



## 技术手册

---

**FuGENE<sup>®</sup> HD转染试剂**

**FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent**

E2311 和 E2312 产品使用说明

CTM328

修订时间 2012.8

[www.promega.com](http://www.promega.com)

## FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/tbs](http://www.promega.com/tbs) 网站获得。请访问该网址以确定您所使用的技术手册是否为最新版本。如果您在使用本试剂盒的过程中有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。

电子邮件: [chinatech@promega.com.cn](mailto:chinatech@promega.com.cn)

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 1. 产品描述 .....                           | 1  |
| 2. 产品组分和储存条件.....                       | 2  |
| 3. 注意事项 .....                           | 3  |
| A. 转染试剂与 DNA 的比例 .....                  | 3  |
| B. DNA .....                            | 4  |
| C. 时间 .....                             | 4  |
| D. 血清.....                              | 4  |
| E. 抗生素 .....                            | 4  |
| F. 稳定转染 .....                           | 4  |
| 4. 推荐的操作方法 .....                        | 5  |
| A. 接种细胞.....                            | 6  |
| B. 准备 FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 ..... | 6  |
| C. 常规转染方法 .....                         | 7  |
| D. 稳定转染的操作方法.....                       | 8  |
| E. 转染条件优化 .....                         | 9  |
| F. 简化优化过程的多重检测.....                     | 10 |
| 5. 疑难解答 .....                           | 11 |
| 6. 参考文献 .....                           | 12 |
| 7. 相关产品 .....                           | 12 |

### 1. 产品描述

FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂是一种新型的，非脂质体剂型的转染试剂，用于将 DNA 转入多种不同的细胞系当中，具有高转染效率和低细胞毒性的特点。转染无需去除血清或培养基，加入转染试剂和 DNA 复合物之后也无需进行洗涤或换液。此外，FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂可以在化学限定培养基当中进行转染，并且不含有任何动物源成分。

表 1 中列出了已由 Promega 公司或 Fugent 公司使用 FuGENE<sup>®</sup> HD 成功进行转染的细胞系。查看这些或其他细胞系转染条件的列表，请访问 FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库：

<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocol-database/>

**表 1. 已由 Promega 公司或 Fugent 公司使用 FuGENE<sup>®</sup> HD 成功进行转染的细胞系。**

|                        |                  |           |                |
|------------------------|------------------|-----------|----------------|
| NIH3T3                 | 小鼠成纤维细胞          | U-937     | 人组织细胞淋巴瘤细胞     |
| HEK293                 | 人胚肾细胞            | ST5AR90   | 人肉瘤细胞          |
| CHO-K1                 | 中国仓鼠卵巢细胞         | AGS       | 人胃腺癌细胞         |
| CHO-S                  | 中国仓鼠卵巢细胞（悬浮细胞）   | BHK-21    | 仓鼠肾成纤维细胞       |
| SNU-16                 | 人胃癌细胞            | Caco-2    | 人结肠腺癌细胞        |
| A-375                  | 人黑色素瘤细胞          | Caki-1    | 人肾透明细胞癌皮肤转移细胞  |
| T98G                   | 人恶性胶质瘤细胞         | Capan-1   | 人胰腺癌细胞         |
| HeLa                   | 人宫颈癌细胞           | H4        | 人神经胶质瘤细胞       |
| HepG2                  | 人肝癌细胞            | HSMM      | 人骨骼肌成肌细胞（原代细胞） |
| High Five <sup>™</sup> | 粉纹夜蛾细胞系（昆虫细胞）    | NCI-N87   | 人胃癌细胞          |
| MCF-7                  | 人乳腺癌细胞           | Panc-1    | 人胰腺癌细胞         |
| mES                    | 小鼠胚胎干细胞（干细胞）     | SK MEL-28 | 人黑色素瘤细胞        |
| hES                    | 人胚胎干细胞（干细胞）      | SK-OV-3   | 人卵巢癌细胞         |
| PC3                    | 人前列腺癌细胞          | T-24      | 人膀胱癌细胞         |
| RAW264.7               | 小鼠巨噬细胞           | T-84      | 人结肠癌细胞         |
| SCC61                  | 人头颈鳞癌细胞          | U-87 MG   | 人脑星形胶质母细胞瘤细胞   |
| SQ20B                  | 人头颈鳞癌细胞          | A549      | 人非小细胞肺癌细胞      |
| STO                    | 小鼠胚胎成纤维细胞        | DMS 53    | 人小细胞肺癌细胞       |
| U-2 OS                 | 人肉瘤细胞            | T47D      | 人乳腺管癌细胞        |
| COS-7                  | 非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞 | Jurkat    | 人 T 淋巴细胞白血病细胞  |
| 293F                   | 人胚肾细胞            | Huh7      | 人肝癌细胞          |

