

## Protocol • EndoFectin™ Expi293 转染试剂

——用于高效转染 Expi293F™ 细胞系并表达分泌蛋白和胞内蛋白

### EndoFectin™ Expi293 转染试剂（专用于分泌蛋白表达）

Cat. No.: EF017（1L 转染用量）, EF018（10L 转染用量）

### EndoFectin™ Expi293 转染试剂（专用于胞内蛋白表达）

Cat. No.: EF019（1L 转染用量）, EF020（10L 转染用量）

## User Manual

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城

掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：www.genecopoeia.com（英文）, www.igenebio.com（中文）

## EndoFectin™ Expi293 转染试剂

- I. 产品描述
- II. 产品组分及存储
- III. 质量控制
- IV. 实验前准备
- V. 实验过程

### I. 产品描述

GeneCopoeia 的 EndoFectin™ Expi293 转染试剂盒是专为从 Expi293F™ 细胞中表达和分离高水平的细胞内和分泌蛋白设计的。该试剂盒包括 EndoFectin™ Expi293 转染试剂（一种基于脂质的专有配方，能与核酸形成复合物并将复合物转运到动物细胞中），以及为高效生产蛋白质而设计的配套溶液。经证实，EndoFectin™ Expi293 可在悬浮细胞系 Expi293F™ 中发挥作用，而 Expi293F™ 是最常用的可用于瞬时表达的悬浮 HEK293 细胞系。该产品经过优化，即使在有血清存在的情况下也能高效、简单地递送核酸。EndoFectin™ Expi293 具有以下优点：

- 与 Expifectamine™ 293 相比，Expi293F™ 细胞的转染效率更高；
- 低细胞毒性；
- 进行转染操作时，不需提前去除细胞培养液或血清；
- 进行转染操作后，不需清洗细胞或更换培养基。

### II. 产品组分及存储

4-8°C 密封储存至少 12 个月。

EF017 EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（1L 转染用量）专用于分泌蛋白表达

EF018 EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（10L 转染用量）：EF017 X 10。

货号	产品名称	产品组分	组分货号	规格
EF017	EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（1L 转染用量）	EndoFectin™ Expi293 Transfection Reagent	EF017-01	2.7mL
		Expi293 Solution 1 for secreted protein expression	EF017-02	3.4mL
		Expi293 Solution 2 for secreted protein expression	EF017-03	20.0mL

EF019 EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（1L 转染用量）专用于胞内蛋白表达

EF020 EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（10L 转染用量）：EF019 X 10。

货号	产品名称	产品组分	组分货号	规格
EF019	EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit（1L 转染用量）	EndoFectin™ Expi293 Transfection Reagent	EF017-01	2.7mL
		Expi293 Solution for intracellular protein expression	EF019-02	2.0mL

### III. 质量控制

每个批次的 EndoFectin™ Expi293 Transfection Kit 都通过用表达高斯荧光素酶或萤火虫荧光素酶的质粒转染 Expi293F 细胞进行测试。新批次产品的相对荧光素酶活性百分比必须≥参考样品测定值的 80%。

### IV. 实验前准备

1. 使用高质量的质粒：请务必使用高质量的转染级低内毒素质粒。可通过 260 nm 光吸收测定 DNA 浓度，并以 260 nm / 280 nm 比值确定 DNA 纯度（比值应在 1.8~2.0 的范围内）。如有可能，请通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。
2. 保证细胞状态：请使用适当保存和经常传代的健康细胞，并确保培养基无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞，请在转染前至少传代 2 次。

### IV. 实验过程

#### 瞬时转染方法

该方法是针对 Expi293F™ 细胞的转染，如果您使用的是 Expi293F™ 以外的 293 细胞，请通过改变 EndoFectin™ Expi293 转染试剂的用量来优化转染条件。例如，转染 30 mL 细胞培养物时，使用 40、50、60、80、100 μL 的 EndoFectin™ Expi293 转染试剂和 30 μg 的质粒 DNA。

