

LNPs 核酸转染试剂盒 (转染量 1mg)

一. 产品简介

脂质纳米粒 (Lipid nanoparticles, LNPs) 转染试剂盒适用于将 DNA 或 RNA 分子 (如 siRNA、mRNA、shRNA 等), 亦可适用于活体动物的核酸转染以达到基因治疗的目的。其独特的配方优化了转染效率, 同时降低了细胞毒性, 适用于多种细胞类型, 包括贴壁细胞和悬浮细胞, 为基因转染实验提供卓越的性能和可靠的结果。试剂盒内试剂均为无菌形式提供, 无需额外灭菌处理, 避免了使用过程中核酸酶解, 制备得到的 LNP 转染试剂可直接应用于生物实验研究。本试剂盒提供两种灵活高效的制备方式, 既可通过移液器手动混合实现 LNPs 的快速小规模制备, 也可配合微流控设备进行稳定、均一的大批量生产。

二. 试剂盒组成与存储

本试剂盒采用 4 °C 冰袋运输, 收货后请储存在 4°C。

试剂盒组成	数量	储存条件	保质期
A 液	50 mL	4°C	6 个月
B 液	1 mL		

三. 操作说明

本试剂盒请全程使用 DNase/RNase-free 耗材, 避免 DNA 和 RNA 失活。

1. 细胞培养

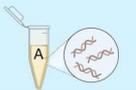
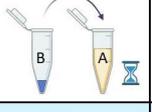
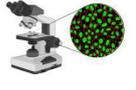
- 1) 贴壁细胞: 以 24 孔板为例 (其它培养板或培养皿可参考 24 孔板): 在转染前一天(18-24 小时)按照每孔约 10-20 万细胞(具体的细胞数量据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定)接种到 24 孔板内进行培养, 使第二天细胞密度能达到约 60-80%。
- 2) 悬浮细胞: 在即将制备复合物之前, 用不含抗生素的培养基接种适量细胞。

实验前请确保:

- ✓ 细胞活力良好, 处于对数生长期。
- ✓ 培养基: 转染前更换为无血清、无抗生素培养基 (推荐使用 Opti-MEM®培养基)。
- ✓ DNA 或 RNA 要求: 核酸为冻干粉或溶液均可; 核酸为溶液时浓度需 $\geq 0.125\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。DNA 纯度 (A260/A280 处于 1.8~2.0 之间); RNA 无 RNase 污染。

2. 手动法制备 LNPs 和转染细胞

按照下表手动制备 LNPs 并转染细胞:

操作流程			推荐用量					
Step 1	 细胞培养	细胞密度至60%-80%	96-well	48-well	24-well	12-well	6-well	
Step 2	 核酸/A混合液	将A液加至核酸干粉或核酸溶液中	每孔细胞数量	1~4 ($\times 10^4$)	5~8 ($\times 10^4$)	0.5~1.5 ($\times 10^5$)	2~3 ($\times 10^5$)	0.5~1 ($\times 10^6$)
Step 3	 加入B液	取B液加至第2步得到的核酸溶液，轻轻吹打3次，37°C孵育30min，得到LNPs	*核酸/A混合液 (含核酸)	10 μ L (1 μ g)	20 μ L (2 μ g)	40 μ L (4 μ g)	80 μ L (8 μ g)	160 μ L (16 μ g)
Step 4	 转染细胞	将孔板换液成Opti-MEM®培养基，加入LNPs，37°C孵育4-6小时	B液	1 μ L	2 μ L	4 μ L	8 μ L	16 μ L
Step 5	 转染后培养	4-6小时换液Opti-MEM®培养基，继续转染12-18h，分析转染结果	每孔加入的LNPs总量	11 μ L	22 μ L	44 μ L	88 μ L	176 μ L
			每孔加入的Opti-MEM®培养基	80 μ L	170 μ L	450 μ L	900 μ L	1750 μ L
			*说明: • 若核酸为干粉，按推荐用量比例，取A液溶解核酸干粉，获得核酸浓度为0.1 μ g/ μ L的核酸/A混合液。 • 若核酸为溶液 ($\geq 0.125 \mu$ g/ μ L) 时，取A液对核酸溶液稀释，获得核酸浓度为0.1 μ g/ μ L的核酸/A混合液。					

