**珠海恺瑞HEK293细胞荧光质粒转染方案**

# 产品概述

建立瞬时或稳定表达细胞株是研究基因功能的重要手段。使用带GFP（绿色荧光蛋白）标记的质粒转染细胞后，可以直接使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察，也可以通过流式细胞仪检测，判断是否有效转染及转染效率的高低。本转染方法亦可用于珠海恺瑞HEK293瞬时转染4.0系统的验证。

**细胞培养基使用保存注意事项：**

1. **切勿紫外照射；**
2. **无需预热处理，可直接从冰箱取出使用；**
3. **储存细胞培养基时尽量使用医用冰箱，以确保恒温效果，切勿冷冻；**
4. **定期检查细胞培养基过期日期，并在过期前使用完或更换新的培养基，避免使用过期培养基导致细胞生长异常或失败。**

# 实验步骤

## 2.1转染前细胞培养

1. 将HEK293细胞置于5%的CO2恒温摇床中（使用其它浓度的CO2可能会严重影响细胞培养效果），37℃、120rpm恒温震荡培养（具体转速可根据用户培养箱摇床种类，摇瓶体积及实际培养情况自行调节，可参考下方**表Ⅰ**）。传代时，需先做细胞计数和观察细胞活率，尽量选择密度在3-6×106 cells/ml的高活率细胞进行传代培养。过高培养密度的细胞在传代培养后有可能会出现生长速度缓慢、培养密度降低等生长状态的变化，并直接影响重组蛋白表达等后续应用效果；
2. 传代培养时建议细胞接种密度为0.6×106 cells/ml，每隔3-4天传代1次。KOP293培养基可支撑的最高细胞密度约为1.2×107 cells/ml，细胞在达到此密度时存活率一般仍可保持在95%以上；
3. 若在培养过程中出现死细胞数过多的状况，应把细胞丢弃，使用新的细胞。

**表Ⅰ：摇床参数设定**

|  |  |
| --- | --- |
| 摇床振幅为**26mm** | 摇床振幅为**50mm** |
| **0.02-2L摇瓶** | **120rpm** | **0.02-2L摇瓶** | **85rpm** |
| **2-5L摇瓶** | **90rpm** | **2-5L摇瓶** | **65rpm** |

## 2.2转染细胞的准备

在细胞荧光转染前需确定其细胞密度及存活率。为确保转染效果，建议使用生长处于指数生长期（密度约为3-5×106 cells/ml）、存活率大于98% 的细胞转染。

2.2.1方案一：直接转染

1. **细胞无需离心**，若细胞密度为4.0×106 cells/ml时，则可直接转染，若细胞密度>4.0×106 cells/ml<7.0×106 cells/ml时，则需兑入新鲜的KOP293培养液，将细胞密度稀释成4.0×106 cells/ml后进行转染；

2.2.2方案二：细胞培养24小时后进行转染

1. **细胞无需离心**，若细胞密度为2.0×106 cells/ml时，则直接培养24小时后转染；若细胞密度>2.0×106 cells/ml时，则需兑入新鲜的KOP293培养液，将细胞稀释成2.0×106 cells/ml的密度培养24小时后转染。细胞培养条件：5%的CO2恒温摇床中，37℃、120rpm恒温震荡培养。

 转染完成后将摇瓶置于5%的CO2、37℃、120rpm恒温摇床中震荡培养表达。

（客户也可根据自身经验摸索合适的转染密度）

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. 请确保细胞处于对数生长期（2~7×106 cells/ml），当细胞密度>2×106 cells/ml 时，使用新鲜的培养液重悬，**若使用处于非对数生长期的293细胞做转染，转染效率及表达量会偏低**；
2. 使用非细胞计数仪的客户，若因细胞计数误差较大，应注意尽量控制细胞转染密度为3.5~4.0×106 cells/ml；
3. 请确保细胞存活率高于98%，使用状态不佳的细胞转染效率、表达量、表达天数会受影响；
4. 细胞稀释至2.0×106 cells/ml后，细胞悬液需置于摇床中培养24小时后再做转染。
5. 转染效率与质粒大小有关，质粒较大时，建议接种低细胞密度进行转染，客户可根据自身质粒大小摸索合适的细胞转染密度（≤4.0×106 cells/ml）。
 |

## 2.3细胞转染

测定细胞活率与密度并计数，获取长势较好且密度处于细胞对数生长期的HEK293细胞。按接种密度为**4.0×106 cells/ml**，接种体积根据实验需求进行选择，可参考下列表Ⅱ，细胞接种后置于CO2培养箱内的酶标板混匀器200rpm培养或CO2摇床120rpm培养（培养箱或摇床参数设置为：37℃、5%CO2）。

**表Ⅱ：不同培养体积相关参数参考**



## 2.3.1转染（24孔板）

**接种细胞1ml/孔，转染复合物的配置，以1孔为例**：

1. 离心管1中加入50 μl的KPM培养液、2 μgDNA（GFP荧光质粒）；
2. 离心管2中加入50 μl的KPM培养液、10 μl的TA-293（DNA:转染试剂=1:5 m/v）；
3. 将离心管2加入离心管1中，混匀，静置孵育10 min；
4. 将上述复合物加入6孔板中，置于37℃，5% CO2浓度的静置培养箱内的酶标板混匀器200 rpm培养。

**2.3.2转染（6孔板）**

**接种细胞2ml/孔，转染复合物的配置，以1孔为例**：

1. 离心管1中加入100 μl的KPM培养液、4 μgDNA（GFP荧光质粒）；
2. 离心管2中加入100 μl的KPM培养液、20 μl的TA-293（DNA:转染试剂=1:5 m/v）；
3. 将离心管2加入离心管1中，混匀，静置孵育10 min；
4. 将上述复合物加入6孔板中，置于37℃，5% CO2浓度的静置培养箱内的酶标板混匀器200 rpm培养。

