



Gene Company Limited
基因有限公司 A Gene Group Company

Lonza Nucleofector™ 4D核转染系统

培训手册



基因有限公司生命科学组

二〇一八年七月

目 录

- 一、 **Lonza Nucleofector™4D核转染系统技术特点**
- 二、 **系统安装条件**
- 三、 **培训所需试剂设备及样品**
- 四、 **培训程序及时间安排**
- 五、 **仪器及试剂系统介绍**
- 六、 **实验操作流程**
- 七、 **软件使用培训**
- 八、 **常见问题处理**
- 九、 **报错信息**

一、Lonza Nucleofector™4D 核转染系统技术特点

Nucleofector®技术是 Lonza 公司的专利创新技术，利用传统的点穿孔技术配合高效率细胞转染液，通过预置的优化好的转染程序，直接把外源基因导入目标细胞的细胞核和细胞质中。与传统的电穿孔仪相比，对于原代细胞、干细胞以及难转染的细胞系等较难转染的哺乳动物细胞，Nucleofector®技术的转染效率更高、细胞存活率更好，最高转染效率可达 99%。由于外源基因直接入核，所以外源基因的表达不依赖于细胞的分裂，最快在转染 2 小时后就能观察到转染进去的基因的蛋白表达。

技术优势：

1. 超高的转染效率，无论是原代细胞、干细胞还是难转染的细胞系，都可以得到高转染率。
大多数细胞系和原代细胞的转染率为 50%-70%。
2. 最广泛的转染底物，无论是系统生物学的蛋白底物、结构基因组学的质粒、功能基因组学的 RNA，还是药物研究中的脂质体，都能够进行高效的转染。
3. 快速转染，由于转染不依赖于细胞分裂，大大减少了转染的时间，一些转染实验中可在转染后 2-4 小时即进行检测。
4. 简单易用的系统平台，系统内置了常用转染的参数，配合对应的转染试剂即可快速完成实验。
5. 全球共享的数据库，针对 1000 多种细胞的转染操作数据库，包括细胞处理、转染效率、存活率等各方面验证方案，全球共享，并在不断的更新完善。细胞库中有超过 1200 种细胞的信息可供检索，已有 6000 多篇的发表文献，并有针对不同细胞进行优化的 protocol。

应用领域：

原代细胞、干细胞、难转染细胞系转染

二、系统安装条件

1. 位置要求：稳定水平的操作平台放置设备，远离热源，避免阳光直射

2. 空间及载重要求：

操作平台尺寸（长×宽×高）： 45 x 10.5 x 28 cm; 系统由核心单元和一个功能单元平行拼接组成

操作平台载重： 8.0kg; 系统由核心单元和一个功能单元组成

3. 电源：100 - 110 VAC or 230 VAC; 50 - 60 Hz; 自我调节

电源功率：140VA

4. 其它：通用插头接线板

三、培训所需试剂设备及耗材

实验所需试剂耗材：

细胞样品

转染底物

Nucleofector Kit

细胞培养液

胰酶

PBS或HBSS

离心机

荧光显微镜/流式细胞仪/共聚焦等

细胞计数仪或计数板

其它配套试剂设备：

离心机、移液枪，Tip头，手套等

如用户需要培训时尝试自己的样品，请在培训前提前做好相应实验准备，我们的培训将从细胞消化开始，之前的步骤由用户自行完成。前期细胞样本准备步骤请参照 Lonza 的细胞类型特异性 protocol 进行操作。

