化建议

当使用带正电荷的蛋白时，在包裹步骤（2）减少加入的试剂A的用量（1/2~1/8）或者不加试剂A。同时，在步骤（4）加入的试剂B需要调整到添加（步骤（3）+（4）+（5））前液体体积的1/10。

<sup>38</sup> 用缓冲液重悬沉积物时，必须轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

<sup>39</sup> 添加的试剂 B 相当于添加（步骤 3）前液体体积的 1/10。

<sup>40</sup> 根据细胞类型优化试剂 C 的浓度。可依据细胞类型调整添加的试剂 C 的用量（2.5~25ul）。缓冲液的体积（步骤（8）调整到最终悬浮液的体积达到 35ul。

<sup>41</sup> 离心的条件（速率，温度和持续时间）应该根据离心对细胞损伤进行调整。

#### 4-5 : 问题

##### ■ 转染低效率

建议根据下面内容优化实验，提高转染效率：

- 按照正常用量的 2~4 倍提高试剂 C 的用量。
- 减少转染用的培养基，增加 HVJ-E 载体和试剂 C 的浓度。
- 延长 HVJ-E 载体和细胞的离心时间至大约 60 分钟。
- 检查核酸的纯度。用于转染的质粒 DNA 应该是高质量的。通过特定的纯化方式应该去除转染 DNA 的内毒素。

##### ■ 高细胞毒性

如果观察到任何细胞毒性（即细胞状态不好），细胞毒性应通过下列步骤去除：

- 减少 HVJ-E 载体添加到细胞后离心的时间（10 分钟），离心温度设置为 4°C。
- 减少 HVJ-E 的用量或者添加到培养基的 HVJ-E 载体用量。
- 减少试剂 C 的用量（或不使用试剂 C）
- 选用适当方法减少内毒素含量。

## 5. 实验动物的转染（体内实验）

以下提供了转染小鼠器官或者组织（直接注射到器官或者组织）的操作方法。不同的物种，注射的方法、剂量、目标器官的注射位置和类型等都会变化。

### 5-1：质粒 DNA 或者 siRNA 的转移

- 推荐的 DNA/TE 浓度：1ug/ul
- 推荐的 siRNA 浓度：1ug/ul
- 操作流程（体内方法 M）

#### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（维持在0°C~8°C）		试剂的用量	
包裹	(1)	HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：1AU（40ul）
	(2)	加入试剂B，搅拌 <sup>42</sup> （轻拍管子）	试剂B：4ul
	(3)	在4°C离心10,000g（10,000~12,000rpm）10分钟。去除上清。	
	(4)	沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体） <sup>43</sup>	缓冲液，生理盐水或者类似：10ul
	(5)	加入DNA/TE溶液或者siRNA溶液，搅拌（轻拍管子）	DNA/TE或者siRNA溶液：10ul
	(6)	静置5分钟	
注射	(7)	HVJ-E载体悬浮液注射动物（如果需要可用生理盐水等稀释）	剂量：需要根据注射的动物调整
	(8)	评估（样品制备，显微镜镜检等）	

步骤（1）至步骤（6）应该在冰上操作。

#### ● 优化建议

HVJ 的用量大概小鼠 1~2AU，大鼠 5~10AU。根据使用的 HVJ-E 用量调整上述步骤用到的每个试剂。

依据实验体系的特点（注射部位，注射路线等），剂量需要根据添加的缓冲液，生理盐水，或者 HVJ-E 载体悬浮液等（步骤（6））进行调整。

当该产品用于动物时，建议不要使用试剂 C。如果需要在注射部位附件的组织保留导入的生物大分子，可以将试剂 C 添加到 HVJ-E 悬浮液中（步骤（6））。

由于 HVJ-E 容易被血液细胞吸收，接着在体内灭活。所以建议选择与血液接触少的注射路径（直接注射器官或者组织），或者注射前先灌流动物。

<sup>42</sup> 添加的试剂 B 相当于添加（步骤 3）前液体体积的 1/10。

<sup>43</sup> 用缓冲液重悬沉积物时，必须轻柔混匀（避免产生气泡）直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

## 5-2 : 转移反义/诱饵 寡聚脱氧核苷酸 (ODN) 和蛋白

- 推荐的 ODN 浓度 : 0.5~2ug/ul
- 推荐的蛋白浓度 : 0.5~2ug/ul
- 操作流程 (体内应用方法 1)

