

Version 1

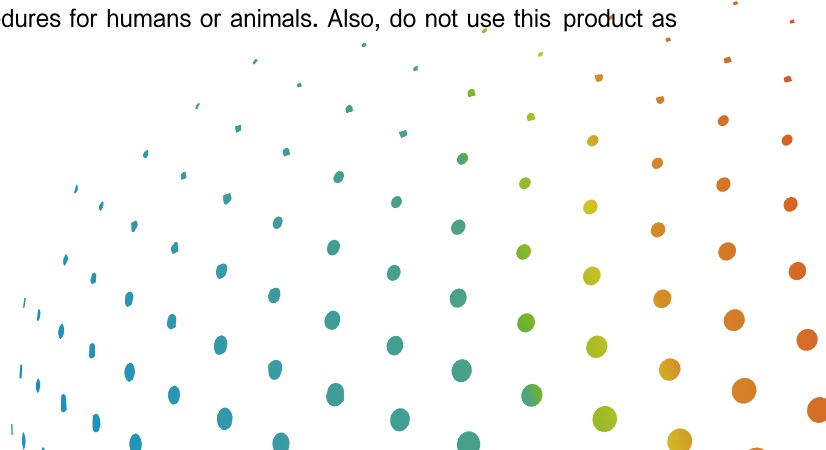
Code No. AG51002



AccuFect 细胞转染试剂盒 (磷酸钙法) *AccuFect* Cell Transfection Kit (Calcium Phosphate)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

磷酸钙介导的转染是将外源 DNA 导入进细胞应用最广泛的方法之一，其原理是在含有磷酸盐的 HEPES 缓冲液中，质粒 DNA 与钙离子形成 DNA/磷酸钙的沉淀，该沉淀会吸附在细胞表面，通过胞吞作用被细胞吸收；被转染的 DNA 可以在细胞内进行瞬时表达，也可以整合到靶细胞的基因组上产生稳定克隆。该方法操作简单，适用于多种哺乳动物贴壁细胞的质粒 DNA 转染。

➤ 产品组成

组分名称	AG51002 (200 rxns / 6 well plate)
Calcium Solution	1.25 ml × 4 pcs
2X Hebes Buffered Saline (HBS) *	10 ml × 4 pcs
Sterile Water	9 ml × 4 pcs

*: 2X Hebes Buffered Saline (HBS) 应避免反复冻融。建议在首次解冻后，按照实验需求进行分装，置于 -20℃ 保存。

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃ 保存【2X Hebes Buffered Saline (HBS) 建议解冻后按照实验需求进行分装，置于 -20℃ 保存，避免反复冻融。】

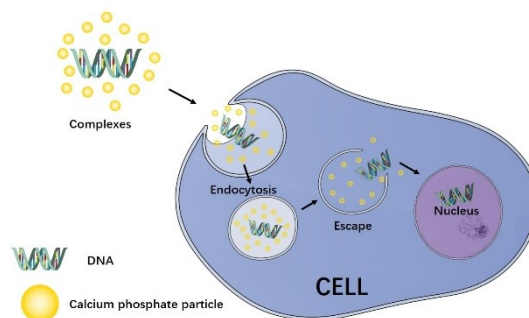
运输温度：干冰运输或 -20℃ 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品的 pH 值以及盐离子浓度高度稳定，能保证转染效率的高度一致性；
2. 本产品不仅适用于细胞的瞬时转染，也适用于细胞的稳定转染；
3. 本产品适用于大部分贴壁细胞。

➤ 实验原理

磷酸钙转染法的原理是 DNA 与钙离子通过静电作用结合，形成不溶解且极小的磷酸钙颗粒，DNA / 磷酸钙复合物通过静电作用与细胞表面结合，通过胞吞作用进入细胞内，在细胞质中解离并释放出 DNA，促进 DNA 核内递送，进行转录和表达。被转染的 DNA 可以在细胞内进行瞬时表达，也可整合到靶细胞的基因组上而产生稳定克隆。



➤ 使用注意事项

1. 实验过程中所使用的耗材需保证无菌污染。
2. 初次实验可考虑利用带有荧光标签的质粒对细胞密度、转染试剂以及 DNA 的添加量进行摸索，确定目的细胞的最佳转染条件。
3. 细胞生长状态会直接影响转染效率。因此，转染实验应使用生长健康且状态良好的细胞，转染时细胞融合度达到 50%~80%，具体密度根据培养的细胞状态进行调整。
4. 建议 2X HEPES Buffered Saline (HBS) 首次解冻后根据实验需要进行分装，保存于 -20℃，避免反复冻融，2X HEPES Buffered Saline (HBS) 溶液的 pH 值直接影响转染效率，尽量避免把该溶液长时间暴露在空气中，以免被空气中的 CO₂ 酸化。
5. 转染试剂与 DNA 孵育完成后，加入至细胞中可能会在显微镜下观察到极其微小的颗粒沉淀，若培养基未浑浊且沉淀无明显自主运动的情况下，为正常现象。
6. 使用过程中请佩戴一次性手套等防护用品，避免造成细胞污染。
7. 本产品的分装以及实验操作建议在生物安全柜中完成。

