

CHO细胞转染试剂 C1511

1 ml in water (for 500 *in vitro* transfections in 24-well plates)

常温运输, 4 °C 1 年稳定, -20 °C 长期保存。

描述: CHO 细胞(Chinese hamster ovary cell), 为上皮样细胞, 通常贴壁生长、也可悬浮生长, 广泛应用于基因表达、抗体研究、药物开发等生物科研领域。本转染试剂适用于多种 CHO 细胞的亚型。

自备试剂: 无菌 150mM NaCl 即 0.9%生理盐水或无菌蒸馏水或 PBS 缓冲液, 用于离体细胞转染制备转染混合物。5%无菌葡萄糖, 用于离体或在体转染转染混合物制备。与复合物颗粒形成有关, 勿用其它缓冲液替代。

DNA、siRNA和寡聚核苷酸: 建议溶于灭菌蒸馏水。质粒DNA 高纯度OD260/280 ~1.8, 无内毒素。可用内毒素清除剂(#D1501) 清除内毒素。寡聚核苷酸和用于RNA干扰(siRNA)的核苷酸, 可单独或与质粒DNA共转染, 但必须使用经HPLC或凝胶洗脱纯化去除杂链的高纯度片段。siRNA和寡聚核苷酸与DNA转染及优化操作相似, 但对其用量进行细致的优化很重要。

细胞准备 (重要!)

接种细胞数: 参见附表细胞计数接种。**培养时间:** 转染前应培养~24h, 使之处于分裂和旺盛生长期。**细胞密度与转染时机:** 培养~24h后, 细胞覆盖培养皿表面积的70~90%时为转染最佳时机。低密度细胞的转染率并不低, 但总细胞数少因而蛋白表达总量也不会很高。在较高细胞密度时转染较好, 但100%长满的细胞转染效率很低, 因此接种细胞要均匀, 以减少因局部紧密接触而致生长抑制的难转染细胞, 否则最好重头接种细胞。CHO 细胞转染试剂允许在**细胞铺板时或铺板后立即转染**, 效果与贴壁后转染相似, 但大大节省时间和劳动, 适合高通量筛选。甚至一些难转染细胞也可尝试此即时转染方法。**血清和培养基:** 血清和抗生素不影响转染, 在10~30%血清培养基转染表达效率更高。转染混合物体积为培养基的1/10, 参见表第5栏。如果培

养基未明显变黄, 转染前可不更换。如转染结果满意, 转染后无需更换培养基。但转染混合物稀释了培养基, 转染4~8小时后换培养基会可进一步增加转染效率。

CHO细胞转染试剂和DNA用量及优化

任何转染和优化方案需考虑转染试剂量、DNA量、但关键是二者所带的电荷比charge ratio简称R, 即转染试剂所带正电荷基团相对于核酸负电荷磷酸基团的当量比率。通常R>3时DNA复合物带正电荷可被转染。在操作上, R值规定了二者的用量比例, 适宜的R值因细胞类型和细胞密度而异。对于离体细胞转染, 转染试剂用量和R值的计算公式如下:

$$\text{CHO细胞转染试剂体积}\mu\text{l} = 0.4 \times R \times \text{DNA } \mu\text{g数}$$

$$R = 2.5 \times \text{CHO细胞转染试剂体积}\mu\text{l} \div \text{DNA } \mu\text{g数}$$

初次转染推荐设定R=6或8(附表灰色栏)在24孔板进行**转染优化**, 确定最佳转染方案。在DNA量固定时, 对R值的优化相当于优化试剂用量, 建议设定R=5、7、9或者6、8、10三档。确定转染效率最高的R值后, 再优化DNA用量。附表建议的DNA量已接近所列细胞数的中上限, 但仍可~50%增减; 也可根据实际情况在较大范围增减DNA用量(0.5~5 μg DNA/1 $\times 10^5$ 细胞), 再按公式计算转染试剂用量。CHO细胞转染试剂在R<15时几乎没有细胞毒性, 因而无需为降低毒性而优化。

贴壁细胞转染 (以24孔板为例, 参见表一)