#### 转染前注意事项：

- EF017 中的 Expi293 solution 1 和 2 用于表达分泌蛋白；
- EF019 中的 Expi293 solution 用于表达胞内蛋白；
- 在 125 mL Erlenmeyer 培养瓶中使用 30 mL Expi293F™ 细胞（可按比例增减转染体积）；
- 最终转染体积：30 mL；
- 转染细胞数： $7.5 \times 10^7$  个细胞（最终细胞密度为  $2.5 \times 10^6$  个细胞/mL），存活率大于 95%；
- 质粒 DNA 的用量：30 μg；
- EndoFectin™ Expi293 试剂用量：80 μL；
- 计算转染所需的细胞数量，并相应扩增细胞。转染期间，可将细胞保存在 Expi293™ Expression 培养基（Invitrogen Cat. No. A14351）中。不要在培养基中添加抗生素，否则会降低转染效率；
- 用于转染真核细胞的质粒 DNA 必须清洁、无菌、不含苯酚和氯化钠，建议使用不含内毒素的 DNA；
- 使用前用移液枪轻柔吹打混匀 EndoFectin™ Expi293 转染试剂。

#### 转染 Expi293F™ 细胞

1. 转染前一天，确定实验所需的细胞数量。每 30 mL 的转染体系，需要在 25.5 mL Expi293™ Expression 培养基中含  $7.5 \times 10^7$  个细胞。
2. 以  $2.0 \times 10^6$  个存活细胞/mL 的密度进行铺板，置于 37°C、含 8% CO<sub>2</sub> 的培养箱中加湿培养。摇床转速设置为 125 rpm。

3. 转染当天, 使用自动细胞计数器或胰蓝染料排除法确定细胞的数量和活力。胰蓝染料排除法确定细胞数量和存活率。细胞存活率必须大于 90% 才能进行转染。
4. 计算 30 mL 转染体系所需的含有  $7.5 \times 10^7$  个细胞的细胞悬液体积。
5. 在 125 mL 的一次性无菌 Erlenmeyer 培养瓶中加入适当体积的细胞悬浮液, 然后加入预热的新鲜 Expi293™ 培养基使体积达到 25.5 mL。培养瓶内 25.5 mL 的溶液体积中含有  $7.5 \times 10^7$  个细胞。将培养瓶放回培养箱。
6. 对于 25.5 mL 细胞, 按以下方法制备脂质-DNA 复合物:
  - a. 使用 Opti-MEM® I 还原血清培养基 (Cat No. 31985-062) 稀释 30  $\mu$ g 质粒 DNA, 至总体积 1.5 mL。轻轻混匀。
  - b. 使用 Opti-MEM® I 还原血清培养基稀释 80  $\mu$ L 的 EndoFectin™ Expi293 转染试剂, 至总体积 1.5 mL。轻轻混匀并在室温下孵育 5 分钟 (孵育时间过长可能导致活性降低)。
  - c. 孵育后, 将稀释的 DNA 加入稀释的 EndoFectin™ Expi293 转染试剂中, 使总体积达到 3 mL。轻轻混匀。
  - d. 室温下孵育 DNA-EndoFectin™ Expi293 转染试剂混合物 20-30 分钟, 使 DNA-Endofectin™ 复合物充分形成。
7. DNA-EndoFectin™ 复合物形成后, 向步骤 5 的每个培养瓶中加入 3 mL DNA-EndoFectin™ 复合物。在阴性对照培养瓶中, 加入 3 mL Opti-MEM® I 培养基代替 DNA-EndoFectin™ 复合物。每个培养瓶的总溶液体积应为 28.5 mL。
8. 将培养瓶置于 37°C、含 8% CO<sub>2</sub> 的培养箱中加湿培养。摇床转速设置为 125 rpm。
9. 进行转染 16-18 小时后, 加入 Expi293™ Transfection Solution:
  - a. 当表达分泌蛋白时, 加入:
    - Expi293 Solution 1 (Cat. No. EF017-02) : 100  $\mu$ L;
    - Expi293 Solution 2 (Cat. No. EF017-03) : 600  $\mu$ L;
    - Expi293™ Expression Medium: 800  $\mu$ L。
  - b. 当表达胞内蛋白时, 加入:
    - Expi293 Solution (Cat. No. EF019-02) : 60  $\mu$ L;
    - Expi293™ Expression Medium: 1440  $\mu$ L。

之后, 将培养瓶置于 37°C、含 8% CO<sub>2</sub> 的培养箱中加湿培养。摇床转速设置为 125 rpm。可在转染后约 48 小时开始收获细胞或培养基 (表达分泌蛋白时), 并检测重组蛋白的表达。最佳蛋白质表达所需的时间取决于重组蛋白的性质, 可能需要转染后 7 天。

EF017-120924

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。