

HilyMax Transfection Reagent

货号：H357 规格：0.5 ml, 1 ml

Technical Manual

概述

HilyMax是同仁化学研究所 (DOJINDO) 和日本福冈工业中心联合研发的一种新型阳离子脂质体转染试剂。它以高转染率、低毒性广泛应用于多种细胞系及siRNA。同时，HilyMax转染试剂不受培养基中血清的影响，转染过程中也不需更换培养基，操作简单。此外，由于HilyMax不含对转染体系产生干扰的生物成分，因而最大程度减少了对转染实验的影响。

试剂盒内含

0.5 ml :

HilyMax Reagent 1 管

Lipoform Buffer 0.5 ml × 1

1 ml :

HilyMax Reagent 1 管

Lipoform Buffer 1.0 ml × 1

储存条件

1. 未开封的试剂盒请置于0-5℃保存。

2. 混合好的转染试剂溶液请置于-20℃保存，试剂在-20℃可以稳定保存6个月。

* 若使用比较频繁，请将混合好的转染试剂溶液置于0-5℃保存，并尽量在一个月内存完。若不能在一个月内存完，建议分装后在-20℃密封保存。每次使用前建议重新用振荡器或者移液器混匀溶液。

按照说明书第2页图1优化方案是转染实验获取理想结果的关键。

操作步骤

HilyMax工作液制备

1. 因管内HilyMax量极少，肉眼几乎无法辨别，请在开封前轻弹HilyMax Reagent管壁或适当离心以确保粉末沉入管底。

2. 将0.5 ml 或1 ml Lipoform Buffer加入HilyMax Reagent管中，并使用振荡器震动或移液器轻轻吹1-2 min混匀转染试剂直至完全溶解。

* 在亮光下检查管内溶液中是否还有不溶物，如果有的话继续使用振荡器震动直至完全溶解，否则会影响转染实验的效果。

常规转染

以24孔板转染实验操作为例 (其他类型培养板请参考表1和表2) :

1. 接种细胞

1) 贴壁细胞

转染实验前一天，接种细胞到24孔板，调整细胞密度为40%-90%^{a)}，细胞悬液^{b)}体积0.5 ml/孔。

2) 悬浮细胞

转染实验前一天，接种细胞到24孔板，调整细胞密度为0.1-1.6 × 10⁶ cells/孔，细胞悬液^{b)}体积0.5 ml/孔。

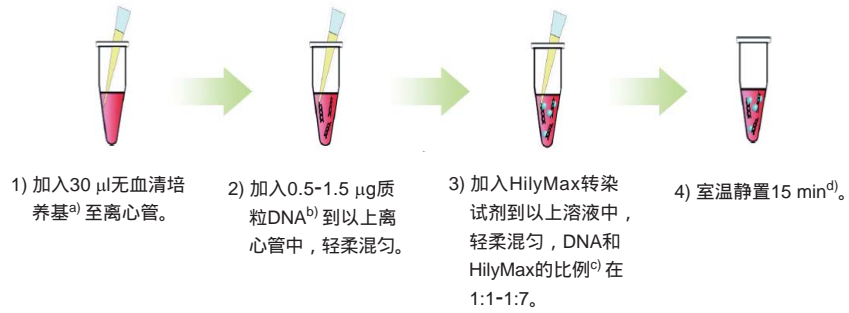
a) 调整细胞密度为40%-90%指孔底部被细胞覆盖面积为40%-90%。

b) 细胞悬液中若含有血清，不会影响转染效果。

* 转染前请确认细胞状态，如果细胞状态比较差，会影响到转染效率及实验结果。

操作步骤

2. DNA-HilyMax复合体形成



- a) 请使用不含血清和抗生素的培养基，否则会影响DNA和HilyMax复合体形成。
- b) 确保转染所用DNA的纯度 ($A_{260}/A_{280}=1.7-1.9$)，推荐的DNA的浓度为0.15-1.00 mg/ml。
- c) DNA和 HilyMax的比例需根据具体实验条件进行优化确定，可参考图1。
- d) 静置时间超过30 min可能会影响转染效果。

