

M5 磷酸钙法细胞转染试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 磷酸钙法细胞转染试剂盒	200T	MF499-01

【储存条件】

-20℃, 12 个月

【产品简介】

外源基因导入真核细胞的方法有很多种,如磷酸钙转染法、DEAE-葡聚糖转染法、脂质体法、电穿孔法、显微注射法等。源叶生物磷酸钙法细胞转染试剂盒(Calcium Phosphate Cell Transfection Kit)是在传统的磷酸钙细胞转染方法的基础上进行了改良,提高了转染效率,并降低了毒性,可用于磷酸钙法转染细胞,不仅可以瞬时表达,也可以筛选稳定株。HEK293 是最适合磷酸钙法转染的细胞之一,优化条件后转染效率可以高达 85%以上,一般的转染效率可达 40~50%左右。其他常见细胞(例如 HeLa、CHO 细胞等)也适合磷酸钙法转染,但效率比 293 细胞要略低一些。本转染试剂盒主要适合于大多数贴壁细胞的转染,也可于一些悬浮细胞的转染,一般要求 DNA 浓度在 10~50 μ g 为宜,HeLa、BALB 等细胞沉淀放置 16h,CHO、DUKX、BII 等细胞可以通过甘油、DMSO 进行热休克处理以提高转染效率。

【产品组份】

试剂(A): Calcium chloride solution 20ml
试剂(B): BBS solution 20ml

【注意事项】

- 1、注意无菌操作,尽量避免污染,同时 DNA 不应含有蛋白和酚。
- 2、休克处理某些细胞系会使转染效率大大提高,但应注意甘油暴露过久易导致细胞死亡。
- 3、转染 12~24h 后,可以加入终浓度为 10mmol/L 的丁酸钠溶液,可以提高病毒滴度。
- 4、BBS solution 的 pH 值直接关系到转染效率,尽量避免长时间暴露在空气中,以免被空气中的二氧化碳酸化。

【自备材料】

- 1、胰蛋白酶消化液
- 2、完全培养基
- 3、PBS
- 4、无菌水

【操作步骤】

(一)贴壁细胞转染:

- 1、在转染前 24h 用胰蛋白酶消化培养细胞,取适量对数期细胞转移至新的培养器皿中,待细胞密度达 70~80%即可进行转染。后续操作步骤均按 6 孔板计算,如果转染器皿不同,请按比例自行调节用量。
- 2、在加入 DNA 之前 2~4h,加入 2ml 不含抗生素的完全培养液,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。
- 3、取 2~6 μ g DNA(体积不宜超过 20 μ l)加入 100 μ l Calcium chloride solution,混匀,即为 DNA-CaCl₂ 溶液。

- 4、取 BBS solution 100 μ l，用移液器一边吹打 BBS solution，一边逐滴加入 DNA-CaCl₂ 溶液(操作缓慢，一般在 1~2min)。
- 5、室温静置 20~30min，即为 DNA-CaCl₂-BBS 溶液，此时可能出现极其微小颗粒沉淀。
- 6、取 DNA-CaCl₂-BBS 溶液底部物质均匀加入到 6 孔板细胞中，轻轻晃动混匀。
- 7、置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 4~16h。如果培养细胞为 CHO、DUKX 等，可以 DMSO 或甘油进行休克处理，转染效率会大大增加，即培养 4~6h 后，用 2ml 含 10%甘油或 20%DMSO 的完全培养液替换当前培养液，室温下静置 3min，加 5ml PBS 摇动混匀。
- 8、去除培养液，用 PBS 清洗细胞 2 次，加入 2ml 完全培养液继续培养，一般 24h 后可见转染细胞的表达。

(二)悬浮细胞转染：

- 1、低速离心收集悬浮细胞，用 PBS 洗涤 1 次。
- 2、取 2~6 μ g DNA(体积不宜超过 20 μ l)加入 100 μ l Calcium chloride solution，混匀，即为 DNA-CaCl₂ 溶液。
- 3、取 BBS solution 100 μ l，用移液器一边吹打 BBS solution，一边逐滴加入 DNA-CaCl₂ 溶液(操作缓慢，一般在 1~2min)。
- 4、室温静置 20~30min，即为 DNA-CaCl₂-BBS 溶液，此时可能出现极其微小颗粒沉淀。
- 5、每 10 个细胞沉淀用 100 μ l DNA-CaCl₂-BBS 溶液重新悬浮，室温放置 20~30min。
- 6、6 孔板每孔加入 2ml 不含抗生素的完全培养基，取 DNA-CaCl₂-BBS 溶液底部物质均匀加入到 6 孔板中，轻轻晃动混匀。
- 7、置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 4~16h，去除培养液，用 PBS 清洗细胞 2 次，加入 2ml 完全培养液继续培养，一般 24h 后可见转染细胞的表达。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。