

GeticoFect 293Plus Transfection Kit

使用说明书

1. 适用范围

本 SOP 适用于使用 GeticoFect 293Plus 转染试剂盒进行 293 细胞转染实验，涵盖 96 深孔板、24 深孔板、125mL 摇瓶至 5L 摇瓶等不同培养容器的操作。

2. 试剂与设备准备

2.1 试剂盒组分（需提前核对）

组分名称	作用	储存条件
GeticoFect 293Plus 转染试剂	介导质粒 DNA 进入细胞	2-8℃避光
GeticoFect 293Plus 增强剂	提升蛋白产量	2-8℃避光
GeticoFect 293Plus Feed（需自备，与培养基配套）	支持高密培养转染后细胞生长	2-8℃避光

3. 转染前准备（关键参数确认）

3.1 细胞准备（转染前 1-3 天）

根据目标转染日（Day 0），按以下时间节点调整细胞接种密度，确保 Day 0 时细胞密度达到 6×10^6 - 8×10^6 viable cells/mL、活力 $\geq 95\%$ ：

- **Day -1（转染前 1 天）**：将细胞传代至 3.2×10^6 - 3.6×10^6 viable cells/mL；
- **Day -2（转染前 2 天）**：将细胞传代至 1.6×10^6 - 1.8×10^6 viable cells/mL；
- **Day -3（转染前 3 天）**：将细胞传代至 0.8×10^6 - 0.9×10^6 viable cells/mL。

3.2 试剂准备

- 提前将试剂盒中的转染试剂、增强剂、Feed、复合缓冲液从 2-8°C 取出，平衡至室温（约 30 分钟）；阳性对照载体按需从 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 解冻，解冻后置于冰上；
- 确认质粒 DNA 质量：纯度 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.8-2.0$ ，无内毒素 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)，浓度调整为 $1\text{mg}/\text{mL}$ （若浓度不同，需按比例换算用量）；表达抗体时，重链（HC）与轻链（LC）质粒比例需为 1:2-1:3。

4. 转染操作步骤 (Day 0)

4.1 细胞密度调整

1. 取少量细胞悬液，用无 Ca^{2+} / Mg^{2+} PBS 稀释后，台盼蓝染色，通过细胞计数仪检测活力与密度；
2. 若细胞密度符合 $6 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ viable cells/mL、活力 $\geq 95\%$ ，用预热的新鲜培养基将其稀释至 5×10^6 viable cells/mL，按表 3、表 6 确定培养体积，转移至对应规格摇瓶 / 孔板中；
3. 将调整好密度的细胞置于 37°C 、 $8\% \text{CO}_2$ 、 $\geq 80\%$ 湿度的培养箱中，按表 3 设置摇床转速，预孵育 30 分钟（可选，目的是让细胞适应环境）。

4.2 转染复合物制备（关键步骤，需严格计时）

按“转染试剂：质粒 DNA：复合缓冲液 = $4.5\mu\text{L}:1\mu\text{g}:100\mu\text{L}$ ”的比例（每 mL 转染体系）制备复合物，具体操作如下：

1. **稀释质粒 DNA**：取无菌离心管，加入 10% 转染体系体积的 Opti-Plex™ 复合缓冲液（如 30mL 转染体系需加 3mL 缓冲液），再加入对应量的质粒 DNA（30mL 体系需 $30\mu\text{g}$ DNA，若为抗体表达则按 HC:LC=1:2-1:3 加入），轻轻颠倒离心管 3 次混匀，避免剧烈振荡；
2. **混合转染试剂**：将 GeticoFect 293Plus 转染试剂轻轻颠倒 2-3 次混匀，按每 mL 转染体系加 $4.5\mu\text{L}$ 的量（30mL 体系加 $135\mu\text{L}$ ），直接加入步骤 1 的 DNA - 缓冲液混合液中，立即轻轻颠倒 3 次混匀；
3. **复合物孵育**：室温（ $15-25^{\circ}\text{C}$ ）静置孵育 2-5 分钟，期间避免晃动或触碰离心管，确保形成直径 100-200nm 的稳定复合物（孵育时间不可短于 2 分钟或长于 5 分钟，否则影响复合物稳定性）。