➤ 代表性案例 1（核酸为干粉，以单个培养孔用量为例）

按上表步骤，为得到 10 μ L 的 0.1 μ g/mL 核酸/A 混合液，须向 1 μ g 核酸中加入 10 μ L A 液溶解，得到 10 μ L 的核酸/A 混合液（核酸浓度为 0.1 μ g/mL）。向混合液中加入 1 μ L 的 B 液后，轻轻吹打 3 次，37 °C 孵育 30 min 得到 11 μ L 的 LNPs。将培养孔内培养基换成 80 μ L 的 Opti-MEM®培养基，加入 11 μ L 的 LNPs 后 37 °C 孵育 4-6 小时。之后，再将培养孔内培养液换成 Opti-MEM®培养基，继续培养 12-18h 即完成转染。

➤ 代表性案例 2（核酸为 0.125 μ g/mL 溶液，以单个培养孔用量为例）

按上表步骤，为得到 10 μ L 的 0.1 μ g/mL 核酸/A 混合液，须向 8 μ L 核酸溶液 (0.125 μ g/mL) 中加入 2 μ L A 液进行稀释，得到 10 μ L 的核酸/A 混合液（核酸浓度为 0.1 μ g/mL）。向混合液中加入 1 μ L 的 B 液后，轻轻吹打 3 次，37 °C 孵育 30 min 得到 11 μ L 的 LNPs。将培养孔内培养基换成 80 μ L 的 Opti-MEM®培养基，加入 11 μ L 的 LNPs 后 37 °C 孵育 4-6 小时。之后，再将培养孔内培养液换成 Opti-MEM®培养基，继续培养 12-18h 即完成转染。

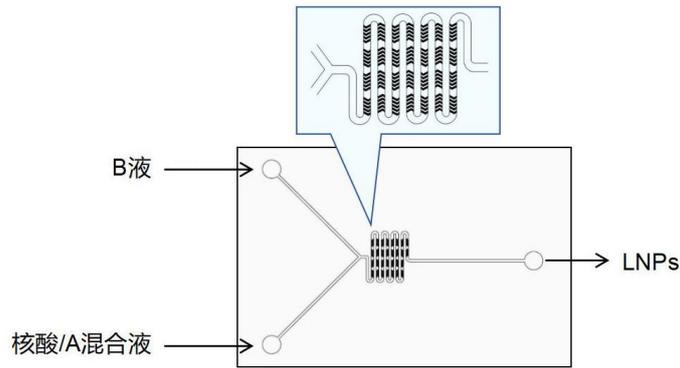
➤ 代表性案例 3（核酸为 1 μ g/mL 溶液，以单个培养孔用量为例）

按上表步骤，为得到 10 μ L 的 0.1 μ g/mL 核酸/A 混合液，须向 1 μ L 核酸溶液 (1 μ g/mL) 中加入 9 μ L A 液进行稀释，得到 10 μ L 的核酸/A 混合液（核酸浓度为 0.1 μ g/mL）。向混合液中加入 1 μ L 的 B 液后，轻轻吹打 3 次，37 °C 孵育 30 min 得到 11 μ L 的 LNPs。将培养孔内培养基换成 80 μ L 的 Opti-MEM®培养基，

加入 11 μL 的 LNP 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4-6 小时。之后，再将培养孔内培养液换成 Opti-MEM[®] 培养基，继续培养 12-18h 即完成转染。

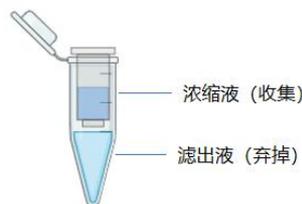
3. 微流控法制备 LNP 的

使用微流控芯片代替手动制备 LNP 时，请采用鱼骨芯片（芯片结构如下图）。在完成 Step 2 之后，将核酸/A 混合液与 B 液分别连接至微流控两根进样管道，控制核酸/A 混合液：B 液进样流速比为 10：1，总流速 $\geq 0.1 \text{ mL/min}$ 。本试剂盒配方已经过优化，得到的 LNP 无需透析和超滤等纯化步骤。按照前面同样的操作流程进行细胞转染。