四、培训程序及时间安排

为保证培训效果，请安排2-4名实验室长期工作人员参加培训，并指定一名仪器负责人，以

后如有人员变动由用户自行负责内部培训。

培训时间为1天，具体培训内容如下：

1. 基本原理讲解及讨论；
2. 软件基本功能综述及使用培训；
3. 用户实际操作培训；
4. 实验和仪器操作问题答疑。

五、仪器及试剂系统介绍

1. 基本原理讲解
2. 仪器系统组成和工作原理讲解
3. 配套试剂介绍

六、实验操作流程

原代细胞转染参考流程（以 HUVEC 细胞为例）

以 MCF7 细胞转阳性质粒 pmaxGFP 为例，4D-X 细胞转染实验流程如下：

- 1) 将 Nucleofector Solution 与 Supplement 按照 4.5: 1 比例混匀作为电转液（建议现配现用）
- 2) 启动 Nucleofector System，选择合适的电转程序；
- 3) 在 6 孔细胞培养板中，每孔加入 1.5mL 细胞培养液，放入 CO₂ 培养箱 37℃ 预热；
- 4) MCF 细胞消化：移除培养基后用 PBS 洗一遍，加入胰酶 37℃ 约 5min 后加入 PBS 终止消化。
- 6) 细胞计数，取 2×10^6 （范围 $6 \times 10^6 - 8 \times 10^5$ ）继续进行后续实验；
- 7) 细胞离心：室温 90xg 10 分钟，去掉上清液；
- 8) 用步骤 1 所配好的电转液重悬细胞，轻柔吹吸混匀；
- 9) 准备转染底物：阳性质粒 2uL 加入步骤 8 重悬的细胞中，轻柔吹吸混匀（转染底物不能超过总体系体积的 1/10，如电极杯不超过 10uL，电极条板不超过 2uL）；
- 10) 将步骤 9 所得样品 100uL 加入电极杯底部，确保无气泡；

- 11) 将电极杯放入仪器 X Unit 中的电极杯位，启动程序；
- 12) 程序结束后，将电极杯取出。取 500uL 步骤 3 所预热的培养液重悬细胞；
- 13) 用 Pipet 将电极杯中所有液体取出，加入 6 孔细胞培养板剩余的 1000uL 细胞培养液中继续培养；
- 14) 4-24 小时观察转染效果。

Contents of one Nucleofection™ Sample and recommended program

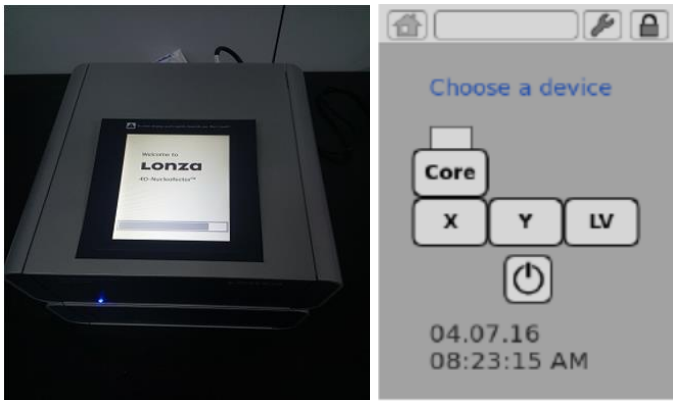
	100 µl Single Nucleocuvette™	20 µl Nucleocuvette™ Strip
Cells	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
Substrate*	pmaxGFP™ Vector	2 µg
	or plasmid DNA (in H ₂ O or TE)	0.5–5 µg
	or siRNA	30–300nM siRNA (3–30 pmol/sample)
P5 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Solution	100 µl	20 µl
Program	CA-167	CA-167