### HVJ-E 悬浮液的制备 (重悬冻干的 HVJ-E)

冰预冷的缓冲液 (0.26mL) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 (维持在0°C~8°C)		试剂的用量
包裹	(1) HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 1AU (40ul)
	(2) 与试剂A混合, 搅拌 (轻拍管子), 静置5分钟。	试剂A : 10ul
	(3) 与ODN或者蛋白溶液混合, 搅拌 (轻拍管子)	ODN或者蛋白溶液 : 10ul
	(4) 加入试剂B, 搅拌 <sup>44</sup> (轻拍管子)	试剂B : 6ul
	(5) 在4°C离心10,000g (10,000~12,000rpm) 10分钟。去除上清。	
注射	(6) 沉积物用缓冲液重悬 (用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体) <sup>45</sup>	使用缓冲液, 生理盐水, 或者类似试剂, 根据实验体系调整。
	(7) HVJ-E载体悬浮液注射动物 (如果需要可用生理盐水等稀释)	剂量 : 根据注射的动物调整
	(8) 评估 (样品制备, 显微镜镜检等)	

步骤 (1) 到步骤 (6) 应该在冰上操作。

为了使病毒包膜蛋白更好的包裹蛋白, 防腐剂必须通过离心方式去除包裹步骤的步骤 (1) 到步骤 (3) (P10)

### ● 优化建议

HVJ 的用量大概小鼠 1~2AU, 大鼠 5~10AU。根据使用的 HVJ-E 的用量调整上述步骤用到的每个试剂。

根据实验体系的特点 (注射部位, 注射路线等), 剂量需要根据添加的缓冲液, 生理盐水, 或者 HVJ-E 载体悬浮液等进行调整。(步骤 (6))

当该产品用于动物时, 建议不要使用试剂 C。如果需要在注射部位附近组织保留导入的生物大分子, 可以将试剂 C 添加到 HVJ-E 悬浮液中 (步骤 (6))。

由于 HVJE 容易被血液细胞吸收, 接着在体内灭活。所以建议选择与血液接触少的注射路径 (直接注射器官或者组织), 或者注射前先灌流动物。

为了防止在步骤 (3) 产生混浊或不均一的沉积物, 试着提高加入 ODN/蛋白的纯度, 减少试剂 A (步骤 (2)) 的用量到 1/2~1/8 或者不使用试剂 A。同时, 试剂 B (步骤 (4)) 的用量需要调整添加 (步骤 (1)+(2)+(3)) 前体积的 1/10。

当使用带正电荷的蛋白时, 尽量减少添加的试剂 A (包裹步骤 (2)) 的用量到 1/2 到 1/8 或不添加试剂 A。同时, 在步骤 (4) 添加的试剂 B 的用量需要调整到添加 (步骤 (1)+步骤 (2)+步骤 (3)) 前体积的 1/10。

<sup>44</sup> 添加的试剂 B 相当于添加 (步骤 3) 前液体体积的 1/10。

<sup>45</sup> 用缓冲液重悬沉积物时, 必须轻柔混匀 (避免产生气泡) 直到悬浮液变成均一白色。剧烈震荡会引起气泡。建议用枪头进行混匀。

## 6. 快速转染多样品

在包裹生物大分子之前用试剂 B 处理 HVJ-E，能够制备感受态 HVJ-E，可以用 HVJ-E 快速包裹各种内生物大分子。比如使用 96 孔板，转染 96 种不同的生物大分子，可以在 30 分钟内完成。该技术可用于高通量筛选，包括多种基因，比如 siRNA，可在同一块板上进行转染后细胞功能分析或者新基因的研究。

如果使用其他规格的板子，用该产品进行的转染需要根据每个孔的面积比率进行调整。

### 6-1：质粒 DNA 的转移

- DNA/TE 溶液浓度：0.1~0.25ug/ul
- 细胞密度：0.2~1.0×10<sup>4</sup>细胞/0.1mL 培养基/孔（96 孔板）。
- 操作流程（方法 M）

下列方式是用于 96 孔板实验

\*该方法是用于贴壁细胞的转染。

### HVJ-E 悬浮液的制备（重悬冻干的 HVJ-E）

冰预冷的缓冲液（0.26mL）添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀，避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。