## 2. 产品组分和储存条件

| 产品名称                        | 包装规格     | 目录号   |
|-----------------------------|----------|-------|
| FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 | 1 ml     | E2311 |
|                             | 5 × 1 ml | E2312 |

1ml 包装产品包含转染 333μg DNA 的足量试剂。这相当于以 3:1 的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 的比例（每孔 0.3μl 试剂:100ng DNA）转染 96 孔板超过 3300 个孔的量。实际的转

染数量随试剂:DNA 比例，转染的量和细胞类型而变化。

**储存条件：**将 FuGENE<sup>®</sup> HD 存放于 4°C。使用后盖紧盖子。不要冷冻或存放于 0°C 以下，否则可能会出现沉淀。如果试剂被意外冷冻，可以在 37°C 短暂温育以使沉淀溶解。

**配方和包装：**FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂是专利配方，由脂类和其他成分组成的混合物溶于 80% 乙醇中，经过滤除菌，盛放在无菌的玻璃瓶中。试剂中不含有任何人源或动物源成分。

**特殊处理：**使用前，将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂平衡至室温，颠倒或涡旋振荡混匀。试剂中不应有明显可见的沉淀。若试剂被意外冷冻，在 37°C 短暂温育使沉淀溶解后将试剂冷却至室温。使用标准的 24 孔细胞培养板作为放置 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂的架子。不要对原始玻璃瓶中的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂进行分装。尽量不要让未经稀释的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂接触到塑料表面。不要使用经过硅化处理的枪头或管子。进行稀释时，要将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂直接加入到培养基中，不要碰到管壁。**注意：**FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂也可以预稀释到转染培养基中，但稀释后需立即使用。

### 3. 注意事项

成功的转染涉及到多方面的优化，包括 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 比例，DNA 用量，形成复合体所需的时间，所用的细胞和培养基等。具体的优化方法见 4.E 部分。具有报告基因功能的质粒可以用于监测转染效率。理想的报告基因产物对于细胞应是独特的，可以由质粒 DNA 表达并具有简便的检测方法。通常，对报告基因的检测在转染后 1-2 天进行。Promega 提供萤光素酶、绿色荧光蛋白 (hMGFP)、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 和 β-半乳糖苷酶报告基因及检测试剂，同时还提供用于蛋白共价标记 (HaloTag<sup>®</sup> protein) 的试剂。

查看多种不同类型细胞转染条件的列表，请访问 FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库：

<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocol-database/>

#### 3.A. 转染试剂与 DNA 的比例

要成功的将 DNA 转染到细胞中，必须要对 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 的比例进行优化。对于很多细胞系，使用 1.5:1 到 4:1 的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 比例能够得到较好的结果，但对于其他一些细胞类型或应用，最佳的条件可能是这个范围以外的某个比例(4.5:1 到 6:1)。

### 3.B. DNA

用于转染的质粒 DNA 应该不含蛋白、RNA 和化学污染物 ( $A_{260}/A_{280}$  比例为 1.7-1.9)。对于大部分细胞体系, 使用 PureYield™ 质粒纯化系统得到的 DNA 能够满足质量要求。将纯化的 DNA 溶于无菌水或 TE 缓冲液并将终浓度调整至 0.2-1mg/ml。转染当中 DNA 的最佳用量针对所用不同的 DNA 类型和靶细胞系有很大差别。对于贴壁细胞, 我们建议最初可以在 96 孔板中尝试每孔转染 100ng DNA, FuGENE® HD 转染试剂:DNA 的比例在 3:1 和 2.5:1。增加 DNA 的用量不一定会得到更高的转染效率。

### 3.C. 时间

在 22°C 条件下, FuGENE® HD 转染试剂:DNA 复合物形成所需的时间为 0-15 分钟。对于每种细胞系最佳的时间有所不同。检测前将转染的细胞培养 24-48 小时以使转入的 DNA 得以表达。

### 3.D. 血清

通常, 转染操作需要在无血清的条件下进行以达到最佳的效果, 这是由于血清会干扰很多商品化的转染试剂。FuGENE® HD 转染试剂可以在血清存在 (最高可在 100%) 的条件下进行转染操作, 这样就可以对需要血清持续存在的细胞类型进行转染, 例如原代培养的细胞。

### 3.E. 抗生素

在细胞培养过程中可以使用抗生素。但转染过程中抗生素的存在可能对转染效率和细胞整体的健康状况产生不良的影响。我们不推荐在转染培养基中加抗生素, 除非之前已经测试过抗生素对要进行转染的细胞类型的影响。

