

## Набор для трансфекции ДНК в адгезионные эукариотические клетки при помощи кальций-фосфатного метода

Кат. # **CPT-01** 70 трансфекций в 100-мм чашках

Кат. # **CPT-03** 140 трансфекций в 100-мм чашках

### Описание

Кальций-фосфатный метод трансфекции ДНК в клетки млекопитающих основывается на образовании временного преципитата фосфата кальция-ДНК и его последующим эндоцитозом клетками. Набор можно использовать для трансфекции ДНК в различные клеточные линии с получением как временных трансфектантов, так и стабильно экспрессирующих клеточных линий. Впервые метод был описан Graham and van der Ebb в 1973.

### Состав набора:

Набор рассчитан на проведение 70/140 трансфекций ДНК на 100-мм чашках (в зависимости от выбранного артикула). Все компоненты набора стерильны.

Состав набора CPT-01	Количество
Деионизованная вода для культур клеток	1 x 22 мл
2X HBS буфер	1 x 22 мл
2.5 М CaCl <sub>2</sub>	2 x 1.2 мл
Планировщик эксперимента	1
Инструкция	1

Состав набора CPT-03	Количество
Деионизованная вода для культур клеток	2 x 22 мл
2X HBS буфер	2 x 22 мл
2.5 М CaCl <sub>2</sub>	4 x 1.2 мл
Планировщик эксперимента	1
Инструкция	1

### Хранение

Набор хранить при +4°C – +8°C. Необходимо избегать заморозки компонентов набора, так как это может привести к снижению эффективности трансфекции. Допускается транспортирование набора при температуре от +1°C – +30°C не более 5 суток.

### Рекомендации для постановки кальций-фосфатной трансфекции

- Использовать 10-100 мкг плазмидной ДНК;
- Использовать плазмидную ДНК высокой степени очистки (с низким содержанием эндотоксинов);
- За день до трансфекции высевать на чашку такое количество клеток, чтобы в день трансфекции конфлюентность не превышала 50%.

## День 1. Подготовка клеток к трансфекции

Необходимо высеять клетки на чашки с необходимой плотностью (определяется индивидуально в зависимости от скорости деления клеток). Инкубировать при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 12-24 часов.

## День 2. Трансфекция

Перед началом работы необходимо, чтобы компоненты набора были комнатной температуры. Приготовить растворы А и Б согласно прописи в таблице.

60-мм чашка (5 мл среды)	100-мм чашка (10 мл среды)	150-мм чашка (20 мл среды)
Пробирка А: <ul style="list-style-type: none"><li>• 15 мкл 2.5 М CaCl<sub>2</sub></li><li>• 10 мкг ДНК</li><li>• Деионизованной воды до 150 мкл</li></ul>	Пробирка А: <ul style="list-style-type: none"><li>• 30 мкл 2.5 М CaCl<sub>2</sub></li><li>• 20 мкг ДНК</li><li>• Деионизованной воды до 300 мкл</li></ul>	Пробирка А: <ul style="list-style-type: none"><li>• 60 мкл 2.5 М CaCl<sub>2</sub></li><li>• 40 мкг ДНК</li><li>• Деионизованной воды до 600 мкл</li></ul>
Пробирка Б: <ul style="list-style-type: none"><li>• 150 мкл 2X HBS буфера</li></ul>	Пробирка Б: <ul style="list-style-type: none"><li>• 300 мкл 2X HBS буфера</li></ul>	Пробирка Б: <ul style="list-style-type: none"><li>• 600 мкл 2X HBS буфера</li></ul>

В наборе предусмотрен ламинированный планировщик эксперимента, на котором с помощью фломастеров на спиртовой основе можно делать записи для расчета необходимых объемов реакционной смеси.

С помощью автоматической пипетки (или Пастеровской пипеткой) перенести по каплям содержимое пробирки А в пробирку Б. При этом желательно обеспечивать перемешивание с помощью вортекса с регулируемой амплитудой вращения (например ELMi Vortex V3, 600-1000 об./мин) в течение 1-2 минут при комнатной температуре. Не рекомендуется чрезмерное перемешивание, а также длительное инкубирование (более 30 минут), так как это может способствовать образованию больших агрегатов и в конечном итоге снизить эффективность трансфекции.

\*Для обеспечения высокоэффективной трансфекции: для получения высокого титра вирусных частиц или препаративной наработки рекомбинантных белков, рекомендуется модифицировать протокол (см. таблицу ниже).

150-мм чашка(20 мл среды)
Пробирка А (15 мл): <ul style="list-style-type: none"><li>• 150 мкл 2.5 М CaCl<sub>2</sub></li><li>• 60-100 мкг ДНК</li><li>• Деионизованной воды до 1500 мкл</li></ul>
Пробирка Б (15 мл): <ul style="list-style-type: none"><li>• 1500 мкл 2X HBS буфера</li></ul>

После образования преципитата ДНК- $\text{Ca}^{2+}$  содержимое пробирки по каплям добавляют в культуральную среду в различные участки чашки. Закрывают чашку и перемешивают круговыми движениями для равномерного распределения преципитата. Чашку помещают в  $\text{CO}_2$ -инкубатор и инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в течение 12-24 часов.

### **День 3. Смена культуральной среды**

Провести смену культуральной среды и инкубировать чашки в 5%  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1-6 дней (в зависимости от схемы эксперимента). В случае возникновения токсического эффекта во время трансфекции рекомендуется проводить смену культуральной среды через 1-3 часа после трансфекции.