* Volume of substrate should comprise maximum 10 % of total reaction volume

七、软件使用培训

1. 开机

打开电源，屏幕上显示 “Welcome to Lonza 4D -Nucleofector™”，并出现初始化进度条，仪器开始自检，自检完成后出现主屏幕，如下图



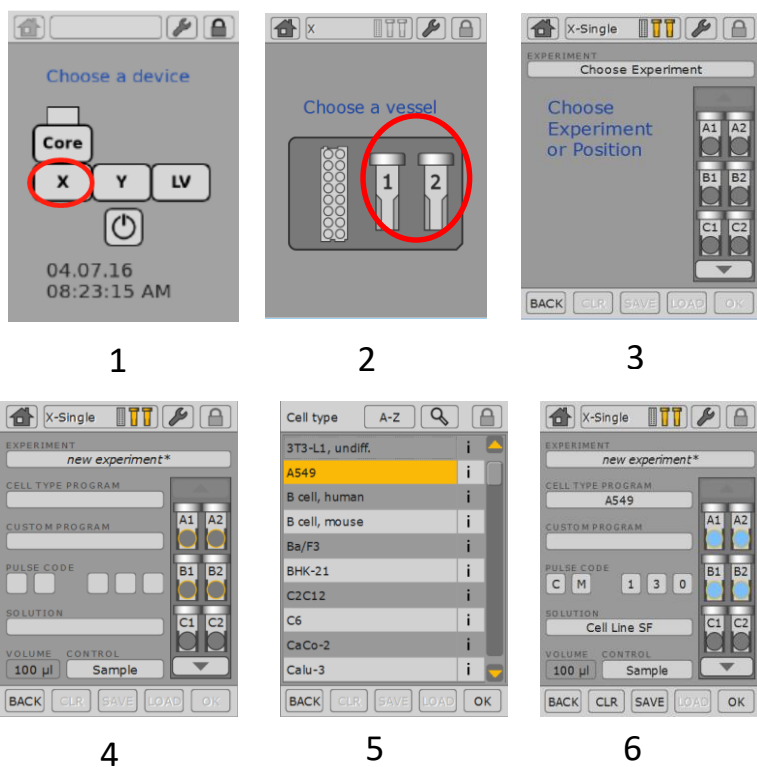
2. 调节触摸屏位置

按压触摸屏上方，讲其解锁，随后可以根据需要调节其高度，有四个角度可以选择：0°、30°、45° 和 60°。



3. 使用预置程序

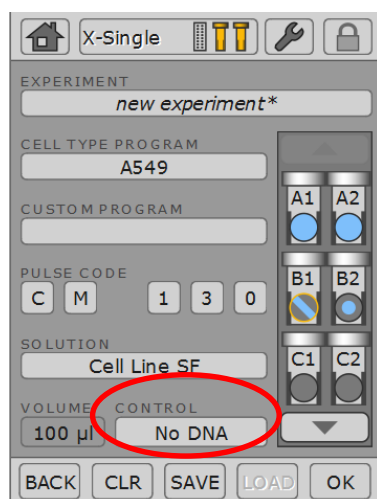
- 1) 在主界面 “Choose a device” 选择 X Unit (如下图 1 所示)。
- 2) 点击 X 后出现 “choose a vessel” 界面。根据试剂盒选择电极杯转染或电极条板转染。(如下图 2 所示) 电极杯的转染体系为 100uL, 电极条板的转染体系为 20uL。
- 3) 以电极杯转染实验为例, 点击电极杯后, 出现 “Choose Experiment or Position” 界面 (如下图 3 所示)。根据转染样品在仪器托架上的位置选择软件对应的位置, 可选一个或多个 (如下图 4 所示)。转染每次可放入左右两个电极杯, A1, B1...Z1 对应托架左侧电极杯位置, A2, B2...Z2 对应托架右侧电极杯位置。转染顺序按软件中孔位顺序进行, 依次为 A1 和 A2; B1 和 B2;; Z1 和 Z2。例如, 下图中首先放入两个电极杯分别按照 A1 和 A2 的程序转染, 转染结束后托架弹出, 软件将提示继续放入另外两个电极杯, 点击 OK 确认后仪器继续按 B1 和 B2 程序转染。
- 4) 点击 CELL TYPE PROGRAM, 出现仪器预设的细胞菜单 (如下图 5 所示), 选择待转染的细胞名称。则与此细胞相适应的优化的参数和适用的试剂盒名称自动显示 (如下图 6 所示)。例如选择 A549 细胞, 此细胞的转染电参数 “CM 130”, 转染试剂盒 “Cell Line SF”, 转染体系体积 “100ul”。



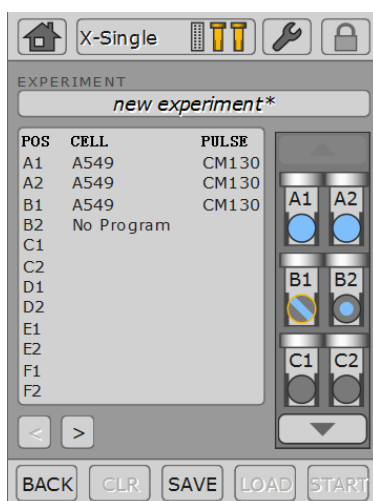
5) 在 CONTROL 中可选择样本和对照类型,设置时需先选中孔位,再选择 control 类型。