使用前，HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤（96孔板）（维持在0°C~8°C）		试剂的用量
包裹	(1) HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E：6.25AU（250ul）
	(2) 与试剂B混合，搅拌 <sup>46</sup> （轻拍管子）。	试剂B：25ul
	(3) 在4°C离心10,000g（10,000~12,000rpm）10分钟。去除上清 <sup>47</sup> 。	
	(4) 沉积物用缓冲液重悬（用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体） <sup>48</sup>	缓冲液：500ul
	(5) 在步骤（4）制备的悬浮液转移到96孔板 <sup>49</sup> （用于载体制备）	5ul/孔
	(6) DNA/TE溶液加到每个孔内，搅拌（用板震荡仪）	5ul/孔
	(7) 静置5分钟。	
转染	(8) 添加试剂C，1：16稀释（试剂C35ul+缓冲液525ul）并且搅拌（用板震荡仪）	稀释的试剂C：5ul/孔
	(9) 每孔添加培养基，搅拌（用板震荡仪）	培养基：50ul/孔
	(10) 将HVJ-E载体悬浮液添加到另外一块预培养细胞的96孔板，37°C，5%CO <sub>2</sub> 培养（根据需要更换培养基）。 <sup>50</sup>	悬浮液（步骤（5）+（6）+（8）+（9））：65ul/孔
	(11) 37°C，5%CO <sub>2</sub> 培养	

步骤（1）到步骤（4）应该在冰上操作。

<sup>46</sup> 添加的试剂 B 相当于添加（步骤 1）前液体体积的 1/10。

<sup>47</sup> 使用该技术，离心后 HVJ-E 小球会变的松散。当去除上清时小心不要吸入上述小球。

<sup>48</sup> 当用缓冲液重悬沉淀物时，轻柔混匀（避免产生气泡）知道悬浮物变成均一白色。剧烈震荡应该避免，防止产生气泡。建议用枪头混匀。

<sup>49</sup> 当用 HVJ-E 包裹时，除了用于孵育转染细胞的板子之外，还需要其他板。

<sup>50</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液（步骤（5）+（6）+（8）+（9））后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好，在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

## 6-2 : siRNA 转移

- siRNA ( 寡核苷酸类型 ) 浓度 : 0.01~0.05ug/ul
- 细胞密度 : 0.2~1.0×10<sup>4</sup>细胞/0.1mL 培养基/孔 ( 96 孔板 )
- 操作流程 ( siRNA 的方法 M )

下面提供 96 孔板的操作

\*该方法用于贴壁细胞的转染

### HVJ-E 悬浮液的制备 ( 重悬冻干的 HVJ-E )

冰预冷的缓冲液 ( 0.26mL ) 添加到含有冻干的 HVJ-E 管子内。轻柔混匀, 避免产生气泡。均一的悬浮液制备后保存在冰箱。使用前, HVJ-E 悬浮液和其他试剂、管子必须在冰上充分冰浴。接着按照下列步骤制备载体。

步骤 ( 96孔板 ) ( 维持在0°C~8°C )		试剂的用量
包裹	(1) HVJ-E悬浮液放在小试管中	HVJ-E : 1.75AU ( 70ul )
	(2) 与试剂B混合, 搅拌 <sup>51</sup> ( 轻拍管子 )。	试剂B : 7ul
	(3) 在4°C离心10,000g ( 10,000~12,000rpm ) 10分钟。去除上清 <sup>52</sup> 。	
	(4) 沉积物用缓冲液重悬 ( 用枪头搅匀20~30次直到形成均一白色的液体 ) <sup>53</sup>	缓冲液 : 560ul
	(5) 在步骤 ( 4 ) 制备的悬浮液转移到96孔板 <sup>54</sup> ( 用于载体制备 )	5ul/孔
	(6) siRNA溶液加到每个孔内, 搅拌 ( 用板震荡仪 )	5ul/孔
	(7) 静置5分钟。	
转染	(8) 添加试剂C, 1 : 16稀释 ( 试剂C35ul+缓冲液525ul ) 并且搅拌 ( 用板震荡仪 )	稀释的试剂C : 5ul/孔
	(9) 每孔添加培养基, 搅拌 ( 用板震荡仪 )	培养基 : 50ul/孔
	(10) 将HVJ-E载体悬浮液添加到另外一块预培养细胞的96孔板, 37°C, 5%CO <sub>2</sub> 培养 ( 根据需要更换培养基 )。 <sup>55</sup>	悬浮液 ( 步骤 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 8 ) + ( 9 ) ) : 65ul/孔
	(11) 37°C, 5%CO <sub>2</sub> 培养	

