

## 磷酸钙法细胞转染试剂盒

货号： C7071

规格： 200T

### 保存条件：

-20℃保存，有效期 12 个月。

### 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。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 10~50μg 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。

本产品仅用于科研，不宜用于临床诊断或其他用途。

### 组成：

名称	规格	200T	Storage
试剂(A): Calcium chloride solution		20ml	-20℃
试剂(B): BBS solution		20ml	-20℃

### 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，加入不含抗生素的完全培养液，置于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养，37℃，5% CO<sub>2</sub>。
3. 取 2~6μg DNA(体积不宜超过 20μl)加入 100ul Calcium chloride solution 混匀即为 DNA-CaCl<sub>2</sub> 溶液。

4. 取 BBS solution 100 $\mu$ l, 用移液器一边吹打 BBS solution, 一边逐滴加入 DNA-CaCl<sub>2</sub> 溶液(操作缓慢, 一般在 1~2min)。
5. 室温静置 20~30min, 即为 DNA-CaCl<sub>2</sub>-BBS 溶液, 此时可能出现极其微小颗粒沉淀。
6. 取 DNA-CaCl<sub>2</sub>-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% CO<sub>2</sub> 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, 加 PBS 摇动混匀。
8. 去除培养液, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 加入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 $\mu$ g DNA(体积不宜超过 20 $\mu$ l)加入 Calcium chloride solution, 混匀, 即为 DNA-CaCl<sub>2</sub> 溶液。
3. 取 BBS solution 100 $\mu$ l, 用移液器一边吹打 BBS solution, 一边逐滴加入 DNA-CaCl<sub>2</sub> 溶液(操作缓慢, 一般在 1~2min)。
4. 室温静置 20~30min, 即为 DNA-CaCl<sub>2</sub>-BBS 溶液, 此时可能出现极其微小颗粒沉淀。
5. 每 10<sup>6</sup> 个细胞沉淀用 100 $\mu$ l DNA-CaCl<sub>2</sub>-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-CaCl<sub>2</sub>-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% CO<sub>2</sub> 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。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。