如单击 B1 孔, 选择 No DNA。对照类型包括三种, 软件会以不同的图标显示。

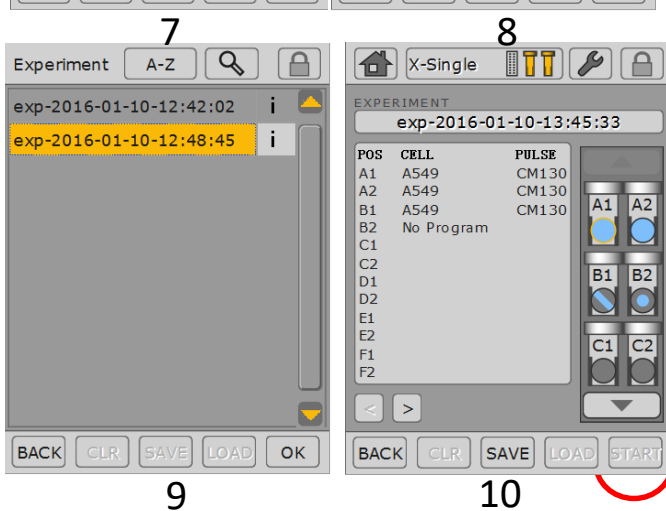
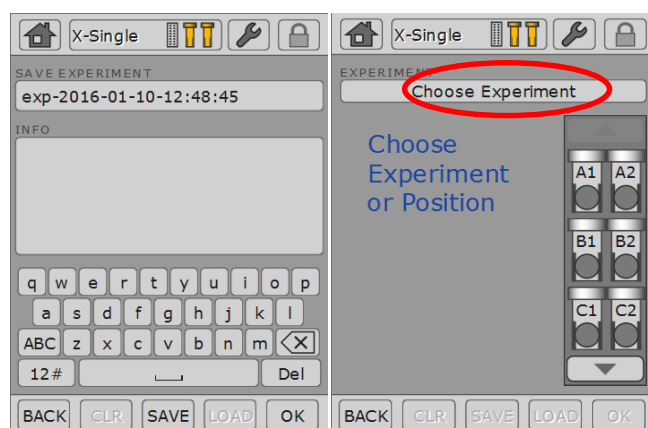
- Sample: 正常转染, 如下图 A1, A2 孔位所示。
- No DNA: 只有细胞, 未添加转染底物的的阴性对照, 如下图 B1 孔位所示。
- No program: 无转染程序, 即不进行电转的阴性对照, 如下图 B2 孔位所示。



6) 点击 ok 后, 屏幕显示已设置的每个孔位的细胞类型和转染电参数 (如下图所示)。



7) (可选)点击 SAVE, 保存为实验。如图 7 所示, 可在“SAVE EXPERIMENT”下编辑任意名称, “INFO”中可填写备注信息。单击 SAVE, 实验保存成功。保存实验后, 可直接在“Choose Experiment or Position”界面 (如下图 8 所示) 选择 Choose Experiment 菜单, 选择保存的实验名称即可直接进入此实验。



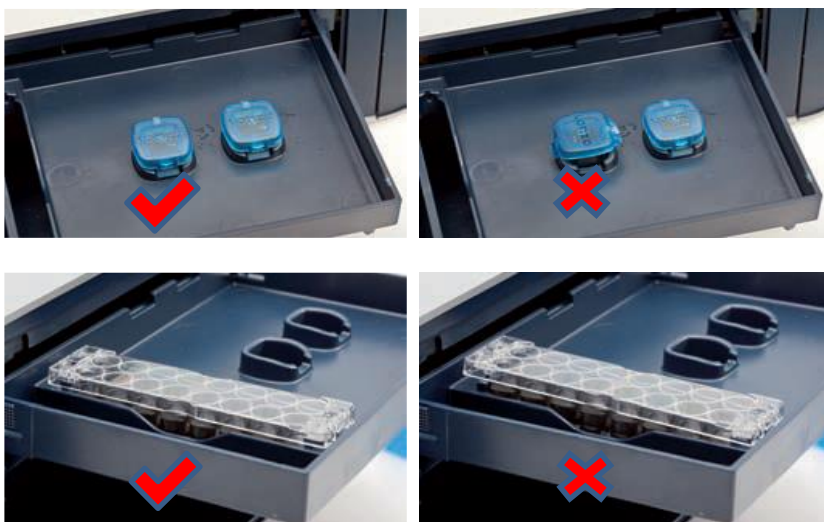
8) 点击“START”, X Unit 中的托架弹出。放入电极杯 (如下图所示)。点击“OK”开始转染。