➤ 实验前准备

1. 确认细胞生长状态以及细胞融合度，确保转染时细胞融合度达到 50%~80%。
2. 按需解冻 2X HEPES Buffered Saline (HBS) 溶液，请提前将本试剂盒产品取出，待恢复至室温后再进行实验。
3. 准备实验所需的质粒 DNA 以及细胞转染所需的无菌材料。

➤ 操作方法（以 6 孔板为例）

此操作方法以 6 孔细胞培养板的单孔为例，其他类型培养皿或培养板可参考<附录 1: 不同培养皿推荐试剂用量表>进行调整；以下所有操作建议在无菌操作台中进行。

1. 转染前一天接种适量细胞于培养皿或培养板内，使细胞在转染前均匀铺板且融合度达到 50% ~ 80%。
(注：一般 6 孔板可接种 2~8 X10⁵ 细胞/孔，不同类型的细胞生长速度和细胞大小不一致，建议在正式实验前接种不同密度的细胞，摸索最佳的细胞接种条件。)
2. 转染前，提前将转染试剂取出，待其恢复至室温后再进行后续转染实验。
3. 准备转染试剂：取干净无菌的离心管，按照下表顺序先配制 Solution A。
(注：根据需求选择不同规格的离心管，为避免混匀时将转染试剂弹出，建议配制的

转染试剂总溶液（即 Solution A+Solution B）不超过所使用离心管最大容积的一半，如 1.5 ml 离心管配制不超过 750 μ l 的转染试剂。）

Solution A: 按下表顺序逐个加样并混匀溶液:

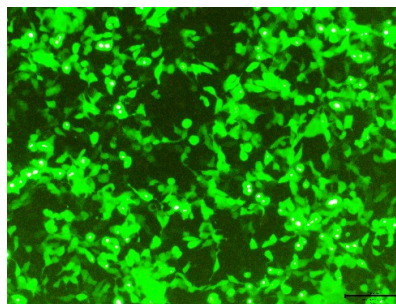
组分	体积 (μ l)
Sterile Water	_____ μ l
质粒 DNA	6 μ g
Calcium Solution	24.8 μ l
总体积	200 μ l

Solution B: 200 μ l 2X HEPES Buffered Saline (HBS)

- 向混匀后的 Solution A 中边滴加 Solution B 边用手指轻敲离心管管壁，以使 Solution B 溶液迅速分散混匀，避免局部浓度较高。Solution B 全部加完后盖上离心管盖继续用手指轻敲离心管 10 sec，短暂离心后使用移液枪轻柔的吹打混匀 10~15 次。
- 在室温下孵育 10 min（可 5 ~ 15 min 调整），等待转染复合物形成，此时可能出现极其微小的颗粒沉淀。
- 孵育结束后，使用移液枪轻柔吹打混匀 10~15 次，按照每孔 400 μ l 转染复合物溶液均匀地滴加到 6 孔板中，轻轻前后左右晃动培养皿或培养板，使转染复合物均匀分布在细胞上。
（注：混匀时避免旋转培养皿或培养板，防止沉淀集中于孔中间。若加入 400 μ l 转染复合物溶液对细胞伤害较大导致细胞脱落时，也可减少转染复合物的加入量。）
- 将 6 孔板放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中，继续培养 8 h。
（注：不同细胞系最佳的孵育时间可能会有所不同，可根据实际情况在 8 h~过夜调整优化。）
- 去除含有转染试剂的培养基，再加入 2 ml 新鲜的完全培养基，根据实验需要置于 CO₂ 培养箱中继续培养 24~72 h，收集细胞进行基因表达情况检测或后续实验，通常在转染 24 h 后就可检测到转染基因的表达。

➤ 实验例

12 孔板中，使用本产品转染 3 μ g 的 EGFP 质粒至 293T 细胞 48 h 后，在显微镜下可观察到很强的绿色荧光，获得较高的转染效率，如右图所示：



293T 细胞 (12 孔板)