### 3.F. 稳定转染

FuGENE® HD 转染试剂可以用于制备稳定转染细胞。但是我们推荐在加选择压力得到稳定转染细胞之前, 先利用瞬时转染来优化转染条件。

#### 4. 推荐的操作方法

图 1 给出了对转染过程的概述。对于特定的细胞类型，我们推荐使用 96 孔板规格来优化转染条件。

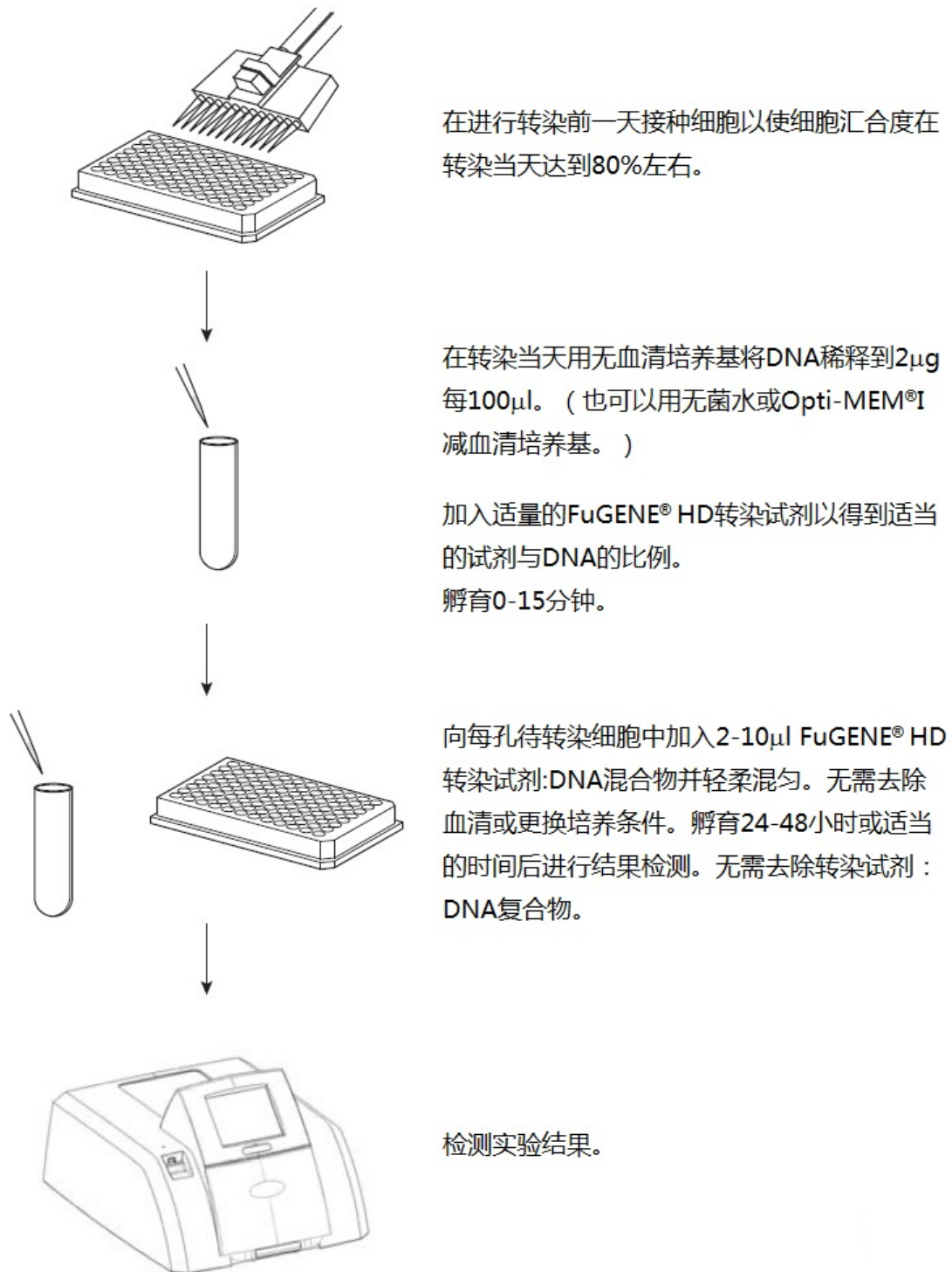


图 1. 96 孔板贴壁细胞转染操作方法概述。

**需要用户自备的材料:**

- 待转染细胞所需的细胞培养基及血清
- 用于制备转染试剂:DNA 复合物的无血清细胞培养基（可以使用 Opti-MEM<sup>®</sup>I 减血清培养基，标准培养基或无菌水）
- 96 孔板或其他细胞培养板
- 作为放置 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂架子的 24 孔板

