

Trans Easy 电转试剂盒说明书

V1.1版本，更新日期：2018年5月7日

货号：CA3012040

规格：4 mL

储存条件：

基础液-20℃，添加剂-80 ~ -20℃，接种液-20℃；混匀后 2~8℃，1 个月内使用完毕。

产品简介：

质粒电转是利用瞬间高压造成细胞膜的不稳定，形成电穿孔，将核苷酸、DNA 与 RNA、蛋白、糖类、染料及病毒颗粒等导入原核和真核细胞内的实验技术，可以应用到转染、转化、电融合与插入等。

赛贝生物（Cellapy）通过实验探索，对比各种不同条件后开发并推出了一种稳定、高效的电转试剂：Trans Easy。该电转试剂可大幅提高电转效率和电转后细胞的存活率，是一种安全、快速、经济的选择。

本说明书将以体细胞质粒电转重编程为诱导多能干细胞实验和特定基因敲除细胞系构建实验为例介绍该产品的用法。

产品内容：

组份代码	名称	规格	数量
CA3012040-1	Trans Easy 电转试剂基础液	4 mL	1 瓶
CA3012040-2	Trans Easy 电转试剂添加剂	80 μL	1 支
CA3012040-3	Trans Easy 电转试剂细胞接种液	200 μL	1 支

试剂准备：

将基础液与添加剂在(2~8)℃完全溶解,把添加剂加入基础液中,并颠倒混匀,组成电转工作液。若短期内使用次数较少,可根据使用量将基础液与添加剂按50:1的比例混匀,剩余量分装后置于-80~-20℃保存。电转试剂细胞接种液在电转后使用,推荐用量为1:2000,所有试剂避免反复冻融。

所需材料:

Trans Easy 电转试剂盒 (Cellapy:Cat. CA3012040)
电转仪 (Lonza, 4D-Nucleofector, Amaxa, Nucleofector)
电转所需质粒
用于电转的细胞
其他常规培养液、培养板等

使用方式:

(一) 人多能干细胞特定基因敲除细胞系的构建:

1. 提前一天使用适量基质胶包被六孔板,37℃恒温二氧化碳细胞培养箱过夜备用;
2. 实验前吸弃基质胶,加入2 mL多能干细胞培养基(可用赛贝公司PSCeasy: Cat. CA1001500或PGM1:Cat. CA1007500)到六孔板中,按1:2000加入Trans Easy电转试剂细胞接种液1 μL,再放入37℃培养箱预平衡10 min;
3. 取100 μL电转工作液加入到无菌EP管,再加入电转所需质粒的量(推荐量为5 μg),质粒体积不超过10 μL,混匀后待用;
4. 培养人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞至汇合度达到90%,消化传代并计数,一次电转所需细胞数为 8×10^5 ;
5. 取足够电转的细胞悬液到15 mL离心管,800 rpm 离心3 min;

6. 以Lonza 4D-Nucleofector为例，打开仪器并设置适当程序待用；
7. 尽可能多地吸弃上清，用（3）中混匀的电转液100 μ L 重悬细胞沉淀，动作迅速且尽可能不产生气泡；
8. 迅速将上步中混合的细胞悬液转移到仪器配套的电转杯中，尽量不要产生气泡；
9. 迅速将电转杯放入电转仪并点击开始；
10. 电转完成后迅速取出电转杯，将细胞接种到步骤（2）中预先准备的培养板中；
11. 摇匀后37 $^{\circ}$ C培养，第二天换为常规培养基；
12. 后续包括药物筛选、挑克隆鉴定等。

（二）人皮肤成纤维细胞质粒重编程为人诱导多能干细胞：

1. 提前一天使用适量基质胶包被10 cm培养皿，37 $^{\circ}$ C恒温二氧化碳细胞培养箱过夜备用；
2. 实验前吸弃基质胶，加入10 mL皮肤成纤维培养基到10 cm培养皿中，按1:2000加入Trans Easy电转试剂细胞接种液5 μ L，再放入37 $^{\circ}$ C培养箱预平衡10 min；
3. 取100 μ L电转工作液加入到无菌EP管，再加入电转所需质粒的量（推荐量为5 μ g），质粒体积不超过10 μ L，混匀后待用；
4. 培养皮肤成纤维细胞至汇合度达到80%，消化传代并计数，一次电转所需细胞数为 1×10^5 ；
5. 取足够电转的细胞悬液到15 mL离心管，800 rpm离心3 min；
6. 以Lonza 4D-Nucleofector 为例，打开仪器并设置适当程序待用；
7. 尽可能多地吸弃上清，用（3）中混匀的电转液100 μ L重悬细胞沉淀，动作要快且尽可能不产生气泡；
8. 迅速将上步中混合的细胞悬液转移到仪器配套的电转杯中，尽量不要产生气泡；
9. 迅速将电转杯放入电转仪并点击开始；
10. 电转完成后迅速取出电转杯，将细胞接种到步骤（2）中预先准备的培养皿中；

11. 摇匀后37℃培养，第二天换为常规培养基；
12. 后续包括细胞形变、克隆形成、挑克隆等。

注意事项：

1. 将细胞悬液加入电转杯时尽量不能有气泡，气泡的存在会影响电转的成功率；
2. 所使用的质粒浓度不宜过低，不可使细胞沉淀+质粒体积+电转试剂的总体积高于电转杯的工作容量；
3. 电转试剂与细胞混合后，要迅速进入电转状态，且电转后的细胞要快速加入到提前准备好的培养皿中与培养基混合，减少细胞与电转试剂的接触时间。