4.3 转染复合物添加

1. 孵育结束后，立即将复合物缓慢滴加至步骤 5.1 准备好的细胞悬液中，滴加过程中轻轻晃动摇瓶 / 孔板，确保复合物均匀分布；
2. 将添加复合物后的细胞置于 37°C、8% CO₂、≥80% 湿度的培养箱中，按表 6 设置摇床转速（如 125mL 摇瓶转速为 125±5rpm，96 深孔板为 900-1000rpm），开始转染培养。

5. 转染后处理（关键时间节点操作）

5.1 增强剂与 Feed 添加（转染后 18-22 小时）

1. 无需提前预热增强剂与 Feed，可按表 6 比例预混合（如 30mL 转染体系需加 180μL 增强剂 + 2.4mL Feed），混合液在 2-8°C 避光条件下可稳定 1 个月；
2. 将预混合的增强剂 - Feed 缓慢滴加至细胞悬液中，滴加时轻轻晃动容器，避免细胞沉降；
3. **温度调整（可选）**：若表达的蛋白为分泌型非抗体、膜蛋白或胞内蛋白，可将培养温度从 37°C 降至 32°C，CO₂ 浓度保持 8%；单克隆抗体、双特异性抗体、Fc 融合蛋白无需调整温度，维持 37°C 即可。

5.2 转染后细胞监测

1. 转染后 24-48 小时：观察细胞形态（应保持分散单细胞状态，无明显聚团），检测活力（应≥80%）；
2. 转染后 5-7 天（分泌型蛋白）/2-3 天（膜蛋白 / 胞内蛋白）：检测细胞活力（若活力≤60%，需提前收获），准备收获培养液进行目的蛋白检测或纯化。

5.3 目的蛋白收获

1. 按目标蛋白类型确定收获时间：分泌型蛋白在转染后 5-7 天收获，膜蛋白 / 胞内蛋白在 2-3 天收获；
2. 收获时，将细胞悬液转移至无菌离心管，300×g 离心 10 分钟（2-8°C），收集上清液（分泌型蛋白）或沉淀（膜蛋白 / 胞内蛋白），按后续纯化流程处理。

6. 不同规模转染参数参考

培养容器	转染体系体积	细胞需求量	质粒 DNA 用量	转染试剂用量	增强剂用量	Feed 用量	摇床转速 (摇径)
96 深孔板	900μL	4.5×10^6 cells	0.9μg	4.1μL	5.4μL	72μL	900-1000rpm (3mm)
24 深孔板	3.0mL	15×10^6 cells	3.0μg	13.5μL	18μL	240μL	225±5rpm (19mm)
125mL 摇瓶	30mL	15×10^7 cells	30μg	135μL	180μL	2.4mL	125±5rpm (19mm)
5L 摇瓶	2000mL	1.0×10^{10} cells	2000μg	9mL	12mL	160mL	115rpm (19mm)

7. 注意事项

- 1. 细胞相关：**解冻后的 293 细胞需传代 2-3 次，待倍增时间稳定在 23-24 小时后再用于转染；不可使用活力 < 95% 或密度偏离 6×10^6 - 8×10^6 viable cells/mL 的细胞，否则转染效率下降 ≥ 30%；
- 2. 试剂相关：**转染试剂不可反复冻融，开封后 1 个月内使用完毕；复合缓冲液若出现浑浊，不可使用；
- 3. 操作相关：**复合物制备时，必须先稀释 DNA 再加转染试剂，不可颠倒顺序；转染后 18-22 小时需按时添加增强剂与 Feed，延迟添加会导致蛋白产量降低 20%-40%；
- 4. 安全相关：**操作过程中需佩戴无菌手套、护目镜，质粒 DNA 若为病毒载体或含致病基因，需在生物安全柜内操作；试剂盒中 Feed 含氯化镉、硫酸镍，接触后需立即用清水冲洗，详见 SDS 文档。

8. 异常处理

异常现象	可能原因	解决方案
转染后细胞活力 < 80%	转染试剂用量过多；复合物孵育时间过长	减少转染试剂用量至 4.0 μ L/mL 体系；严格控制孵育时间在 2-5 分钟
目的蛋白产量 < 500mg/L	质粒 DNA 内毒素超标；增强剂未添加	使用无内毒素质粒提取试剂盒重新制备 DNA；补加增强剂（按原用量的 50%）
细胞出现明显聚团	摇床转速过低；细胞传代密度过高	按表 6 提高摇床转速（如 125mL 摇瓶从 125rpm 提至 130rpm）；下次传代时降低接种密度 10%