**4.A. 接种细胞**

在转染前一天接种贴壁细胞以使细胞汇合度在转染当天达到 80%左右。悬浮细胞可以在转染当天进行接种。通常，向 96 孔板每孔中接种 100 $\mu$ l 的细胞，其中包含 1-2 $\times 10^4$  贴壁细胞或 2 $\times 10^4$  到 1 $\times 10^5$  悬浮细胞。对于不同规格的细胞培养板需要将细胞调整至合适的数量（见表 2）。准备细胞时，收集要完成转染实验所需的足量细胞，使用吊桶式转头（水平转子）300 $\times$ g 离心 5 分钟。用培养基将细胞团块重悬至合适的浓度之后进行接种。

查看多种不同类型细胞转染条件的列表，请访问 FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库：  
<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocol-database/>

**表 2. 细胞培养板细胞生长面积。**

| 培养板规格 | 生长面积 (cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup> | 相对面积 <sup>2</sup> |
|-------|--------------------------------------|-------------------|
| 96 孔  | 0.32                                 | 1 $\times$        |
| 24 孔  | 1.88                                 | 5 $\times$        |
| 12 孔  | 3.83                                 | 10 $\times$       |
| 6 孔   | 9.4                                  | 30 $\times$       |
| 35mm  | 8.0                                  | 25 $\times$       |
| 60mm  | 21                                   | 65 $\times$       |
| 100mm | 55                                   | 170 $\times$      |

<sup>1</sup> 这些信息适用于 Corning<sup>®</sup> 的细胞培养板（皿）。

<sup>2</sup> 为了便于优化实验的进行，将培养板单孔总生长面积与 96 孔板单孔面积的比值以相对面积来表示。要确定不同规格培养板合适的贴壁细胞接种密度，可以用这个因子乘以 1-2 $\times 10^4$ 。

**4.B. 准备 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂**

1. 使用前，将装有 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂的瓶子平衡至室温。
2. 颠倒或短暂离心混匀。液体中不应有可见的沉淀。若试剂被意外冷冻，在 37 $^{\circ}$ C 短暂温育

使沉淀溶解，并冷却至室温。

#### 4.C. 常规转染方法

**注意：** FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂可以在存在高达 100%血清的条件下进行转染操作，这样就可以对需要血清持续存在的细胞类型进行转染，例如原代培养的细胞。

我们强烈建议您为所用的每一种细胞系优化转染条件。如果您已经按照 4.E 部分描述的方法对转染参数进行了优化，后续的实验即可按照经验来确定您的实验转染条件。如果您选择不对这些转染参数进行优化，可以使用下面推荐的常规条件。查看不同细胞的转染条件列表，请访问 FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库：

<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocol-database/>

1. 向 96 孔板每个孔中加入总量为 2-10 $\mu$ l 的培养基、DNA 和 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂(表 3)。若使用 U 型或 V 型底的板子，先向孔中加入 90-98 $\mu$ l 预热至室温的培养基，这样加入 DNA 之后终体积即为 100 $\mu$ l。向培养基中加入 2 $\mu$ g 质粒 DNA (0.2-1 $\mu$ g/ $\mu$ l)，涡旋振荡混匀。若使用的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 的比例为 3:1，则加入 6  $\mu$ l FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂，并立即混匀。



将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂直接加入到培养基中。不要使未经稀释的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂直接接触到管壁或 U 型或 V 型底板。

**表 3. 以 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂:DNA 3:1 的比例转染 96 孔板，每孔所需的培养基，DNA 和 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂的总量。**

| 培养板规格 | 总转染量<br>(每孔) <sup>1</sup> | DNA 用量<br>(每孔) <sup>1</sup> | FuGENE <sup>®</sup> HD 转染<br>试剂用量 (每孔) <sup>1</sup> |
|-------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| 96 孔  | 2-10 $\mu$ l              | 0.04-0.2 $\mu$ g            | 0.15-0.6 $\mu$ l                                    |

<sup>1</sup> 对于更大的孔或板子，参照表 2 的倍增因子按比例放大。不同的试剂:DNA 比例条件下所需 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂的量见表 4。

2. 将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂/DNA 混合物在室温孵育 5-15 分钟。

**可选：** 可不进行孵育，直接将混合物加入到细胞中。

**注意：** 延长孵育时间可能对转染产生不利的影响。

3. 向每孔含有 100 $\mu$ l 生长培养基的 96 孔板细胞中每孔加入 2-10 $\mu$ l FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂 /DNA 混合物。我们建议以 5 $\mu$ l 混合物作为起始。吹吸混匀或在微孔板振荡器上混匀。



将细胞放回到培养箱中培养 24-48 小时。

**注意：**生长培养基的总量可根据所使用孔板的规格和您实验室的习惯做法调整。

4. 根据报告基因选择合适的检测方法测定转染效率。对于瞬时转染，通常在转染后 24-48 小时对细胞进行检测。

#### 4.D. 稳定转染的操作方法

稳定转染的目标是对单个含有转染 DNA 的克隆进行分离并使其增殖。因此，这就需要对未转染的细胞和已转入外源 DNA 的细胞进行区分。当转染的 DNA 上包含一个适当的药物抗性标记时，这种筛选就可以通过药物选择来完成。

