

电穿孔转染

电转是用物理的方法将外源基因导入细胞的的一种方法,其相对具有更高的效率,通常针对较难转染的细胞系,如 hTERT-RPE1 细胞系。实验室使用 Thermo 的电转仪器系统, 本 Protocol 源自实验室经验和说明书。

Neon™ Transfection System

1. 提前准备细胞, 通常至少准备六孔板一个孔量的细胞或 6 cm 皿的细胞
2. 准备电转的质粒, 预热培养基, 质粒最好经过中提和乙醇沉淀
 - ! 质粒的纯度对电转结果影响很大, 质粒不纯会增高电转死亡率
3. 使用胰酶消化细胞, 期间取出电转仪, 接通电源, 取出工作台, 连接线路, 取出蓝盖管中的 tube, 插入工作台, 听到咯噔一声即可, 设置条件为 1050V (From 闵明玮 2019) 或 1150V (From Cath), 30ms, 2 次
4. 细胞消化后用培养基将细胞重悬, 离心, 用 PBS 涮洗一次, 计数, 离心
5. 使用 10 μ L 或 100 μ L Buffer R 重悬细胞 (可以适当多一点 务必不能有气泡), 后加入对应量质粒, 轻轻吸打混匀

电转通常有两个体系, 10 μ L 体系和 100 μ L 体系, 其对应量质粒经验值为 0.5 μ g 或 5 μ g \Rightarrow Cath 的经验值为 1 μ g for live cell imaging, 3-5 μ g for 生化, 1 μ M RNA (20 μ M x 5 μ L for 100 μ L system), 可以加倍, 细胞不会没死

电转使用的 Tip 头可以使用 10-20 次, 每次实验后使用去离子水清洗, 后紫外照射灭菌
HBSS (Hank's balanced salt solution) = **R buffer**, HBSS + 80 mM NaCl = **E buffer**

6. 加入 3 mL Buffer E (或 Buffer E2 若 100 μ L 体系) 到 tube 中, 务必不能有气泡
7. 在离心管中准备 1 mL 培养基, 准备针头, 用枪二档卡紧后, 一档可以将金属探头伸出管中, 吸上细胞和质粒的混合液后插入 tube 中, 咔哒一声卡紧
8. 按下电转仪上的 START 按钮, 显示完成后, 拔出枪管, 将针头中液体打入准备好的培养基中, 温柔混匀后分入培养皿中继续培养, 轻摇混匀
9. 关闭电转仪, 解除电源和连接线, 放回抽屉
10. 拔出 tube 和吸头(拔出里面的金属针), 放入 50mL 管中或 10 mL 管中, 用水冲洗, 紫外灭菌并晾干后放回管中, 放回盒子中

修订日期 2024-04-23