注意：

电极杯和电极条板应以正确的方向放入仪器托架（如下图所示）。

- 电极杯盖上的“LONZA”标识，应朝向操作人员方向。
- 电极条板若按错误方向放置，电极板后部会翘起，高度将超过托架边缘高度。



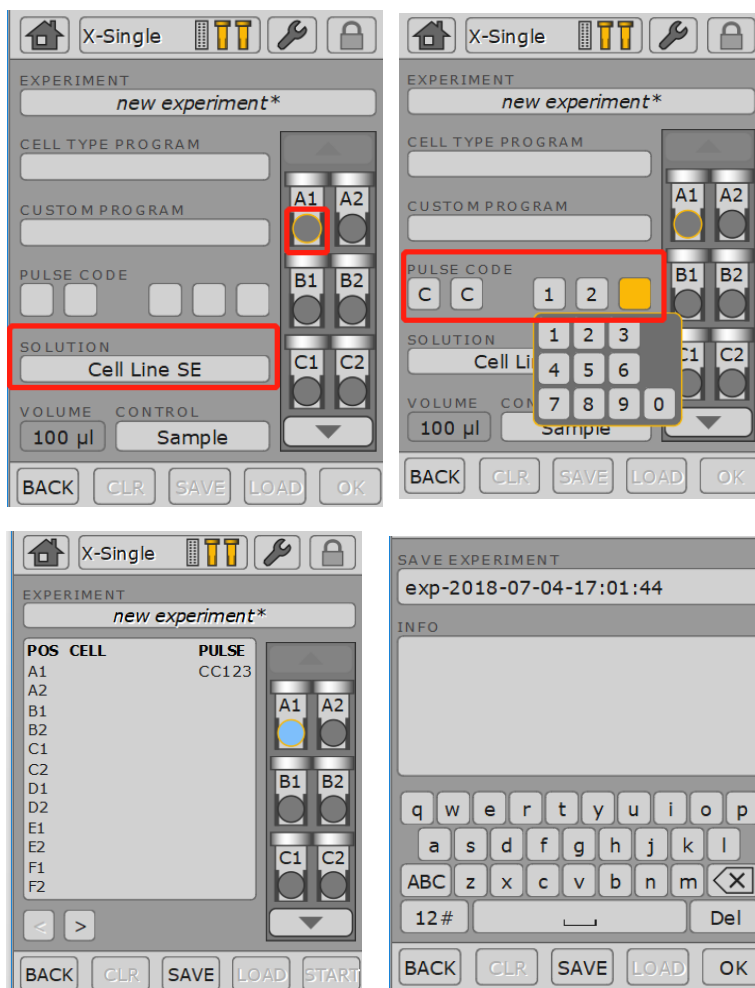
注意：只能选用 LONZA 试剂盒中干净的电极杯或电极条板，此电极杯通过了严格的质量检测。如果重复使用 Lonza 电极杯或电极条板、使用其它品牌电极杯或条板都会影响实验结果。且非此系统配套的电极杯和电极条板将会对仪器造成损害。

9) 转染结束后 X Unit 中的托架自动弹出，将电极杯取出后继续进行后续实验。

4. 自行编辑实验

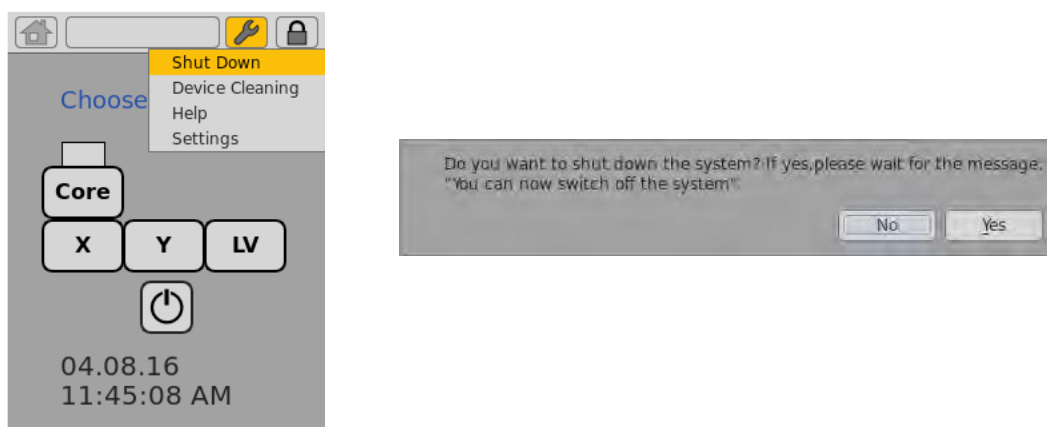
- (1) 选择想要使用的功能模块
- (2) 选择想要使用的上样容器：电转杯或电转板
- (3) 在“Choose Experiment or Position”界面中选择某一个上样位置（例如A1）

