

DEAE-Dextran细胞转染试剂盒

产品货号: T10114

产品规格: 100T/200T

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-葡聚糖不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。

乐业生物 DEAE-Dextran细胞转染试剂盒(DEAE-Dextran Cell Transfection Kit)适用于瞬时转染(transient tranfection),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、B II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。

产品组成:

| 试剂名称 | 100T | 200T | 保存条件 |
|------------------------------|-------|---------|------|
| 试剂(A): DEAE-Dextran solution | 10ml | 20ml | -20℃ |
| 试剂(B): TBS-D buffer | 500ml | 2×500ml | 4℃ |
| 试剂(C): Chloroquine solution | 1.8ml | 3.5ml | 4℃ |

自备材料:

1. 胰蛋白酶消化液
2. 完全培养基
3. PBS、无菌水

操作步骤(仅供参考):

(一) 常规转染:

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。
2. 弃培养液,用PBS清洗细胞2次,再用TBS-D buffer清洗1次,吸尽残液。
3. 配制转染液:对于6孔板,按照下表依次加入8μl DEAE-Dextran, 2μl DNA以及适量的TBS-D,使其总体积为170μl,即为DEAE-Dextran-DNA-TBS-D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 | (162-x)μl | (40-x)μl | (325-x)μl | (540-x)μl |
| DNA | xμl(2μg) | xμl(0.5μg) | xμl(4μg) | xμl(7μg) |
| TBS-D | 8μl | 2μl | 17μl | 28μl |
| 总体积 | 170μl | 42μl | 342μl | 568μl |
| 细胞培养液 | 1.7ml | 0.4ml | 3.5ml | 6ml |
| Chloroquine(可选) | 17μl | 4μl | 35μl | 60μl |

备注:对于六孔板中一个孔的细胞,DNA可以在1~3μg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。

4. 转染:把170μl转染液滴加到细胞表面,轻轻晃动6孔板,使其不细胞表面充分接触,37℃孵育20~40min,观察细胞至皱缩变圆为止。
5. 参考上表,每孔缓慢加入1.7ml细胞培养液(约DEAE-Dextran-DNA-TBS-D转染液体积的10倍)。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

6. 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。
7. 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. 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。
2. 弃培养液，用PBS清洗细胞2次，再用TBS-D buffer清洗1次，吸尽残液。
3. 配制转染液：对于6孔板，按照下表依次加入0.1ml DEAE-Dextran、0.9ml PBS，使其总体积为1ml，即为DEAE-Dextran工作液。
4. 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，使其不细胞表面充分接触，37 $^{\circ}$ C孵育10min。
5. 洗涤：弃液，用TBS-D buffer轻轻清洗1次，PBS轻轻清洗1次，注意防止细胞脱落。
6. 弃洗涤液，参考下表，每孔缓慢均匀加入162 μ l DNA工作液。
7. 37 $^{\circ}$ C孵育30min，参考下表，每孔缓慢加入1.7ml细胞培养液(约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 | 0.1ml | 25 μ l | 0.2ml | 0.4ml |
| PBS | 0.9ml | 225 μ l | 1.8ml | 3.6ml |
| DEAE-Dextran工作液 | 1ml | 250 μ l | 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 | (162-x) μ l | (40-x) μ l | (325-x) μ l | (540-x) μ l |
| DNA工作液 | 162 μ l | 40 μ l | 325 μ l | 540 μ l |
| 细胞培养液 | 1.7ml | 0.4ml | 3.5ml | 6ml |
| Chloroquine(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。

8. 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。
9. 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。

有效期：6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com