

Lipofectamine® 2000 Reagent

[Learn More](#)

invitrogen™
by life technologies™



Package Contents

Catalog Number

- 11668-030 [Buy Now](#) 0.3 mL vial
- 11668-027 [Buy Now](#) 0.75 mL vial
- 11668-019 [Buy Now](#) 1.5 mL vial
- 11668-500 [Buy Now](#) 15 mL vial

Size



Storage Conditions

Store at 4°C (do not freeze).



Required Materials

- Plasmid DNA (0.5–5 µg/µL stock)
- Opti-MEM® Reduced Serum Medium
- Eppendorf tubes



Timing

Preparation: 10 minutes
Incubation: 5 minutes
Final Incubation: 1–3 days



Selection Guide

[Lipofectamine® Reagents](#)

Go online to view related products.



Product Description

- Lipofectamine® 2000 Reagent is a proprietary formulation for transfecting nucleic acids into a wide range of eukaryotic cells.



Important Guidelines

- DNA-Lipofectamine® 2000 complexes must be made in serum-free medium such as Opti-MEM® Reduced Serum Medium and can be added directly to cells in culture medium, in the presence or absence of serum/antibiotic.
- It is not necessary to remove complexes or change/add medium after transfection.
- The amount of Lipofectamine® 2000 Reagent required for successful transfection varies depending on the cell type and passage number. Start any new transfection by testing the recommended four concentrations of Lipofectamine® 2000 Reagent to determine an optimum amount.



Online Resources

Visit our [product page](#) for additional information and protocols. For support, visit www.lifetechnologies.com/support.



Protocol Outline

- Plate cells so they will be 70–90% confluent at the time of transfection.
- Prepare plasmid DNA-lipid complexes.
- Add DNA-lipid complexes to cells.

Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

i See page 2 to view a typical DNA transfection procedure.

Component	96-well	24-well	6-well
Final DNA per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Final Lipofectamine® 2000 Reagent per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL

Co-Transfection of Plasmid DNA and siRNA

Transfect plasmid DNA and siRNA at the same time using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 30 pmol (~0.6 µg) of siRNA per 1 µg of DNA.

mRNA Transfection

mRNA can be transfected in a 24-well plate using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 0.5–1 µg of mRNA per well.

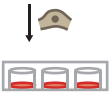




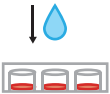

i Photograph of Expected Results

i Scaling Up or Down Transfections

i Limited Product Warranty and Disclaimer Details

Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

Transfect cells according to the following chart. Volumes are given on a per-well basis. **Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (6-well) transfections, and accounts for pipetting variations.** Adjust the amounts of components according to your tissue culture format. For additional information on scaling your transfection reaction, see page 1.

Timeline		Steps	Procedure Details				
Day 0	1		Seed cells to be 70–90% confluent at transfection	Component	96-well	24-well	6-well
	2		Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	Adherent cells	1–4 × 10 ⁴	0.5–2 × 10 ⁵	0.25–1 × 10 ⁶
Day 1	3		Dilute DNA in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4
	4		Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)	Lipofectamine® 2000 Reagent	i 1, 1.5, 2, 2.5 µL	i 2, 3, 4, 5 µL	i 6, 9, 12, 15 µL
	5		Incubate	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL
	6		Add DNA-lipid complex to cells	DNA (0.5–5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg
	7		Visualize/analyze transfected cells	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL
Day 2–4				Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
				Incubate for 5 minutes at room temperature.			
				Component	96-well	24-well	6-well
				DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
			Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng	
			Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL	
			Incubate cells for 1–3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.				

Lipofectamine™ 2000

Cat. No. 11668-027 Size: 0.75 ml

Cat. No. 11668-019 Size: 1.5 ml

Cat. No. 11668-500 Size: 15 ml

Store at +4°C (do not freeze)

产品特点

Lipofectamine 2000 转染真核细胞具有以下优点：

- 对多种细胞和培养器皿具有很高的转染效率，成功转染的细胞系。
见 [www.invitrogen.com Cell Lines](http://www.invitrogen.com/Cell Lines) 数据库。
- 核酸-Lipofectamine 2000 复合物（转染液）可直接加入细胞培养基中，不管培养基是否含有血清。
- 转染后不必去除转染液，或者改变或添加培养基，但转染 4 -6 小时后可去除转染液。

注意事项

- 推荐在混合前使用 Opti-MEM 低血清培养基 (Cat. No. 31985-062) 稀释 Lipofectamine 2000 和核酸。
- 转染过程中勿向培养基中添加抗生素，以免造成细胞死亡。
- 不同批实验请保持细胞接种条件相同。
- 请检测无血清培养基与 Lipofectamine 2000 的兼容性，因为一些无血清培养基（如 CD293, SFM II, VP-SFM 等）可能抑制阳离子脂质体介导的的转染。