通常，细胞在非选择性培养基中培养 1-2 天，之后接种到选择性培养基（含有适当药物的培养基）当中。持续使用选择性培养基 2-3 周，其间需要经常性的换液以去除死细胞和碎片直至能够观察到明显的克隆。之后用胰酶将单个克隆消化下来并转入培养瓶中使其进一步增殖或转入多孔板中，在选择性培养基当中进行有限稀释克隆。

在长时间转染研究中有几种药物选择标记经常被使用。例如，转染了含有氨基糖苷类（如新霉素）磷酸转移酶细菌基因重组载体的细胞，可以使用药物 G-418 进行稳定转染的筛选（1）。同样的，转染载体中表达潮霉素 B 磷酸转移酶基因则可以使细胞带有潮霉素 B 药物抗性（2）。Promega 提供可使细胞带有 G-418、潮霉素 B 或嘌呤霉素抗性的载体。

在使用某种特定的药物进行筛选之前，需要确定杀死细胞所需的药物量。细胞不同，所需的药物量也可能不同。使用不同浓度的药物处理建立一条致死曲线以确定筛选抗性克隆所需的药物量。最佳的药物浓度通常为能够在 5-7 天内杀死 >90% 细胞的用量。

对于稳定转染，需要向细胞转染一个含有药物抗性基因的质粒，转染方法参见 4.C 和 4.E 部分。

**可选：**将转染了不含药物抗性基因质粒的细胞作为药物筛选的阴性对照。

1. 转染后 48 小时，收集贴壁细胞并以几种不同的稀释度（例如 1:2, 1:5, 1:10）接种到选择性培养基中。
2. 之后的 14 天内，每 3 到 4 天更换一次选择性培养基。
3. 在第二周时，监测是否有存活细胞形成明显的克隆。转染了阴性对照质粒的细胞应该完全死亡。
4. 使用标准方法（如，使用克隆柱或有限稀释克隆）将单个克隆移入 96 孔板中，继续在

选择性培养基中培养。注意：如果不需要单个克隆，可以将稳定转染子集中到一起继续培养并冻存。

#### 4.E. 转染条件优化

我们强烈建议您为所用的每一种细胞系优化转染条件。初步优化时，我们推荐每孔用 50-200ng DNA，并以不同的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂与 DNA 的比例（表 4）进行转染。建议在 96 孔板中使用标准的生长条件培养细胞。对优化过程的详细讨论和用于帮助数据分析的电子表格，请访问：<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-optimization-analysis>

查看多种不同类型细胞转染条件列表，请访问 FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库：  
<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocol-database/>

表 4. 优化 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂与 DNA 比例的方法。

|                               | FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂与 DNA 的比例 |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                               | 4:1                                  | 3.5:1 | 3:1   | 2.5:1 | 2:1   | 1.5:1 |
| 加培养基至终体积 <sup>1</sup>         | 100µl                                | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |
| DNA 的量                        | 2µg                                  | 2µg   | 2µg   | 2µg   | 2µg   | 2µg   |
| FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂的量 | 8µl                                  | 7µl   | 6µl   | 5µl   | 4µl   | 3µl   |

<sup>1</sup> 该体积是按照 96 孔板 20 个孔（5 µl/孔）的量进行计算的。

1. 对于 96 孔板，转染前每孔培养基和细胞的总体积应为 100µl。加入的 DNA 和 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂混合物的量需要进行优化；每孔 2-10µl 是较好的初始优化范围，但根据转染参数的不同，最佳的体积可能在此范围之外。计算每种转染条件所需的混合物的总量（表 2）。在无菌的聚苯乙烯管或 U 型或 V 型底板中，将所需量的培养基（预热至室温）和质粒 DNA 混合在一起。加入所需量的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂，立即涡旋振荡混匀或吹吸混匀。



将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂直接加入到培养基中；不要使未经稀释的 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂接触到管或板壁。如需要，也可以在与稀释好的 DNA 混合之前用转染培养基对 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂进行稀释。

**注意：** FuGENE<sup>®</sup> HD 操作方法数据库针对某些特定的细胞类型记录了 DNA、FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂和培养基的用量以及制备 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂/DNA 混合物时所需的最佳时间。不同的细胞类型，这些条件可能有所变化。

2. 将 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂/DNA 混合物在室温孵育 5-15 分钟。孵育 30 分钟以上可能导

