

DEAE-Dextran 细胞转染试剂盒

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(Dextran)转染法、脂质体法、电穿孔法、显微注射法等, DEAE-葡聚糖转染法的原理是带正电荷的 DEAE-葡聚糖与带负电的核酸的磷酸骨架相互作用, 形成复合物, 该复合物通过细胞内吞噬作用使 DNA 转导进入细胞核。

Leagene DEAE-Dextran 细胞转染试剂盒(DEAE-Dextran Cell Transfection Kit)适用于瞬时转染(Transient Transfection), 不宜用于筛选稳定表达细胞株, 这是因为 DEAE-dextran 在较高浓度作用较长时间会对细胞产生一定毒性; 氯喹的加入可以抑制溶酶体对外源 DNA 的降解, 从而提高转染效率, 但对于具体的细胞、具体的培养条件, 如需获得更加理想的转染效率, 须自行摸索上述各种转染方法, 找出优化的转染方法, CHO、DUKX、BII 等细胞也可以通过甘油、DMSO 进行热休克处理以提高转染效率。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	编号	CZ0010	CZ0010	Storage
		100T	200T	
试剂(A): DEAE-Dextran Solution		10ml	20ml	-20°C
试剂(B): PBS(10×)		50ml	100ml	4°C
试剂(C): Chloroquine Solution		1.8ml	3.5ml	4°C
使用说明书		1 份		

自备材料:

- 1、胰蛋白酶消化液、完全培养基、无菌水

操作步骤(仅供参考):

(一)常规转染:

- 1、配制 PBS(1×): 用无菌水将 PBS(10×)稀释至 1×, 即可。
- 2、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 50~70%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。
- 3、弃培养液, 用 PBS(1×)清洗细胞 2~3 次, 吸尽残液。
- 4、配制转染液: 对于 6 孔板, 按照下表依次加入 8 μ l DEAE-Dextran Solution, 2 μ gDNA

以及适量的 PBS(1×), 使其总体积为 170 μ l, 即为 DEAE-Dextran-DNA-PBS 转染液, 用移液器轻轻吹打混匀, 但不宜采用离心或 Vortex 等剧烈方式。

试剂	6 孔板	24 孔板	60mm 培养皿	100mm 培养皿
DEAE-Dextran Solution	8 μ l	2 μ l	17 μ l	28 μ l
DNA	x μ l(2 μ g)	x μ l(0.5 μ g)	x μ l(4 μ g)	x μ l(7 μ g)
PBS(1×)	(162-x) μ l	(40-x) μ l	(325-x) μ l	(540-x) μ l
总体积	170μl	42μl	342μl	568μl
细胞培养液	1.7ml	0.4ml	3.5ml	6ml
Chloroquine Solution (可选)	17 μ l	4 μ l	35 μ l	60 μ l

备注: 对于六孔板中一个孔的细胞, DNA 可以在 1 ~ 3 μ g 的范围内进行适当调节, 最佳的转染条件, 因具体的细胞和培养条件而定, 可以在上述推荐范围内自行优化转染条件; 对于其它培养板或培养器皿, 试剂的用量可大致按照细胞培养面积按比例换算。

- 5、转染: 把 170 μ l 转染液滴加到细胞表面, 轻轻晃动 6 孔板, 使其与细胞表面充分接触, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 ~ 40min, 观察细胞至皱缩变圆为止。
- 6、参考上表, 每孔缓慢加入 1.7ml 细胞培养液(约为 DEAE-Dextran-DNA-PBS 转染液体积的 10 倍)。
- 7、可选步骤: 参考上表, 每孔加入 17 μ l Chloroquine Solution, 亦可和上一步骤中 1.7ml 细胞培养液预先混合后一起加入。
- 8、培养不超过 2h 或在出现明显的细胞毒性前, 更换新鲜培养液继续培养, 通常转染后 48 ~ 72 小时可以检测转染效果。

(二)预处理转染:

- 1、配制 PBS(1×): 用无菌水将 PBS(10×)稀释至 1×, 即可。
- 2、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 50 ~ 70%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。
- 3、弃培养液, 用 PBS(1×)清洗细胞 2~3 次, 吸尽残液。
- 4、配制转染液: 对于 6 孔板, 按照下表依次加入 0.1ml DEAE-Dextran Solution、0.9ml PBS(1×), 使其总体积为 1ml, 即为 DEAE-Dextran 工作液。
- 5、预转染: 对于 6 孔板, 把 1ml 转染液滴加到细胞表面, 轻轻晃动 6 孔板, 使其与细胞表面充分接触, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。
- 6、洗涤: 弃液, 用 PBS(1×)轻轻清洗 2 次, 注意防止细胞脱落。
- 7、弃洗涤液, 参考下表, 每孔缓慢均匀加入 162 μ l DNA 工作液。
- 8、37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 参考下表, 每孔缓慢加入 1.7ml 细胞培养液(约为 DNA 工作液体积的 10 倍)。

试剂	6孔板	24孔板	60mm培养皿	100mm培养皿
DEAE-Dextran Solution	0.1ml	25 μ l	0.2ml	0.4ml
PBS(1 \times)	0.9ml	225 μ l	1.8ml	3.6ml
DEAE-Dextran 工作液	1ml	250μl	2ml	4ml
DNA	x μ l(2 μ g)	x μ l(0.5 μ g)	x μ l(4 μ g)	x μ l(7 μ g)
PBS(1 \times)	(162-x) μ l	(40-x) μ l	(325-x) μ l	(540-x) μ l
DNA 工作液	162μl	40μl	325μl	540μl
细胞培养液	1.7ml	0.4ml	3.5ml	6ml
Chloroquine Solution (可选)	17 μ l	4 μ l	35 μ l	60 μ l

备注: 对于六孔板中一个孔的细胞, DNA 可以在 1~3 μ g 的范围内进行适当调节; 最佳的转染条件因具体的细胞和培养条件而定, 可以在上述推荐范围内自行优化转染条件, 对于其它培养板或培养器皿, 试剂的用量可大致按照细胞培养面积按比例换算。

9、可选步骤: 参考上表, 每孔加入 17 μ l Chloroquine Solution, 亦可和上一步骤中 1.7ml 细胞培养液预先混合后一起加入, 培养不超过 4h 或在出现明显的细胞毒性前, 更换新鲜培养液继续培养, 通常转染后 48~72 小时可以检测转染效果。

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、如果转染效率低下, 有可能是过多细胞死亡所致, 应考虑减少 DEAE-Dextran 的用量或作用时间, 或者减少氯喹作用时间。
- 5、支原体污染细胞, 易导致转染不稳定。
- 6、试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。
- 7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6 个月有效。低温运输, 按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
DC0032	Masson 三色染色液
DF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
NR0003	Lezol(总 RNA 提取试剂)
PE0018	SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒
TC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)