

磷酸钙法细胞转染试剂盒

产品货号: T10176

产品规格: 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-葡聚糖转染法、脂质体法、电穿孔法、显微注射法等。尚宝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、B II等细胞可以通过甘油、DMSO进行热休克处理以提高转染效率。

产品组成:

试剂名称	200T	保存条件
试剂(A): Calcium chloride solution	20ml	-20 $^{\circ}$ C
试剂(B): BBS solution	20ml	-20 $^{\circ}$ C

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 (仅供参考):

(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 $^{\circ}$ C 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。



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

(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 μg DNA(体积不宜超过20 μl)加入100 μl Calcium chloride solution, 混匀, 即为DNA-CaCl₂溶液。
3. 取BBS solution 100 μl , 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 μl 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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。

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>