致转染效率下降。在某些细胞类型中，混合物不经孵育立即加入到细胞中可能会提高转染效率。

3. 短暂离心或混匀 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂/DNA 混合物。向每孔含有 100 $\mu$ l 生长培养基的 96 孔板细胞中每孔加入 2-10 $\mu$ l FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂/DNA 混合物。吹吸混匀或在微孔板振荡器上轻摇 10-30 秒混匀。将培养板放回到培养箱中。对于多种报告系统（萤光素酶，氯霉素乙酰基转移酶， $\beta$ -半乳糖苷酶等），继续培养 24 到 48 小时即可检测。
4. 根据报告基因类型选择合适的检测方法监测转染效率。对两个报告基因进行多重检测，或检测一种报告基因的同时测定细胞活力或毒性的方法，参见 4.F 部分。

#### 4.F. 简化优化过程的多重检测

最佳的转染条件可以使得转基因表达水平达到最高，同时对细胞的毒性最低。通常，一个 96 孔板可以提供足够数量的样品孔用来进行优化，并且为进行基于细胞的检测提供了一种相对简单的形式。为了准确的确立最佳的转染条件，我们发现利用单个孔中的单个样品检测细胞活力和报告基因活性的多重检测时一种很实用的方法。这可以通过使用 CellTiter-Fluor<sup>™</sup> 细胞活力检测系统（目录号 G6080）和 ONE-Glo<sup>™</sup> 萤光素酶检测系统（目录号 E6110）来实现，具体实验过程如下：

1. 按照 4.E 部分的说明准备一个包括不同稀释度和不同转染条件复孔的细胞培养板。使用编码一个组成型报告基因的质粒，例如 pGL4.13[luc2/SV40]载体（目录号 E6681）。
2. 培养细胞 24-48 小时。
3. 向所有孔中加入 20 $\mu$ l CellTiter-Fluor<sup>™</sup> 试剂（由 10  $\mu$ l 底物溶于 2ml 检测缓冲液制备），短暂振荡混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育至少 30 分钟。

**注意：**延长孵育时间可能会改善检测的灵敏度和动态范围。但是，孵育不要超过 3 个小时，并且确保培养板处于避光状态。

4. 使用荧光光度计或多功能微孔板读数仪检测荧光结果，例如使用 GloMax<sup>®</sup>-Multi+ 多功能发光检测系统（激发波长 380-400nm/发射波长 505nm，见第 7 部分）。

**注意：**您可能需要调整仪器的增益（光电倍增管能量）。

5. 向孔中加入等体积的 ONE-Glo<sup>™</sup> 萤光素酶检测试剂，试剂配制方法见技术手册 TM292（每孔 100-200 $\mu$ l），孵育 3 分钟，然后使用发光检测仪或多功能微孔板读数仪检测发光信号，例如使用 GloMax<sup>®</sup>-Multi+ 多功能发光检测系统。

6. 确定萤光素酶活性和细胞活力最高的转染条件。为了便于数据分析，我们提供数据做图的电子模板，见 <http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-optimization-analysis>。注意若使用这一电子模板，需严格按照其中的说明和培养板布局进行操作。

## 5. 疑难解答

如果您的问题在此没有列出，请与 Promega 当地的分公司或经销商联系。联系方式请参见 [www.promega.com.cn](http://www.promega.com.cn)。电子邮件：[chinatech@promega.com.cn](mailto:chinatech@promega.com.cn)。

| 问题              | 可能的原因和解释                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 转染不成功或转染效率低     | <p>DNA 质量不佳。纯化的 DNA 需为转染级别。对于大多数细胞系，我们通常使用 PureYield™ 质粒中提或大提系统来制备转染级别的 DNA。</p> <p>DNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值应在 1.7-1.9 范围内。</p> <p>FuGENE® HD 转染试剂被冷冻过。不要冷冻或存放于 0℃ 以下。如果试剂被意外冷冻，在 37℃ 短暂温育使沉淀完全溶解。</p> <p>FuGENE® HD 转染试剂和 DNA 的比例不佳。优化 FuGENE® HD 转染试剂:DNA 的比例。对于大多数细胞系，2:1 和 3:1 是较好的比例，但对于特定细胞类型或应用，最佳的比例可能在这一范围之外。</p> <p>细胞死亡过多。在将 DNA 转染入细胞的众多方法当中，利用 FuGENE® HD 转染试剂进行转染是更为温和的方式之一。在细胞死亡过多的情况下，可以按照如下方法优化条件：</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 在比例恒定的情况下，降低 DNA 和 FuGENE® HD 转染试剂的用量。</li><li>• 增加用于转染的细胞的密度。</li><li>• 培养基中的血清浓度对于细胞系生长所需过低。在血清存在的条件下进行转染以确定该条件下转染是否成功。</li></ul> <p>细胞死亡过多。转入的基因产物可能有毒性。</p> |
| 在重复实验中转染效率的差异较大 | <p>细胞处于非最佳生长条件。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 检查细胞中是否存在支原体污染。</li><li>• 使用传代次数较少的细胞。</li></ul> <p>细胞密度不同。每次转染时保持细胞密度一致。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

## 6. 参考文献

1. Southern, P.J. and Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327–41.
2. Blochlinger, K. and Diggelmann, H. (1984) Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2929–31.