3. 将DNA-HilyMax复合体溶液画圈式均匀滴加入细胞悬液中，轻轻敲击24孔板帮助混匀。

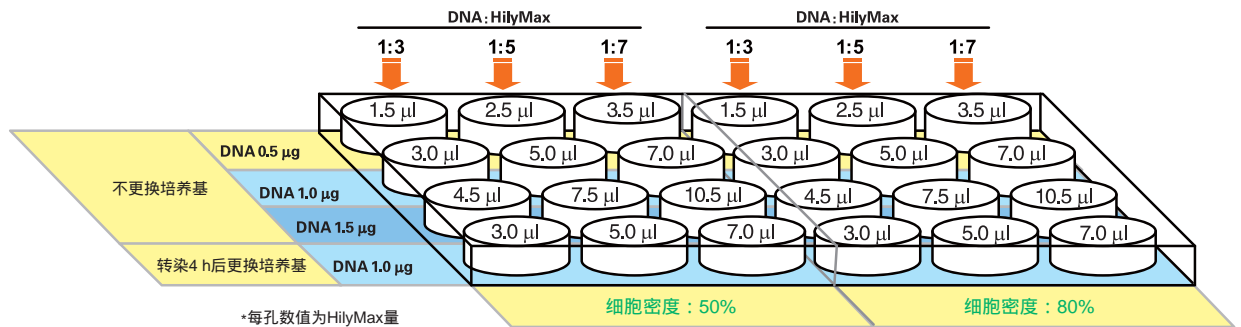
4. 在37 °C、CO₂细胞培养箱中培养。

* 根据试剂对细胞毒性大小等实验情况，可在培养4-24 h内换液，或者不换液。

5. 培养24-72 h后可进行后续实验。

转染条件优化方案：

图1. 转染条件优化方案 (24孔板)



根据实验需求可自行调整DNA与HilyMax的比例，例如: 1:1、1:3、1:5或1:2、1:4、1:6

若使用24孔板以外培养板，请以图1中DNA以及HilyMax工作液添加量为基数，再乘以表1中列举的倍率。

表1. 不同培养板换算倍率表

96-well plate	12-well plate	6-well plate (35 mm dish)	60-mm dish	100-mm dish
× 0.2	× 2	× 4	× 8	× 24

根据表1计算所得不同培养板的DNA以及HilyMax工作液添加量：

表2. 不同培养板的转染条件

细胞培养条件			DNA-HilyMax 复合体制条件		
培养容器	表面积	培养基量	培养基量(无血清)	DNA量	DNA(μ g):HilyMax(μ l)
96 well	0.3 cm ²	0.1 ml	10 μ l	0.1-0.3 μ g	1:2-1:7
24 well	1.9 cm ²	0.5 ml	30 μ l	0.5-1.5 μ g	1:2-1:7
12 well	3.8 cm ²	1.0 ml	60 μ l	1.0-3.0 μ g	1:2-1:7
6 well	9.2 cm ²	2.0 ml	120 μ l	2.0-6.0 μ g	1:2-1:7
36 mm	8.0 cm ²	2.0 ml	120 μ l	2.0-6.0 μ g	1:2-1:7
60 mm	21.0 cm ²	5.0 ml	300 μ l	5.0-15.0 μ g	1:2-1:7
100 mm	58.0 cm ²	15.0 ml	900 μ l	15.0-45.0 μ g	1:2-1:7

病毒包装转染 (以HEK293T细胞为例)：

1. 配制DMEM+10% FBS 100 ml，置于37^o 预热。
2. 转染前24 h传代HEK293T细胞^{a)}，当细胞40-60%融合时，开始转染。
3. 配制OptiMEM并加入500 μ l至离心管。
4. 将病毒质粒加入到以上离心管中混匀，各质粒与培养基添加量请参考表3。

表3. 质粒与培养基添加量 (10 cm 皿)

Plasmids	Weight of Plasmids	Volume of OptiMEM
pMD.G	2 μ g	500 μ l
8.91	3 μ g	
Target Gene Vector/Ctrl Vector	5 μ g	

