

AccuFect 细胞转染试剂盒（磷酸钙法）

AccuFect Cell Transfection Kit (Calcium Phosphate)

Code No. AG51002

包装量: 200 rxns / 6 well plate
保存温度: -20 °C

➤ 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。

➤ 保存及运输

保存温度：-20 °C保存

运输温度：干冰运输或-20°C冰袋运输

➤ 产品组成

Calcium Solution	1.25 ml × 4 pcs
2X Hebes Buffered Saline (HBS) *	10 ml × 4 pcs
Sterile Water	9 ml × 4 pcs

*: 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°C保存。

➤ 注意事项

1. 实验过程中所使用的耗材需保证无菌污染，实验过程中请佩戴一次性手套等防护用品，避免造成细胞污染；
2. 试剂分装以及实验操作建议在生物安全柜中完成。
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 Hebes Buffered Saline (HBS) 首次解冻后根据实验需要进行分装，保存于-20°C，避免反复冻融，且该溶液的pH值直接影响转染效率，尽量避免长时间暴露在空气中，以免被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。

➤ 实验操作（以6孔细胞培养板为例）

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. **细胞准备:** 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:

- ① 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。
- ② 准备转染试剂: 取干净无菌的离心管, 按照配制Solution A与Solution B。(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)

- ③ 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。
- ④ 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。

- ⑤ 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。)
- ⑥ 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至过夜调整优化。)
- ⑦ 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。

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

*: 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。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

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.