

DEAE-Dextran细胞转染试剂盒

产品货号: T10114

产品规格: 100T/200T

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(Dextran)转染法、脂质体法、电穿孔法、显微注射法等。DEAE-葡聚糖转染法的原理是带正电荷的DEAE-葡聚糖不带负电的核酸的磷酸骨架相互作用, 形成复合物, 该复合物通过细胞内吞噬作用使DNA转导进入细胞核。

尚宝生物 DEAE-Dextran细胞转染试剂盒(DEAE-Dextran Cell Transfection Kit)适用于瞬时转染 (transient tranfection), 不宜用于筛选稳定表达细胞株, 这是因为DEAE-dextran在较高浓度作用较长时间会对细胞产生一定毒性。氯喹的加入可以抑制溶酶体对外源DNA的降解, 从而提高转染效率。但对于具体的细胞、具体的培养条件, 如需获得更加理想的转染效率, 须自行摸索上述各种转染方法, 找出优化的转染方法。CHO、DUKX、B II等细胞也可以通过甘油、DMSO进行热休克处理以提高转染效率。

产品组成:

试剂名称	100T	200T	保存条件
试剂(A): DEAE-Dextran solution	10ml	20ml	-20℃
试剂(B): TBS-D buffer	500ml	2×500ml	4℃
试剂(C): Chloroquine solution	1.8ml	3.5ml	4℃

自备材料:

1. 胰蛋白酶消化液
2. 完全培养基
3. PBS、无菌水

操作步骤(仅供参考):

(一) 常规转染:

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50~70%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. 弃培养液, 用PBS清洗细胞2次, 再用TBS-D buffer清洗1次, 吸尽残液。
3. 配制转染液: 对于6孔板, 按照下表依次加入8μl DEAE-Dextran, 2μl DNA以及适量的TBS-D, 使其总体积为170μl, 即为DEAE-Dextran-DNA-TBS-D转染液, 用移液器轻轻吹打混匀, 但不宜采用离心或Vortex等剧烈方式。

试剂	6孔板	24孔板	60mm培养皿	100mm培养皿
DEAE-Dextran	(162-x)μl	(40-x)μl	(325-x)μl	(540-x)μl
DNA	xμl(2μg)	xμl(0.5μg)	xμl(4μg)	xμl(7μg)
TBS-D	8μl	2μl	17μl	28μl
总体积	170μl	42μl	342μl	568μl
细胞培养液	1.7ml	0.4ml	3.5ml	6ml
Chloroquine(可选)	17μl	4μl	35μl	60μl

备注: 对于六孔板中一个孔的细胞, DNA可以在1~3μg的范围内进行适当调节。最佳的转染条件, 因具体的细胞和培养条件而定, 可以在上述推荐范围内自行优化转染条件。对于其它培养板或培养器皿, 试剂的用量可大致按照细胞培养面积按比例换算。

4. 转染: 把170μl转染液滴加到细胞表面, 轻轻晃动6孔板, 使其不细胞表面充分接触, 37℃孵育20~40min, 观察细胞至皱缩变圆为止。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 参考上表，每孔缓慢加入1.7ml细胞培养液(约DEAE-Dextran-DNA-TBS-D转染液体积的10倍)。
- 可选步骤：参考上表，每孔加入17 μ l Chloroquine solution，亦可和上一步骤中1.7ml细胞培养液预先混合后一起加入。
- 培养不超过2h或在出现明显的细胞毒性前，更换新鲜培养液继续培养，通常转染后48~72小时可以检测转染效果。

(二) 预处理转染：

- 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50~70%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。
- 弃培养液，用PBS清洗细胞2次，再用TBS-D buffer清洗1次，吸尽残液。
- 配制转染液：对于6孔板，按照下表依次加入0.1ml DEAE-Dextran、0.9ml PBS，使其总体积为1ml，即为DEAE-Dextran工作液。
- 预转染：对于6孔板，把1ml转染液滴加到细胞表面，轻轻晃动6孔板，使其不细胞表面充分接触，37 $^{\circ}$ C孵育10min。
- 洗涤：弃液，用TBS-D buffer轻轻清洗1次，PBS轻轻清洗1次，注意防止细胞脱落。
- 弃洗涤液，参考下表，每孔缓慢均匀加入162 μ l DNA工作液。
- 37 $^{\circ}$ C孵育30min，参考下表，每孔缓慢加入1.7ml细胞培养液(约DNA工作液体积的10倍)。

试剂	6孔板	24孔板	60mm培养皿	100mm培养皿
DEAE-Dextran	0.1ml	25 μ l	0.2ml	0.4ml
PBS	0.9ml	225 μ l	1.8ml	3.6ml
DEAE-Dextran工作液	1ml	250 μ l	2ml	4ml
DNA	x μ l(2 μ g)	x μ l(0.5 μ g)	x μ l(4 μ g)	x μ l(7 μ g)
PBS	(162-x) μ l	(40-x) μ l	(325-x) μ l	(540-x) μ l
DNA工作液	162 μ l	40 μ l	325 μ l	540 μ l
细胞培养液	1.7ml	0.4ml	3.5ml	6ml
Chloroquine(可选)	17 μ l	4 μ l	35 μ l	60 μ l

备注：对于六孔板中一个孔的细胞，DNA可以在1~3 μ g的范围内进行适当调节。最佳的转染条件，因具体的细胞和培养条件而定，可以在上述推荐范围内自行优化转染条件。对于其它培养板或培养器皿，试剂的用量可大致按照细胞培养面积按比例换算。

- 可选步骤：参考上表，每孔加入17 μ l Chloroquine solution，亦可和上一步骤中1.7ml细胞培养液预先混合后一起加入。
- 培养不超过4h或在出现明显的细胞毒性前，更换新鲜培养液继续培养，通常转染后48~72小时可以检测转染效果。

注意事项：

- 注意无菌操作，尽量避免污染，同时 DNA 不应含有蛋白和酚。
- 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。
- 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。
- 如果转染效率低下，有可能是过多细胞死亡所致，应考虑减少 DEAE-Dextran 的用量或作用时间，或者减少氯喹作用时间。
- 支原体污染细胞，易导致转染不稳定。

有效期：6个月有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com