

## GenomONE-Neo EX 问题解决指南

问题	可能情况	建议及推荐
转染效率低	HVJ-E 无结合或融合活性 (体外/活体实验)	<p>检查HVJ-E制备和储存的条件</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● HVJ-E冻干粉极易在高温和相对湿度较高的环境下失活，需放入铝袋中密封冷藏。</li> <li>● 用冰浴的缓冲液复原HVJ-E冻干粉，溶液需立即储存于冰浴上或冰箱（2-8℃）。若温度高于8℃ HVJ-E溶液会逐渐失去活性。</li> <li>● 复原的HVJ-E溶液需置于冰箱冷藏室（2-8℃），<b>在2周内使用完</b>。冷冻的悬浮液会降低转染活性，故复原后的悬浮液<b>不可冷冻储存</b>。</li> </ul>
	HVJ-E 与靶细胞膜结合效率低 (体外实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 将C试剂的量增加到标准量的2~4倍。（请注意，C试剂可能对某些细胞有毒性）。</li> <li>● 减少转染培养基的量，提高HVJ-E载体和C试剂的浓度。</li> <li>● <b>(对于贴壁细胞)</b> 将HVJ-E载体和细胞在板内混合后，35℃，1,500-3,000 rpm离心10~60分钟。（对于某些类型细胞，需要在4℃至室温下进行此步骤）。</li> <li>● <b>(对于悬浮细胞)</b> 延长HVJ-E载体和细胞混合物离心时间，到60分钟。</li> </ul>
	HVJ-E 与核酸结合效率低 (体外/活体实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 检查结合过程。 加入B试剂的总量应等于液体体积的1/10. 添加过量的B试剂可能导致HVJ-E膜包裹功能的退化。</li> <li>● 将与HVJ-E混合的核酸浓度增加到标准量的2~4倍。</li> </ul>
	核酸质量不好 (体外/活体实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 检查核酸的纯度。 转染需用高质量的质粒DNA进行。</li> <li>● 用适当的纯化方法降低内毒素水平，因为有报道表明内毒素对某些细胞系和某些原代细胞有毒性（如Huh-7等）。</li> </ul>
	细胞密度不够 (体外实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 靶细胞的数量太少，需贴壁细胞生长汇合至50~80%。</li> </ul>
	外源物质分子量太小 (Mw. <1kD) 或太大 (体外/活体实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 按照标准的融合操作，分子的分子量小于1 kDa时可能会从HVJ-E包膜中泄漏。</li> <li>● 另外，当加入的DNA质粒或者蛋白大于15 kbp (DNA) 或150 kDa (1gG) 时，是否会影响转染效率，我们暂未对此进行验证。</li> </ul>
	血清和抗生素 (体外实验)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 通常，转染培养基中（导入步骤）含有血清和抗生素不会影响转染效率。 但如果减少血清或抗生素的浓度可能提到转染效率。</li> </ul>

问题	可能情况	建议及推荐
细胞毒性高 (体外实验)	细胞中加入了过量的HVJ-E载体	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 减少HVJ-E的量或者加入培养基中HVJ-E载体的量</li> <li>● (对于贴壁细胞)</li> </ul> 细胞加入HVJ-E载体后清洗10分钟到3小时，并更换培养基 <ul style="list-style-type: none"> <li>● (对于悬浮细胞)</li> </ul> 缩短HVJ-E载体加入细胞后的最小离心时间(10分钟)，设定离心温度为4℃。
	制备质粒DNA时污染了大量内毒素	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 用适当的方法减少内毒素水平。</li> </ul>
	细胞接触的C试剂过多	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 减少C试剂使用量(1/2-1/4)，或跳过此步骤。</li> </ul>
	培养细胞的条件不适合用于转染	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 由于细胞可能存在支原体污染，请使用适当的工具进行支原体检测。去除支原体或换用新鲜无污染的培养基。</li> </ul>
	如果以上检测和试验均为阴性，且实验无任何改善，HVJ-E载体可能对您的细胞类型有特殊毒性。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HVJ-E载体在几分钟内与靶细胞膜牢固结合并进行融合，对非常敏感的细胞可能其毒性难以完全消除。但可以通过以下步骤减少其细胞毒性。</li> <li>● 在导入这一步骤中，将HVJ-E载体和细胞置于4℃或冰上结合15 min(HVJ-E颗粒和细胞膜可在更低温度下结合)，然后除去HVJ-E载体，并更换培养基。</li> <li>● 在更高细胞密度下进行转染。</li> </ul>