➤ 产品注意事项

1. 合适的细胞可获得较好的转染效率

- ❖ **不同种类的细胞**对转染试剂及方法常表现出不同的转染效率。磷酸钙的转染方法适用于贴壁细胞，对悬浮细胞转染效率较低。因此，不建议使用本产品进行悬浮细胞的转染；同时，在正式实验前可使用报告基因表达载体（如带 GFP 绿色荧光蛋白标签的质粒）进行转染预实验，摸索最佳的转染条件。
- ❖ 在实验室培养、保存过程中，细胞会发生不同的突变、总染色体重组或基因调控等变化。同一种系的细胞株，在各实验室不同培养条件下，其生物学性状会发生不同程度的改变，导致其转染特性也发生变化。因此，不同实验室的细胞转染效率不同，建议在正式实验前进行预实验，摸索最佳的转染条件。
- ❖ **细胞状态**同样会影响转染效率。最适合转染的细胞是处于指数生长期的细胞，细胞生长旺盛，容易转染。传代次数高时，细胞的生长速度和形态会发生改变。细胞传代次数过多、细胞受到污染常导致细胞生长状态较差从而降低转染效率，建议使用复苏后经过传代培养 2~3 代，处于指数生长期、健康且无污染的健康细胞，解冻后传代次数建议不要超过 10 次。
- ❖ **细胞接种密度**：活跃分裂期的细胞能更好地摄取外源核酸，细胞接种密度过高时可能会引起接触抑制，导致核酸摄取不良、转染效率下降或表达效率降低；细胞接种密度过低时，转染后可能会影响细胞正常生长；细胞接种不均匀导致细胞局部密度过于密集或稀疏，影响转染效率。不同的细胞生长速率以及细胞大小有所不同，因此，建议正式实验前先对细胞密度进行摸索获得合适的细胞接种密度，一般建议将细胞转染时（接板~24 h 后）的细胞密度控制在 50%~80%。

2. 使用高质量的质粒

- ❖ DNA 质量对转染效率有较大的影响，若质粒中存在污染物会影响细胞正常生长；而盐离子可能会干扰转染复合物的形成，从而降低转染效率；内毒素的存在会影响细胞生长状态大大降低原代细胞和其他敏感细胞的转染效率。因此转染需使用高纯度、无内毒素以及无菌的高质量质粒 DNA，且需确保质粒 DNA 的 A260/A280 的比值在 1.8~2.0 的范围。可使用本公司无内毒素质粒提取试剂盒（Code No. AG21028）提取获得高质量的质粒 DNA 用于转染。

- ❖ 最佳的质粒用量可参考<附录 1: 不同培养皿推荐试剂用量表>进行摸索。不同的细胞种类最佳的质粒与转染试剂比例有所不同, 质粒添加量过少和过多, 均可能导致转染效率较低, 建议在首次实验时可进行 DNA 质粒添加量的摸索。

3. 转染试剂影响

- ❖ 2X HEPES Buffered Saline (HBS) 溶液的 pH 值直接影响细胞的转染效率, 尽量避免该溶液长时间暴露于空气中, 以免被空气中的 CO₂ 酸化; 因此, 建议 2X HEPES Buffered Saline (HBS) 首次解冻后根据需要进行分装, 保存于 -20°C, 避免反复冻融及多次使用。
- ❖ 转染试剂的用量会影响转染效率, 建议参考<附录 1: 不同培养皿推荐试剂用量表>添加质粒与转染试剂的用量。若转染效果不好时, 可尝试增加转染复合物的加入量; 转染复合物溶液过多可能影响细胞生长, 若出现细胞脱落, 可减少转染复合物试剂用量, 再摸索质粒用量以提高转染效率。

4. 细胞培养物

- ❖ 新鲜且无污染的培养基对细胞正常生长至关重要, 若培养基长期放置可能会影响细胞生长而影响转染效率。因此建议使用新鲜配制的培养基, 配制后放置时间不超过 1 个月。
- ❖ 血清是一种包含生长因子及其他辅助因子的不确切成分的添加物, 对不同细胞的生长作用有很大的差别。血清质量的变化直接影响细胞的生长状态, 进而可能间接地影响转染效率。建议使用高品质的血清培养细胞, 以确保细胞生长状态良好能获得较理想的转染效率。
- ❖ 细胞培养过程中一般会加入抗生素来防止真菌、细菌等污染, 通常情况下抗生素对细胞无害。当进行转染实验时, 转染试剂可能会增加细胞膜的通透性, 使过量的抗生素进入细胞内, 导致细胞死亡, 造成转染效率降低。通常情况下, 本产品不受抗生素的影响。
- ❖ 某些细胞使用 10%~20% DMSO 或甘油进行休克处理后, 可能会增加转染效率。但这些化学物质对细胞有毒, 因此需要根据不同细胞类型, 优化试剂浓度和暴露时间等条件。

➤ 附录 1: 不同培养皿推荐试剂用量表

培养皿	Solution A			Solution B	转染复合物 添加量 (μ l)	可摸索质粒添 加范围*(μ g)
	质粒(μ g)	Calcium Solution(μ l)	Sterile water (μ l)	2X HBS (μ l)		
48 孔	0.75	3.1	Up to 25 μ l	25	50	0.4-1.2
24 孔	1.5	6.2	Up to 50 μ l	50	100	0.8-2.4
12 孔	3	12.4	Up to 100 μ l	100	200	1.6-4.8
6 孔	6	24.8	Up to 200 μ l	200	400	3.2-9.6
10 cm	42	174	Up to 1400 μ l	1400	2800	22.4-67.2

注: 不同的细胞最佳转染条件不一样, 若使用推荐用量所得的转染效果不理想则可根据上表中推荐的“可摸索质粒添加范围”优化转染条件。上表中均表示单孔所需试剂量。