- (4) 先进行试剂盒类型的选择，之后再“pulse code”中手动输入电转程序；
- (5) 可在“CONTROL OPTIONS”中选择合适的对照类型；
- (6) 点击“SAVE”进行保存并命名



5. 关机

点击屏幕上的关机键，或者点击屏幕右上方的扳手符号，点击“shut down”。仪器会提示Do you want to shut down the system? If yes, please wait for the message. "You can now switch off the system", 即是否要关闭仪器，若要关闭，请等待仪器屏幕上“可以关闭仪器电源”的提示，之后关闭仪器后边的电源。



6. 其他设置

点击右上角的扳手图标，选择“Settings”：

- **Experiments** – display user-defined experiments
- **Custom programs** – create and manage custom Nucleofection™ Programs
- **Results** – reopen or load result files onto a USB stick plugged into the USB port in front of the Core Unit
- **Lonza programs** – version information about the cell type list
- **Display and audio** – adjust brightness of the touch screen display, time to activate standby and deactivate the touch tone
- **Date and time** – set and format date and time
- **Language and keyboard** – change language settings for display functions and keyboard
- ... more: To switch between pages of the settings list
- **Firmware update** – update the system software (see chapter 2.10 for details)
- **Device cleaning** – opens the tray of the functional modules to remove it for cleaning
- **System restart** – restart system
- **Transport lock** – activates the transportation lock of the system
- **Synchronize** – supports synchronization of the actual firmware with the PC Editor
- **Version** – displays firmware version and serial number of all Modules

7. 清洁Nucleofection™ Vessel Tray

为了方便清洁，Nucleofection™ Vessel Tray可以从仪器上拆卸下来，方法如下：

- (1) 打开“Settings”菜单，点击“Device cleaning”
- (2) 抽屉弹出，按压Tray两侧的塑料突起，将其取出
- (3) 用水清洗Tray并擦干
- (4) 将Tray装回原处，点击“DONE”
- (5) 抽屉关闭，Tray回到原位

八、常见问题处理

问题	可能原因	建议
Low survival rate	Cells were kept in Nucleofector™ Solution too long	Transfer cells immediately into pre-warmed medium as recommended in the optimized protocol.
	Cells were damaged by harvesting procedure or through handling	Avoid harsh conditions during cell harvesting, especially centrifugation at higher speed or

		overexposure to trypsin. Pipette cells smoothly as they are quite stressed already. Use a plastic Pipette as recommended in the optimized protocols.
	Cells culture conditions were suboptimal	Cells should be viable and in culture for several passages. Avoid excessive cell densities or cell confluencies since this may decrease cell viability post Nucleofection™. For further details please refer to the dedicated optimized protocol.
	Multiple use of Cuvettes	We strongly recommend using the Nucleofection™ Vessels only once, because the high voltage pulses that are applied drastically affect their physical integrity.
	Poor DNA quality	DNA used for Nucleofection™ should be of high purity. We strongly recommend endotoxin-free preparation of the DNA. Do not use procedures involving phenol /chloroform treatment.
Low substrate transfer	DNA amount is too low	We recommend a certain DNA amount per sample (depending on cell type and Nucleofection™ Vessel; for details please refer to respective optimized protocol). If both transfer efficiency and cell mortality are low, the DNA amount could be increased. Increasing DNA amount may lead to higher transfection efficiency, but at the same time result in higher cell mortality.
	Cell number in Nucleofection™	Please use the cell numbers

	sample too high or too low	recommended in the dedicated optimized protocol.
	Poor DNA quality	DNA used for Nucleofection™ should be of high purity. We strongly recommend endotoxin-free preparation of the DNA. Do not use procedures involving phenol /chloroform treatment.

九、报错信息

	Parameter file	Result file, OK	Result file, warning	Result file, error	Skipped well
Undefined					
Defined					
No program control					
No substrate control					