

细胞稳转辅助试剂（转座子系统专用）

目 录：GC230100506

货号	规格
----	----

储存条件：-20℃保存12个月，避免反复冻融

GC230100506	50uL
-------------	------

【产品概述】

细胞稳转辅助试剂是配套基恩科生物 GB 系列载体，进行目的基因稳转细胞系构建使用，将细胞稳转辅助试剂与目的基因表达载体混合后进行细胞转染，抗性筛选筛选后进行稳转细胞系细胞系构建，主要应用于长片段基因（CDS≥4kb）的稳转细胞系构建。

【稳转细胞系构建流程】

以 12 孔板为例，建议 12 孔板进行实验，以 Lipofectamine 3000 脂质体转染细胞为例。

(1) 细胞铺板：

转染前一天（20-24 小时），将胰酶消化后的细胞按照每孔 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞的量进行铺板（不含抗生素），使其在转染时密度为 85-95%。

(2) 转染：

将目的基因表达载体或对照荧光载体与稳转试剂混合后转染目的细胞，稳转辅助试剂、表达载体用量参考下表，具体转染步骤参考转染试剂说明书进行。

表 1 细胞稳转辅助试剂、表达载体、培养基用量

细胞培养板	表面积	辅助试剂用量 (uL)	表达载体用量 (ug)	培养基用量
12 孔板	2cm ²	0.25uL	0.75ug	1mL
6 孔板	10cm ²	1.25uL	3.75ug	2mL
60cm 培养皿	20cm ²	2.5uL	7.5ug	4mL

(3) 扩大培养：

基因修饰细胞（过表达、干扰、敲除、敲入、点突变）
 病毒包装（慢病毒、非整合慢病毒、腺病毒、腺相关病毒）
 基础实验服务（动物实验、载体构建）

转染后 12h, 换新鲜培养基, 48h 进行细胞传代, 细胞贴壁后加入 1-2.5ug/ml 嘌呤霉素的筛选培养基 (不同细胞 Puro 筛选浓度不同, 需进行预实验进行 Puro IC50 验证), 同时设置未转染的阴性对照, 连续筛选培养 3 天, 阴性对照组细胞全部凋亡, 将抗生素浓度降至一半继续扩大培养, 可通过荧光进行过表达感染效率观察。

注: 目的基因有弱启动子荧光表达, 荧光强度比较弱, 可适当将荧光强度调大后观察。

(4) 继续扩增培养:

检测目的基因的表达水平 (QPCR、WB 或流式), 传代培养检测目的基因的表达稳定性。

(5) 可选做:

单克隆鉴定, 分离单克隆细胞, 接种于 96 孔板中 (每个 96 孔板按 90-100 个细胞接种, 每孔平均 1 个细胞), 待细胞形成克隆, 消化, 裂解部分细胞进行基因型鉴定, 阳性克隆继续扩大培养, 获得单克隆细胞株。

注: 稳转细胞株如传代次数较多, 过表达效率变低, 可用适当浓度的嘌呤霉素再次筛选, 富集稳转细胞系。



GENECARER 官方微信, 创新基因递送, 精品服务科研

- Website www.genecarer.com
- Service hotline 029-84613682