

Calcium Phosphate Cell Transfection Kit

产品描述

磷酸钙转染法是将外源DNA导入真核细胞的常用方法。原理是将磷酸盐缓冲液和含有待转染DNA质粒的CaCl₂溶液进行缓慢混合形成DNA-磷酸钙共沉淀物，由于DNA-磷酸钙共沉淀物可与细胞表面结合而粘附于细胞，之后通过细胞内吞作用最终将外源DNA转入目的细胞。

该方法已被成功用于多种细胞系以获得瞬时或稳定转染，如HEK293细胞是最适合磷酸钙法转染的细胞之一，其他常见细胞(例如Hela、CHO细胞等)也适合磷酸钙法转染，但转染效率比HEK293细胞要略低一些。本产品在传统磷酸钙法的基础上进行改良，不仅提高转染效率，也降低了细胞毒性，同时试剂盒提供高度一致的pH值和盐浓度也可以保持一致的转染效率，适合大多数贴壁细胞或悬浮细胞的转染需求。

组分和储存条件

Components	Size	100 T	200 T
	2M CaCl ₂		10 mL
2X HBS formula		10 mL	20 mL

Store the components at 4 °C.

使用方法

以6孔板一孔为例，如果转染器皿不同，请按比例自行调节用量

一 贴壁细胞转染：

1. 转染前一天细胞计数铺板，每孔接种(7-8)×10⁵细胞为宜，37°C 5% CO₂培养箱培养。待细胞密度在70-90%时进行转染。
2. 转染前30-60 min吸除培养液，更换2 mL新鲜培养液，同时将转染所需试剂取出升温至37°C。
3. 每孔DNA质粒加入量控制在1-5 μg，吸取16.5 μL 2M CaCl₂溶液，加ddH₂O配成125 μL DNA-CaCl₂混合液，混合液CaCl₂浓度稀释为0.26 M。
4. 另取125 μL 2X HBS formula溶液加入到DNA-CaCl₂溶液中，移液枪轻柔吹打约20次混匀，即为DNA-CaCl₂-HBS转染溶液（若同时转染多个6孔板，每个孔板应单独配置，混合配置容易导致钙沉淀变少，影响转染效率）。

- 枪尖没过细胞培养液将上述转染液均匀加入到孔板细胞中（不要沿着孔壁或者滴入的方式加入转染液），也可在吹打混匀转染液后，室温静置 30 min 再行加入。轻晃孔板使转染液均匀分布。
- 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱，培养 4-6 h 后吸除培养液，更换 2 mL 新鲜培养液，此时显微镜下可以观察到明显的颗粒沉淀。
- 继续培养 24 h 后通常可观察到转染基因表达。

二 悬浮细胞转染：

- 低速离心收集悬浮细胞，用 PBS 洗涤 1 次。
- 同上述步骤 3、4，制备 DNA-CaCl₂-HBS 转染溶液。
- 每 10⁶ 个细胞沉淀用 100 μL DNA-CaCl₂-HBS 溶液重新悬浮，室温放置 20-30 min。
- 6 孔板每孔加入 2 mL 新鲜培养基，取上述细胞转染悬浮液均匀接种到 6 孔板中，轻晃孔板使溶液均匀分布。
- 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 4-6 h，离心沉淀细胞去除培养液，PBS 洗涤 1 次，更换 2 mL 培养液继续培养 24 h，通常可观察到转染基因表达。

■ 注意事项

- 高纯度的质粒是获得高转染效率的必要条件，确保 A260/A280 > 1.8，建议电泳检测质粒完整性。
- 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。
- HBS 缓冲液的 pH 值和转染效率相关，尽量避免 HBS 缓冲液长时间暴露在空气中，以免被空气中的 CO₂ 酸化。
- 转染时由于质粒、细胞不同，最佳的质粒用量需自行摸索。当转染具有相同质粒 DNA 的多个孔板时，为了减少变异需要制备足够量的转染液。
- 注意无菌操作，尽量避免污染，同时 DNA 不应含有蛋白和酚。
- 本产品仅作科研用途。

■ 常见问题与解决方案

1. 转染效率低

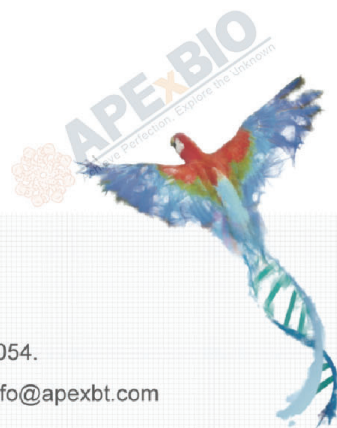
可能原因	解决方案
磷酸钙-DNA 沉淀形成不佳	添加 2X HBS 溶液太快或太少都会导致沉淀效果不佳，将 2X HBS 添加到 DNA-CaCl ₂ 中应持续轻缓混匀。
DNA 质量差	质粒 DNA 的 A260/A280 比值应 ≥ 1.7。
pH 值不佳	HBS 溶液的 pH 值应在 7.05-7.12 之间。长时间的储存过程中可能导致溶液的 pH 值发生变化。因此应该在购买试剂盒后尽快使用。

2. 实验转染效率不一致

可能原因	解决方案
细胞密度不同	尽可能保持细胞密度恒定。通常在细胞密度 70%-90%进行转染。
细胞生长不佳	保持细胞健康生长，应对处于对数期中期生长的细胞进行转染。传代过多的细胞系会降低转染效率。

3. 毒性

可能原因	解决方案
磷酸钙加入后或在 24 小时内细胞死亡	优化细胞密度，更高的细胞密度有利于维持细胞生存。
	优化细胞与转染试剂的孵育时间，有些细胞可能对磷酸钙更敏感。
	转染的基因产物可能具有毒性。



APEX-BIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com

Tel: 021-55669583; Fax: 021-55669583

<http://www.apexbio.cn/>; Email: sales@apexbio.cn.