步骤 ( 1 ) 到步骤 ( 4 ) 在冰上操作。

<sup>51</sup> 添加的试剂 B 相当于添加 ( 步骤 1 ) 前液体体积的 1/10。

<sup>52</sup> 使用该技术, 离心后, HVJ-E 小球会变的松散。当去除上清时小心不要吸入上述小球。

<sup>53</sup> 当用缓冲液重悬沉淀物时, 轻柔混匀 ( 避免产生气泡 ) 知道悬浮物变成均一白色。剧烈震荡应该避免, 防止产生气泡。建议用枪头混匀。

<sup>54</sup> 当用 HVJ-E 包裹时, 除了用于孵育转染细胞的板子之外, 还需要其他板。

<sup>55</sup> 一般加入 HVJ-E 载体悬浮液 ( 步骤 ( 5 ) + ( 6 ) + ( 8 ) + ( 9 ) ) 后培养基不需要更换。如果观察到细胞状态不好, 在加入 HVJ-E 载体悬浮液后 10 分钟至 3 小时更换培养基。

## Troubleshooting Guide for *GenomONE-Neo EX*

Problem	Possible cause
Low transfection efficiency	Loss of binding or fusion activity of HVJ-E. (in vitro, in vivo)
	Low efficiency of binding of HVJ-E with target cell membrane. (in vitro)
	Low efficiency of incorporation of nucleic acids into HVJ-E. (in vitro, in vivo)
	Nucleic acids of poor quality. (in vitro, in vivo)
	Cell density is not adequate. (in vitro)
	Molecular size of content is too small (Mw.< 1kDa) or too large. (in vitro, in vivo)
High cytotoxicity (In vitro)	Excessive exposure of cells to HVJ-E vector.
	Plasmid DNA preparation contaminated with large amount of endotoxin.
	Excessive exposure of cells to Reagent C.
	Conditions of cultured cells are not suitable for transfection.
	If above checks or tests prove negative and do not result in any improvement, HVJ-E vector may be extremely cytotoxic to your specific cell type.

## FAQ for *GenomONE-Neo EX*

	Questions
1	Characteristics of HVJ-E
2	Principle of transfection
3	Differences in mechanism of transfection between HVJ-E vector and other existing non-viral transfection reagents (cationic liposomes etc.)
4	Restriction for GenomONE-Neo EX use
5	Expiration date
6	Particle size of HVJ-E How large is this carrier HVJ envelope vector?
7	Method for inactivation of HVJ
8	Assessment and confirmation of viral inactivation
9	Methods for confirmation of viral inactivation
10	Bio-safety level for laboratory use
11	Safety evaluation of HVJ-liposomes in nonhuman primates
12	Quality assurance
13	License requirement and commercial use
14	Role of each Reagent
15	Constituent and concentration of each Reagent
16	Storage of reconstituted HVJ-E suspension
17	Storage of Reagent A, B, C and Buffer
18	Number of HVJ-E particles included in 1 Assay Unit (AU) of HVJ-E suspension
19	Hemagglutination units (HAU) of HVJ-E included in 1 Assay Unit (AU) of HVJ-E suspension
20	Efficiency of incorporation into HVJ-E
21	Limit of size of DNA that can be incorporated into HVJ-E
22	Limit of size of protein or synthetic compounds that can be incorporated into HVJ-E
23	Possibility of storage of HVJ-E vector after incorporation of plasmid DNA, siRNA, ODN or protein.
24	Recommended cell density for each well plate size
25	Frequency of use (in vitro)
26	Effects of serum and antibiotics in the medium during transfection (In vitro)
27	Efficiency of transfection of circular DNA and linear DNA (In vitro)
28	Efficiency of transfection of mRNAs (In vitro)
29	Frequency of use (in vivo/ laboratory animals)
30	Precautions for in vivo transfection (route of administration)
31	Immunogenicity in vivo. Consecutive administration in vivo
32	Effects of mouse or rat lineage on efficiency of transfection
33	Published researches using GenomONE



**COSMO BIO Co., LTD.**

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,  
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN  
TEL : (81)3-5632-9617 FAX : (81)3-5632-9618  
e-mail : export@cosmobio.co.jp  
URL : www.cosmobio.com

全国代理



宝柏·中国

www.boppard.cn    info@boppard.cn  
北京 Tel: 010 85804838    上海 Tel: 021 62884751  
广州 Tel: 020 87326381    香港 Tel: 852 27999019