脂质体 RNAi 或 siRNA 转染

下列步骤适用于 24 孔板培养的哺乳动物细胞，至于其他培养材料，请参考转染规模调整，所有数量和体积均是按每孔计算。

1. 转染前一日，将细胞接种于 500 μ l 不含抗生素的培养基中，使其在转染时长至 30 - 50% 融合。
2. 转染液制备，每孔细胞用量如下：
 - A. 用 50 μ l Opti-MEM 低血清培养基（或者其他无血清培养基）稀释 20 pmol siRNA（转染时 siRNA 终浓度为 33 nM），轻轻混匀；
 - B. 使用前轻轻摇匀 Lipofectamine 2000，然后取 1 μ l Lipofectamine 2000 在 50 μ l Opti-MEM 培养基中稀释，室温孵育 5 分钟。注意：请在 25 分钟内进行下一步操作；
 - C. 将前两步所稀释的 DNA 和 Lipofectamine 2000 混合（使总体积为 100 μ l），轻轻混匀，室温放置 20 分钟（溶液可出现浑浊）。
3. 在每孔细胞中加入 100 μ l 转染液，轻轻摇匀。
37°C 培养 24 - 96 小时后检测基因表达，转染 4 - 6 小时后可更换培养基。

脂质体 siRNA 转染优化

可调整 siRNA 与 Lipofectamine 2000 的用量以优化转染，在 24 孔板，siRNA 可在 10 - 50 pmol 之间调整，Lipofectamine 2000 可在 0.5 - 1.5 μ l 之间调整，在增加细胞密度时也应优化转染剂量。

脂质体 DNA 转染

下列步骤适用于 24 孔板培养的哺乳动物细胞，至于其他培养材料，请参考转染规模调整，所有数量和体积均是按孔计算。大部分细胞系所使用的 DNA (μ g) 与 Lipofectamine 2000

(μl) 的比值为 1:2 到 1:3, 转染高密度细胞可获得高转染效率、高表达水平和低细胞毒性。优化转染是必需的 (见优化脂粒 DNA 转染)。

1. 贴壁细胞: 转染前一天每孔 $0.5 - 2 \times 10^5$ 个细胞接种于 $500 \mu\text{l}$ 不含抗生素的培养基中, 在转染时细胞可长至 90 - 95% 融合。

悬浮细胞: 在配制转染液前每孔 $4 - 8 \times 10^5$ 个细胞接种于 $500 \mu\text{l}$ 不含抗生素的培养基中。

2. 转染液制备, 每孔细胞用量如下:

A. 用 $50 \mu\text{l}$ Opti-MEM 低血清培养基 (或者其他无血清培养基) 稀释质粒 DNA, 轻轻混匀;

B. 使用前轻轻摇匀 Lipofectamine 2000, 然后取适量 Lipofectamine 2000 在 $50 \mu\text{l}$ Opti-MEM 培养基中稀释, 室温孵育 5 分钟。注意: 请在 25 分钟内进行下一步操作;

C. 将前两步所稀释的 DNA 和 Lipofectamine 2000 混合 (使总体积为 $100 \mu\text{l}$), 轻轻混匀, 室温放置 20 分钟 (溶液可出现浑浊)。注意: 转染复合物常温下可在 6 小时内保持稳定。

3. 在每孔细胞中加入 $100 \mu\text{l}$ 转染液, 轻轻摇匀。

4. 37°C 培养 18-48 小时后检测基因表达, 转染 4-6 小时后可更换培养基。

5. 对于稳定转染, 在转染 24 小时后以 1:10 稀释接种于新鲜培养基中, 第二天可加入选择培养基。

优化脂质体 DNA 转染

可通过改变细胞密度、质粒 DNA 密度和 Lipofectamine 2000 浓度以优化转染。要保证细胞融合在 90% 以上, DNA (μg): Lipofectamine 2000 (μl) 可在 1:0.5 到 1:5 之间进行调整。

转染规模调整

不同培养材料转染液、细胞和培养基的用量按照培养材料面积换算。在 96 孔板细胞高通量自动分析系统, 推荐每孔使用 $50 \mu\text{l}$ 转染液。注意: 在 96 孔板, 可将细胞直接接种于转染液中以实现快速转染, 直接在培养板中配制转染液 $100 \mu\text{l}$, 直接将细胞加入培养板中, 其密度为上述方法的 2 倍, 细胞在转染液中可正常贴壁。

培养材料	每孔面积	接种培养基	稀释用 Opti-MEM	siRNA 转染		DNA 转染	
				siRNA	Lipofectamine2000	DNA	Lipofectamine2000
96 孔板	0.3 cm^2	$100 \mu\text{l}$	$2 \times 25 \mu\text{l}$	5 pmol	$0.25 \mu\text{l}$	$0.2 \mu\text{g}$	$0.5 \mu\text{l}$
24 孔板	2 cm^2	$500 \mu\text{l}$	$2 \times 50 \mu\text{l}$	20 pmol	$1.0 \mu\text{l}$	$0.8 \mu\text{g}$	$2.0 \mu\text{l}$
12 孔板	4 cm^2	1 ml	$2 \times 100 \mu\text{l}$	40 pmol	$2.0 \mu\text{l}$	$1.6 \mu\text{g}$	$4.0 \mu\text{l}$
6 孔板	10 cm^2	2 ml	$2 \times 250 \mu\text{l}$	100 pmol	$5 \mu\text{l}$	$4.0 \mu\text{g}$	$10 \mu\text{l}$
60-mm	20 cm^2	5 ml	$2 \times 0.5 \text{ ml}$	200 pmol	$10 \mu\text{l}$	$8.0 \mu\text{g}$	$20 \mu\text{l}$
10-cm	60 cm^2	15 ml	$2 \times 1.5 \text{ ml}$	600 pmol	$30 \mu\text{l}$	$24 \mu\text{g}$	$60 \mu\text{l}$