## 7. 相关产品

### pGL4 萤光素酶报告基因载体

请访问 [www.promega.com](http://www.promega.com) 查看 Promega 报告基因载体的完整列表。

| 载体                            | 多克隆位点 | 报告基因              | 蛋白降解序列     | 报告基因启动子  | 哺乳动物筛选标记 | 目录号   |
|-------------------------------|-------|-------------------|------------|----------|----------|-------|
| pGL4.10[luc2]                 | Yes   | luc2 <sup>A</sup> | No         | No       | No       | E6651 |
| pGL4.11[luc2P]                | Yes   | “                 | hPEST      | No       | No       | E6661 |
| pGL4.12[luc2CP]               | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | No       | No       | E6671 |
| pGL4.13[luc2/SV40]            | No    | “                 | No         | SV40     | No       | E6681 |
| pGL4.14[luc2/Hygro]           | Yes   | “                 | No         | No       | Hygro    | E6691 |
| pGL4.15[luc2P/Hygro]          | Yes   | “                 | hPEST      | No       | Hygro    | E6701 |
| pGL4.16[luc2CP/Hygro]         | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | No       | Hygro    | E6711 |
| pGL4.17[luc2/Neo]             | Yes   | “                 | No         | No       | Neo      | E6721 |
| pGL4.18[luc2P/Neo]            | Yes   | “                 | hPEST      | No       | Neo      | E6731 |
| pGL4.19[luc2CP/Neo]           | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | No       | Neo      | E6741 |
| pGL4.20[luc2/Puro]            | Yes   | “                 | No         | No       | Puro     | E6751 |
| pGL4.21[luc2P/Puro]           | Yes   | “                 | hPEST      | No       | Puro     | E6761 |
| pGL4.22[luc2CP/Puro]          | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | No       | Puro     | E6771 |
| pGL4.23[luc2/minP]            | Yes   | “                 | No         | minP     | No       | E8411 |
| pGL4.24[luc2P/minP]           | Yes   | “                 | hPEST      | minP     | No       | E8421 |
| pGL4.25[luc2CP/minP]          | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | minP     | No       | E8431 |
| pGL4.26[luc2/minP/Hygro]      | Yes   | “                 | No         | minP     | Hygr     | E8441 |
| pGL4.27[luc2P/minP/Hygro]     | Yes   | “                 | hPEST      | minP     | Hygro    | E8451 |
| pGL4.28[luc2CP/minP/Hygro]    | Yes   | “                 | hCL1-hPEST | minP     | Hygro    | E8461 |
| pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro]      | No    | “                 | hPEST      | CRE      | Hygro    | E8471 |
| pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]  | No    | “                 | hPEST      | NFAT-RE  | Hygro    | E8481 |
| pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro]  | No    | “                 | hPEST      | GAL4 UAS | Hygro    | C9351 |
| pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] | No    | “                 | hPEST      | NF-κB-RE | Hygro    | E8491 |
| pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro]      | No    | “                 | hPEST      | SRE      | Hygro    | E1340 |
| pGL4.34[luc2P/SRF-RE/Hygro]   | No    | “                 | hPEST      | SRF-RE   | Hygro    | E1350 |
| pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]     | No    | “                 | hPEST      | MMTV     | Hygro    | E1360 |
| pGL4.50[luc2P/CMV/Hygro]      | No    | “                 | hPEST      | CMV      | Hygro    | E1310 |
| pGL4.51[luc2P/CMV/Neo]        | No    | “                 | hPEST      | CMV      | Neo      | E1320 |