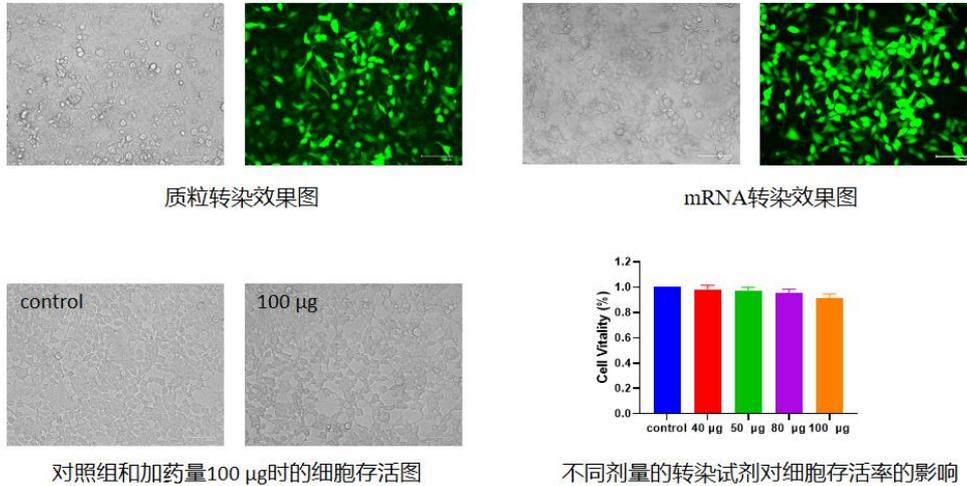
四. 注意事项

- 建议在无菌条件下操作，避免引入外源核酸酶导致核酸降解失活。
- B 液保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 干燥环境，使用前平衡至室温，使用过程中需避免长时间敞口，使用后需要密封好保存。
- 由于 B 液含乙醇，制备得到的 LNP 原液中乙醇含量 $< 10\%$ ，经培养基稀释后乙醇含量降低至 $< 1\%$ 。因此，本试剂盒制备得到的 LNP 可以不需要纯化处理直接使用，少量乙醇并不会明显影响细胞生长。若需要去除乙醇，可通过超滤（步骤如下）或者透析去除。
- 超滤步骤：向产物溶液添加 4 倍体积的 A 液进行稀释，置于 3 kD 超滤管中，3000-5000 g 离心 10-15 min，浓缩至原体积的 1/4。向超滤管中添加 pH=7.4 的无酶 PBS 或 Tris-HCl（10 mM）再次超滤，浓缩至原体积 1/4，重复该步骤 2-3 次，使乙醇含量降低至 0.5%。最后将溶液储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，可保存 2-3 周。请勿将产物储存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ ！



- 核酸/A 混合液：B 液约为 10：1（体积比）。当核酸分子量较大时，可能会影响 LNP 转染试剂稳定性，此时可增加 B 液用量，使得核酸/A 混合液：B 液为 10：2（体积比）。
- 对于某些半衰期比较长的目的基因需要在转染后 3-5 天，才能检测到 RNA 或蛋白水平的显著下降。

- 因细胞类型不同和培养条件差异，最佳的转染条件（试剂用量、转染时间等）会存在差异，可以在上述推荐用量基础上再优化用量，以获得最佳转染条件。
- 以 24 孔板为例 293T 细胞转染 24h 的效果图：



五. 常见问题

Q1. 转染效率低是什么原因？

- 答：**
- ① 核酸易酶解，应注意操作过程无酶、无菌，尽量用高纯度核酸进行转染。对于难转染的细胞，可适当延长 LNPs 与细胞共孵育时间；或者适当增加 B 液用量，使得核酸/A 混合液：B 液为 10 : 2（体积比）。可通过设置不同时间或比例梯度，获得最佳孵育时间和用量。
 - ② 贴壁细胞宜在状态良好时转染，传代次数不宜过多，细胞密度过高或者过低均对转染效率有一定的影响，密度为 60%-80%最佳，不同细胞最佳转染密度需自行摸索。悬浮细胞宜在对数生长期进行转染。
 - ③ 避免转染体系存在抑制剂。应尽量避免在培养基中使用抗生素、EDTA、RPMI、硫酸软骨素、透明质酸，硫酸葡聚糖或其他硫酸蛋白多糖。
 - ④ 转染后培养时间不足，而被误以为转染效率偏低。不同细胞转染后至显著表达所需要培养的时间通常为 24-48 小时。

Q2. 细胞死亡率过高是什么原因？

- 答：**
- ① 细胞密度不宜过高或过低，建议控制细胞密度在 60%-80%进行转染实验。
 - ② 在转染过程中应尽量避免使用氯霉素、青霉素或链霉素等抗生素。
 - ③ 避免过分搅动或振荡复合 LNPs 转染试剂，移液枪吹打混匀即可，避免涡旋离心。
 - ④ 细胞较脆弱，可适当降低 LNPs 的加入量或缩短细胞与 LNPs 共孵育的时间。