## 2.3.3转染（100ml摇瓶）

**接种细胞20ml/瓶，转染复合物的配置，以1瓶为例**：

1. 离心管1中加入1ml的KPM培养液、40 μgDNA（GFP荧光质粒）；
2. 离心管2中加入1ml的KPM培养液、200 μl的TA-293（DNA:转染试剂=1:5 m/v）；
3. 将离心管2加入离心管1中，混匀，静置10 min；
4. 将上述复合物边晃动摇瓶边滴加入摇瓶中，置于120rpm、37℃，5% CO2 培养;

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. KPM的使用总量为细胞悬液的1/10；4.0系统质粒使用量为2μg/ml（DNA/细胞培养液体积）；
2. 质粒：转染试剂的质量比例可为1：3、1：4、1：5、1：6，多数质粒比例使用1：5效果最好，客户可根据自己的实际经验进行条件摸索，但不建议使用低于1：3或高于1：8的比例；
3. TA-293（浓度为1μg/μl）为白色悬浊液，使用前需摇匀或吹打均匀；
4. 质粒-转染试剂孵育时请勿摇晃，剧烈震荡可能会导致孵育失败；
5. 质粒-载体复合物制备好后再从摇床中取出细胞，边摇边滴加复合物，不要过早将细胞从摇床中取出。
 |

## 2.4转染结果检测

1. 转染24小时后可加入0.6%的（120 μl /20ml）293细胞蛋白表达增强剂（KE-293），以增加产物表达量；
2. 转染48小时后测定荧光转染率（以荧光显微镜为例）：将细胞摇匀后吸120 μl加入24孔板中，让细胞液铺满孔板底部，先用显微镜观察细胞密度是否过高，若密度过高需加入KOP293将细胞稀释2~3倍，保证40X物镜下的细胞没有重叠。将处理好的细胞在荧光显微镜下拍照，先用明场找到没有细胞结团和重叠的画面后，拍一张照片。然后保证画面没有运动的情况下，切换至荧光界面（若切换至荧光界面后没有荧光或荧光数特别少可以尝试调整荧光曝光率）后再拍一张照片，然后进行人工或软件计数。每个孔拍两张照片，取平均值。 转染率=（荧光细胞数/明场细胞数）╳100%

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. KE-293原液浓度为100%，工作浓度为0.6%，添加后细胞生长速度可能变缓，此为正常现象；
2. 荧光计数取样时，不能反复吹打，防止细胞裂解影响结果。
 |

# 常见问题及解决方法

## 3.1 转染效率低

经反复多次实验鉴定，对于生长状态正常的HEK293细胞，本转染系统转染荧光蛋白表达质粒，48h左右的转染效率一般稳定在45%~70%，当出现过低转染效率时其可能原因有如下几点：

1. 细胞存活率低于98%；
2. 细胞增长速度过慢；
3. 转染后孔板或者摇瓶静置培养，没有振动培养。细胞接种密度较高，静置培养转染效率略低于振动培养；
4. 细胞转染前结团（正常生长的细胞在KOP293培养液中一般不存在结团现象，结团可能是培养液中混入其它物质或由大量死亡细胞及细胞分泌物等造成）；
5. 使用的质粒DNA含有过多的蛋白质或其它物质，或含有过多的内毒素；
6. 质粒与转染试剂的比例不当。不同质粒可能需要使用不同比例的转染试剂，范围一般在1:3至1:7之间；
7. KPM体积使用不当。每100ml细胞悬液加入KPM的体积为10ml，即比例为10:1。

**附录**

表1：试剂清单

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **产品名称** | **内容** | **规格** | **储存条件** |
| **KOP293** | 293化学限定高密度无血清细胞培养液 | 1000ml | 2~8℃ |
| **KPM** | 无血清细胞转染缓冲溶液100ml | 100ml | 2~8℃ |
| **TA-293** | 293细胞悬浮化学转染试剂 | 6ml | -20℃ |
| **KE-293** | 293细胞蛋白表达增强剂 | 6ml | -20℃ |
| **KT-Feed\*** | 瞬时重组蛋白表达植物蛋白胨营养添加剂 | 100ml | 2~8℃ |

\*选择性试剂。非化学限定，不含血清及其它动物源成分

表2：试剂说明

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **说明** |
| **KOP293** | KOP293是由珠海恺瑞生物科技有限公司自主研发生产的化学限定高密度无血清培养液。该培养液适用于人胚肾上皮 ( human embryo kidney 293, HEK293)细胞的悬浮生长和重组蛋白质的表达。培养液使用时无需添加任何生长因子等添加物，悬浮培养可支撑的细胞密度约为10-12×106 cells/ml。 |
| **KPM** | KPM是一种转染缓冲溶液，为质粒-转染试剂复合物的形成提供稳定的环境，适用于CHO细胞和293细胞高密度转染和蛋白表达。产品转染时使用量为细胞悬液的1/10。 |
| **TA-293** | TA-293是293细胞转染试剂，为白色悬浊液，使用时需吹打均匀。可搭配KPM配制DNA质粒-转染试剂复合物，在大规模、高密度293细胞转染条件下表现出良好的转染效果。 |
| **KE-293** | KE-293是由珠海恺瑞生物自主研发的293细胞蛋白表达增强剂，与KOP293高密度无血清培养液配合使用可适当提高重组蛋白的表达量。 |
| **KT-Feed** | KT-Feed是富含蛋白胨的植物水解物，瞬时转染24小时后添加通常可提高蛋白表达，和KOP293培养液联合使用效果更佳。 |