| 载体                     | 多克隆位点 | 报告基因                      | 蛋白降解序列     | 报告基因启动子 | 哺乳动物筛选标记 | 目录号   |
|------------------------|-------|---------------------------|------------|---------|----------|-------|
| pGL4.70[hRluc]         | Yes   | <i>hRluc</i> <sup>B</sup> | No         | No      | No       | E6881 |
| pGL4.71[hRlucP]        | Yes   | “                         | hPEST      | No      | No       | E6891 |
| pGL4.72[hRlucCP]       | Yes   | “                         | hCL1-hPEST | No      | No       | E6901 |
| pGL4.73[hRluc/SV40]    | No    | “                         | No         | SV40    | No       | E6911 |
| pGL4.74[hRluc/TK]      | No    | “                         | No         | HSV-TK  | No       | E6921 |
| pGL4.75[hRluc/CMV]     | No    | “                         | No         | CMV     | No       | E6931 |
| pGL4.76[hRluc/Hygro]   | Yes   | “                         | No         | No      | Hygro    | E6941 |
| pGL4.77[hRlucP/Hygro]  | Yes   | “                         | hPEST      | No      | Hygro    | E6951 |
| pGL4.78[hRlucCP/Hygro] | Yes   | “                         | hCL1-hPEST | No      | Hygro    | E6961 |
| pGL4.79[hRluc/Neo]     | Yes   | “                         | No         | No      | Neo      | E6971 |
| pGL4.80[hRlucP/Neo]    | Yes   | “                         | hPEST      | No      | Neo      | E6981 |
| pGL4.81[hRlucCP/Neo]   | Yes   | “                         | hCL1-hPEST | No      | Neo      | E6991 |
| pGL4.82[hRluc/Puro]    | Yes   | “                         | No         | No      | Puro     | E7501 |
| pGL4.83[hRlucP/Puro]   | Yes   | “                         | hPEST      | No      | Puro     | E7511 |
| pGL4.84[hRlucCP/Puro]  | Yes   | “                         | hCL1-hPEST | No      | Puro     | E7521 |

<sup>A</sup>*luc2* = 萤火虫萤光素酶合成基因。 <sup>B</sup>*hRluc* = 海肾萤光素酶合成基因。

## 发光检测仪

| 产品名称                                       | 目录号   |
|--------------------------------------------|-------|
| GloMax <sup>®</sup> 20/20 发光检测仪            | E5311 |
| GloMax <sup>®</sup> 96 微孔板发光检测仪            | E6501 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+检测系统带振荡功能仪器*    | E8031 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+检测系统带振荡和加热功能仪器* | E9031 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+发光模块            | E8041 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+荧光模块            | E8051 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+可见光吸光度模块        | E8061 |
| GloMax <sup>®</sup> -Multi+紫外-可见光吸光度模块     | E9061 |

\*E8031 和 E9031 不单独出售，需配合至少一种检测模块（E8041，E8051，E8061 或 E9061）。

## 细胞活力检测

| 产品名称                                   | 规格    | 目录号   |
|----------------------------------------|-------|-------|
| CellTiter-Glo <sup>®</sup> 发光法细胞活力检测系统 | 10ml* | G7570 |
| CytoTox-Glo <sup>™</sup> 细胞毒性检测系统      | 10ml* | G9290 |
| CellTiter-Fluor <sup>™</sup> 细胞活力检测系统  | 10ml* | G6080 |

\*有不同规格可选。限实验室使用。

### 质粒 DNA 纯化系统

| 产品名称                    | 规格    | 目录号   |
|-------------------------|-------|-------|
| PureYield™ 质粒中提系统（去内毒素） | 25 次* | A2492 |

\*有不同规格可选。

### 萤光素酶检测系统

| 产品名称                           | 规格      | 目录号   |
|--------------------------------|---------|-------|
| Steady-Glo® 萤火虫萤光素酶检测系统        | 10ml*   | E2510 |
| Bright-Glo™ 萤火虫萤光素酶检测系统**      | 10ml*   | E2610 |
| ONE-Glo™ 萤火虫萤光素酶检测系统**         | 10ml*   | E6110 |
| Dual-Luciferase® 双萤光素酶报告基因检测系统 | 100 次*  | E1910 |
| 萤火虫萤光素酶检测系统                    | 100 次*  | E1500 |
| 萤火虫萤光素酶检测试剂                    | 1000 次  | E1483 |
| 海肾萤光素酶检测系统                     | 100 次*  | E2810 |
| QuantiLum® 重组萤火虫萤光素酶           | 1mg*    | E1701 |
| EnduRen™ 活细胞底物                 | 0.34mg* | E6481 |
| ViviRen™ 活细胞底物                 | 0.37mg* | E6491 |

\*有不同规格可选。 \*\*限实验室使用。

### 真核表达载体和筛选试剂

| 产品名称                | 规格     | 目录号   |
|---------------------|--------|-------|
| pCI-neo 哺乳动物表达载体    | 20µg   | E1841 |
| pCI 哺乳动物表达载体        | 20µg   | E1731 |
| pSI 哺乳动物表达载体        | 20µg   | E1721 |
| pTARGET™ 哺乳动物表达载体系统 | 20 个反应 | A1410 |
| pF4A CMV Flexi® 载体  | 20µg   | C8481 |
| pF4K CMV Flexi® 载体  | 20µg   | C8491 |
| 抗生素 G-418 硫酸盐       | 5g*    | V7983 |

\*有不同规格可选。

### 绿色荧光蛋白

| 产品名称                           | 规格   | 目录号   |
|--------------------------------|------|-------|
| Monster Green® 绿色荧光蛋白载体 pHMGFP | 20µg | E6421 |