1. 参见表一第4、5栏。将1 μg DNA稀释于100 μl 无菌生理盐水或无菌蒸馏水或PBS缓冲液(自备, 勿用其它缓冲液但可用5%葡萄糖代替), 可振荡混匀。
2. 取2.4 μl CHO细胞转染试剂加至DNA溶液, 勿用相反的加样顺序。立即振荡混匀, 低速瞬时离心将液体甩至管底。
3. 室温放置15分钟。
4. 将100 μl 转染混合物直接加至1ml含血清培养基中(参见表一最右栏), 倾斜转动培养板混匀。转染前可不更换培养基。
5. 培养24~48小时检测基因表达, 或1:10传代后加抗生素筛选。

转染后无需更换培养基。但转染混合物稀释了培养基，转染4~8小时后换培养基可进一步增加转染效率。

表一 CHO转染试剂与贴壁细胞加样和优化表

细胞			DNA 与稀释		CHO 转染试剂体积 μl						培养基体积 ml
培养皿	面积 cm^2	接种细胞	DNA μg	生理盐水或无菌蒸馏水或 PBS 缓冲液 μl	R=5	R=6	R=7	R=8	R=9	R=10	
96-well	0.3	1.5×10^4	0.25	20	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0.2
48-well	1	5×10^4	0.5	50	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2	0.5
24-well	2	1×10^5	1	100	2	2.4	2.8	3.2	3.6	4	1
12-well	4	2×10^5	2	100	4	4.8	5.6	6.4	7.2	8	1-2
6-well 35-mm	10	4×10^5	3	200	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	2-4
60-mm 25- cm^2	28	8×10^5	5	500	10	12	14	16	18	20	5-10
100-mm 75- cm^2	75	2×10^6	10-15	1000	20-30	24-36	28-42	32-48	36-54	40-60	15

注计算公式: $\text{CHO转染试剂体积}\mu\text{l} = 0.4 \times R \times \text{DNA } \mu\text{g数}$

贴壁细胞在铺板时转染、或铺板后立即转染

1. 细胞准备: 用含血清培养基洗涤消化的细胞, 去除消化酶。
用含血清培养基制备细胞悬液, 细胞量稍大些, 以转染后24h细胞生长密度达90%, 或转染48h内完全长满为宜。
2. 制备转染混合物, 参照表一和上述贴壁细胞转染步骤。
3. 铺板后立即转染: 将细胞悬液加到培养皿中, 然后立即加入CHO转染试剂-DNA转染混合物, 混匀。
4. 铺板的同时转染: 将CHO转染试剂-DNA转染混合物预先加到培养皿中, 然后立即加入细胞悬液。
5. 培养24~48小时检测基因表达。

悬浮细胞转染

以24孔板为例。

1. 按照表二准备细胞和DNA。使用含血清培养基。通常悬浮细胞转染CHO转染试剂和DNA用量比贴壁细胞要大。初始转染推荐R=6, 随后可根据转染效率设R=6、7、8、9、10优化。注意转染DNA量参见表二适当再增加约30%并设R=8按公式计算试剂量。
2. 悬浮细胞转染: 参见贴壁细胞转染方法制备转染试剂和DNA混合物, 室温放置20分钟后直接加至1ml含血清培养基的细胞悬液中。培养24~48小时进行后续实验。

表二 CHO转染试剂转染悬浮细胞加样和优化表

细胞			DNA 与稀释		CHO 转染试剂体积 μl			培养基体积
培养皿	面积 cm^2	接种细胞	DNA μg	生理盐水或无菌蒸馏水或 PBS 缓冲液 μl	R=6	R=8	R=10	
96-well	0.3	3×10^4	0.3	20	0.72	0.96	1.2	0.2 ml
48-well	1	1×10^5	0.8	50	1.92	2.56	3.2	0.5 ml
24-well	2	2×10^5	1.5	100	3.6	4.8	6	1 ml
12-well	4	4×10^5	3	100	7.2	9.6	12	1-2 ml
6-well 35-mm	10	1×10^6	6-12	200	14.4	19.4	24	2-4 ml
60-mm 25- cm^2	28	2×10^6	10-20	500	24	32	40	5-10 ml
100-mm 75- cm^2	75	6×10^6	30-60	1000	72	96	120	10-15 ml

注: 计算公式 $\mu\text{l of CHO转染试剂} = 0.4 \times R \times \mu\text{g DNA}$