5. 按照质粒 (μ g) : HilyMax (μ l)为1:2.5 -1:3.5^{b)}的比例加入HilyMax工作液至离心管并轻柔混匀，实际添加量请参考表4。

表4. HilyMax 工作液添加量

HilyMax
25-35 μ l

6. 混合液静置15 min^{c)}，加入500 μ l的完全培养基(DMEM+10% FBS) 混匀后，加至HEK293T细胞的培养皿中，“+”字形上下左右混匀培养基5次。
7. 37^o，5% CO₂条件下培养^{d)}，24 h后每皿补加新鲜培养基10 ml，继续培养60-72 h后，收集含病毒的培养基。
 - a) 工具细胞可根据实验需求进行替换。
 - b) 如果使用其他培养板，质粒和HilyMax比例不变，添加量需根据表1换算所得。
 - c) 混合液静置过程中，同时从培养箱中取出需转染HEK293T细胞培养皿，换新鲜、预热的完全培养基。(换液时加9 ml新鲜培养基，用含血清培养基洗细胞)
 - d) 若要进一步减轻转染试剂的毒性，建议在培养了4-8 h内换新鲜培养基10 ml。

* 以上实验步骤与数据仅供参考，具体条件可根据实验需要自行调整。

Q1. HilyMax是否完全溶解？

A1. 第一次使用时请确认HilyMax Reagent管内溶液中是否仍有不溶物质，如有请继续震荡使其充分溶解，不溶性成分的存在会降低转染效率。

Q2. DNA-HilyMax复合体静置时间是否过长？

A2. 一般静置时间为15 min，超过30 min会造成转染效率过低。

Q3. 转染实验中是否使用了最合适的DNA量、HilyMax量以及细胞密度？

A3. 请根据转染条件优化方案 (图1) 摸索出以上三个条件最佳值。

如果整体转染效率特别低，请尝试在原来DNA (μg) : HilyMax (μl)比例梯度上适当增加，或者增加DNA的量。

最适细胞密度根据所加入的DNA-HilyMax复合体量而不同，如果因为毒性过大而死亡，请减少DNA和HilyMax使用量或者适当增加细胞密度。

参考文献

1. F-box protein FBXL2 targets cyclin D2 for ubiquitination and degradation to inhibit leukemic cell proliferation *Blood*, **2012**, 119 (13), 3132-3141.
2. MEF/ELF4 transactivation by E2F1 is inhibited by p53, *Nucleic Acids Research*, **2011**, 39 (1), 76-88.
3. Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls, *Autophagy*, **2008**, 4 (1), 131-134.
4. Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination, *Development*, **2010**, 137, 923-933.
5. Zinc finger genes Fezf1 and Fezf2 control neuronal differentiation by repressing Hes5 expression in the forebrain, *Development*, **2010**, 137, 1875-1885.
6. p53 Regulates Toll-Like Receptor 3 Expression and Function in Human Epithelial Cell Lines, *Mol. Cell Biol.*, **2008**, 28 (21), 6557-6567.
7. Characterization of PDK as a Protein Involved in Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking, *Mol. Cell Biol.*, **2010**, 30 (7), 1689-1702.
8. Positive Role of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein, Transcription Factor Involved in the Endoplasmic Reticulum Stress Response in the Development of Colitis, *The American Journal of Pathology*, **2009**, 174 (5).
9. The Major Outer Membrane Protein of a Periodontopathogen Induces IFN- β and IFN-Stimulated Genes in Monocytes via Lipid Raft and TANK-Binding Kinase 1/IFN Regulatory Factor-3, *J. Immunol.*, **2009**, 182, 5823-5835.
10. A Suppressive Role of the Prolyl Isomerase Pin1 in Cellular Apoptosis Mediated by the Death-associated Protein Daxx, *J. Biol.Chem.*, **2007**, 282 (50), 36671-36681.



如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

上海

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

邮编：200030

电话：400-823-9388

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

北京

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编：100029

电话：010-8225-1765

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

修订日期：2016年7月