

磷酸钙转染法

材料:

质粒 DNA

指数生长的真核细胞

2 M CaCl₂

2×HBS (pH 7.05)

配方:

2×HBS (pH7.05): 900 ml 超纯水中加入 NaCl 16.3 g, KCl 0.74 g, Na₂HPO₄ 0.214 g, Glucose 2.4 g 和 HEPES 10 g, 调 pH 至 7.05, 定容至 1 升, 过滤 (0.2 μm 滤膜) 后储存于 4°C 备用。

方法:

1. 细胞分盘: 通过胰酶消化收集细胞, 用适当的完全培养基以 1×10^5 至 4×10^5 细胞/cm² 的密度平铺细胞于 60 mm 组织培养皿上 (根据实验需要选择培养皿, 使细胞贴壁后所占面积达到培养皿总面积的 40—70%)。将细胞置于含 5% CO₂ 的 37°C 温箱中孵育 8-24 h, 当细胞贴壁完全后即可开始转染。转染前 2 h 换液 (用 4 ml 新鲜的完全培养基置换旧的培养基)。

注: 为得到较高的转染效率, 尽量使用指数生长的细胞, 转染时细胞的密度不超过 80%。

2. 制备磷酸钙—DNA 沉淀: 以 60 mm 组织培养皿用 500 μl 反应总体积为例。在灭菌水中加入质粒 DNA (总量 4—10 μg 为佳), 再加入 31 μl 2 M CaCl₂, 使三者总体积达到 250 μl, 混匀。将等体积 2×HBS 盐溶液逐滴加入, 同时轻弹管壁, 使每滴加入后及时混匀。静置 2 min 后, 立即将这 500 μl 的磷酸钙—DNA 悬液逐滴加入上述单层细胞的细胞培养基中, 轻轻摇动平皿混匀。

注: 可以观察到滴入的部位培养基瞬间会出现浑浊的橘黄色, 应尽快将其混匀, 避免形成过大的颗粒, 影响转染效率。

3. 若转染的细胞不用转染促进剂处理, 则置于含 5% CO₂ 的 37°C 温箱孵育。8 h 后吸去培养基与 DNA 沉淀, 加入 5 ml 37°C 预热的完全培养基, 继续将细胞放置温箱孵育, 16-40 h 观察其转染效率。

参考：分子克隆实验指南第三版（p1284~1285）