

仅供科研使用

版本号：A 版

HEPES 缓冲盐溶液（2×HeBS, pH6.7）

【货号】 BL-300

【规格】 100mL

【保存】 -20℃，12 个月。

【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 值为 7.05~7.12，经过滤除菌处理，该产品 pH6.7。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。

【自备材料】

- 1、胰蛋白酶消化液
- 2、PBS
- 3、无菌水
- 4、CaCl₂ 溶液
- 5、甘油或 DMSO
- 6、筛选药物

【使用方法】

- 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°C 5% CO₂ 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 CaCl₂，并充分混匀，使 Ca²⁺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/CaCl₂ 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°C 5% CO₂ 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，每 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、休克处理某些细胞系会使转染效率大大提高，但注意甘油暴露过久易导致细胞死亡。
- 4、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。
- 5、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。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。