HEPES 缓冲盐溶液 (2×HeBS,pH6.7)

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- 葡聚糖转染法、脂质体法、电穿孔法、显微注射法等， 2×HEPES 缓冲盐溶液主要用于磷酸钙转染，其主要成分为 HEPES， HEPES 是一种非离子两性缓冲剂，能有效控制 pH 在 6.8 ~ 8.2 范围，尤其在 pH7.2 ~ 7.4 具有较好的缓冲能力，终浓度一般为 10 ~ 50mmol/L，培养液内含 20mmol/L HEPES 即可达到较好的缓冲能力。

HEPES 缓冲盐溶液 (2×HeBS) 是一种常用的细胞转染溶液，主要由 HEPES、氯化钠、磷酸盐等组成，其最适 pH 值约为 6.7，经过滤除菌处理；影响磷酸钙转染效率的因素主要有沉淀中 DNA 含量、 DNA 在细胞上停留的时间、休克时间， 2×HeBS 要求 DNA 浓度在 10 ~ 50μg 为宜， Hela、 BALB 等细胞沉淀放置 16h， CHO、 DUKX、 BⅡ 等细胞可以通过甘油、 DMSO 进行热休克处理以提高转染效率。该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCCC0068	Storage
HEPES 缓冲盐溶液 (2×HeBS,pH6.7)	100ml	-20℃
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、胰蛋白酶消化液、 PBS、无菌水、 $CaCl_2$ 甘油或 DMSO、筛选药物

操作步骤(仅供参考):

1、在转染前 24h 用蛋白酶消化培养细胞，取适量数期细胞转移至新的培养器皿中，使细胞在转染时生长状态良好。

2、在加入 DNA 之前 2 ~ 4h，按 9ml/10cm 培养皿的比例加入完全培养液，置于 37℃ 5% CO_2 培养箱培养。

3、取适量乙醇沉淀的 DNA 溶解于 450μl 无菌水中，加入 50μl 2.5M $CaCl_2$，并充分混匀，使 Ca^{2+} 终浓度达到 0.25M。

4、用移液器一边吹打 2×HeBS，一边逐滴加入配制好的 DNA/$CaCl_2$ 溶液 (操作应迅速，一般在 30 ~ 60s)，并剧烈振荡 5s，室温下静置 20 ~ 30min 以形成沉淀。

5、取沉淀均匀加入到培养皿细胞中，轻轻晃动使沉淀于培养液充分混匀，置于 37℃ 5%

CO_2 培养箱培养 4 ~ 16h；如果培养细胞为 CHO 、 DUKX 等，可以 DMSO 或甘油进行休克处理，转染效率会大大增加，即培养 4 ~ 6h 后用 2ml 含 10% 甘油或 20%DMSO 的完全培养液替换当前培养液，室温下静置 3min ，加 5ml PBS 摇动混匀。

6 、去除培养液，用 PBS 清洗细胞 2 次，加入 5 ~ 10ml 完全培养液继续培养。

7 、对于瞬时转染，在转染的不同时间点内收集细胞并检测，一般时间多控制在 12 ~ 60h 以内。

8 、对于稳定转染，转染后在非选择性培养液培养 18 ~ 48h ，一般时间多控制在 24 ~ 36h ，以便外源基因表达。

9 、用胰蛋白酶消化细胞并传代，更换适当的选择培养液继续培养，没 2 ~ 4d 更换一次选择培养液，一般 10 ~ 14d 会出现目的细胞克隆。

注意事项:

1 、 注意无菌操作，尽量避免污染。

2 、 对于瞬时转染，可以不用乙醇沉淀的 DNA 。

3 、 本品易被细菌污染，可分装后 -20℃ 保存，可延长保质期。

4 、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

5 、 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。

6 、 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。

7 、 该试剂用于转染时应检测其转染效率，好的转染效率应介于 30 ~ 60% 之间。

8 、 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: 12 个月有效；低温运输， -20℃ 保存。。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCCA0002	G418 溶液 (geneticin,20mg/ml)
GCCC0065	HEPES 溶液 (1mol/L,pH7.4)
GCDA0020	Hoechst33342/PI 细胞凋亡染色试剂盒
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCNR0003	Lezol(总 RNA 抽提试剂)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液 (碱性)
GCTC0099	植物总糖和还原糖检测试剂盒 (DNS 比色法)