

## NEPA21 电转染操作步骤（贴壁转染/原位转染用）

### 仪器和试剂

1. NEPA21 主机
2. 电极（CUY900-13-3-5，24 孔板贴壁转染用）
3. C115CB-2 适配线（连接主机和电极）
4. 通用型 24 孔细胞培养板
5. 质粒 DNA（pCMV-EGFP，储存浓度10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  每管，溶于TE 缓冲液中，由NEPA 公司提供）
6. EP buffer: Opti-MEM 培养基 (Invitrogen Sku# 31985-062, 31985-070 or 31985-088)



**注意事项：必须保证Opti-MEM 培养基无抗生素，无血清。**

### 实验步骤

#### 一、细胞的准备：

- 将细胞铺板于24 孔板中，以70%-80%的汇合度为宜（注：细胞以单层形式长满一孔，称为100%汇合度）
- 如进行神经细胞培养，推荐使用invitrogen公司的Neurobasal Medium 培养基。

#### 二、DNA 溶液的准备：

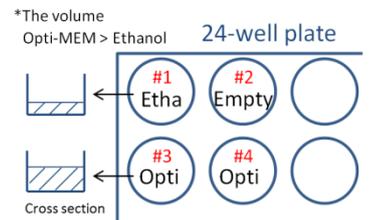
- 将质粒DNA 用EP buffer 稀释浓度至1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。即，取1 个无菌的1.5ml 离心管，加入50 $\mu\text{l}$  的质粒DNA 储备液+450 $\mu\text{l}$  的EP buffer，混匀得到终体积为500  $\mu\text{l}$  DNA 稀释液。（适用于难转染细胞）
- 将质粒DNA 用EP buffer 稀释浓度至0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。即，取1 个无菌的1.5ml 离心管，加入10 $\mu\text{l}$  的质粒DNA 储备液+490 $\mu\text{l}$  的EP buffer，混匀得到终体积为500  $\mu\text{l}$  DNA 稀释液。（适用于非难转染细胞）
- 每孔细胞使用300  $\mu\text{l}$ 体积的DNA 稀释液进行电转实验

**注意事项:**

- 1、如转染细胞为非难转染细胞，质粒 DNA 的最终建议使用浓度为  $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；转染细胞为难转染细胞，如原代神经细胞，质粒 DNA 的最终建议使用浓度为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。
- 2、溶液中的 DNA 是过量的，因此  $500\mu\text{l}$  的 DNA 稀释液可重复使用 12 次（转染 12 孔细胞），DNA 溶液体积减少时，可用 EP buffer 补充。
- 3、电转实验后，可用乙醇沉淀法回收质粒 DNA，重复利用。
- 4、为防止 TE 缓冲液对转染效率的影响，质粒 DNA 储备液的浓度需为 10 或  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

**三、电极的准备与消毒:**

1. 取一个干净的 24 孔板，准备1 孔70 %乙醇消毒液，1孔无液体，2 孔 EP buffer，如右图所示；
2. 将电极预先放入工作台中，紫外照射5-10min；
3. 将电极浸泡于 70 %乙醇消毒液中，进行消毒除菌；



**注意事项: 建议电极浸泡乙醇消毒液的时间少于 5s, 否则会损伤电极。**

4. 将电极移入空孔中（如右图中#2），晾干电极；
5. 将电极移入到 EP buffer 中，稍稍晃动电极，将乙醇清洗干净；
6. 将电极转移到另一孔 EP buffer 中，重复步骤5，将残留的乙醇清洗干净，将电极静置与该孔中，备用。

**注意事项: 需准备比乙醇消毒液多些的EP buffer，以便将电极清洗干净。**

**四、培养基的预处理**

- 实验前，将EP buffer及培养细胞用培养基置于37℃预热。

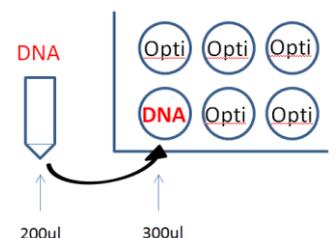
**五、电转实验**

1. 如细胞培养基中含有血清，加入EP buffer 清洗细胞1-2 次；如细胞培养基中不含血清（如 Neurobasal Medium），此步骤可以省略。

**注意事项: 必须保证待转染细胞孔中无血清残留，否则会大大降低细胞的存活率及转染效率。**

2. 吸出目标孔中的EP buffer(或Neurobasal Medium)，加入300  $\mu\text{l}$  DNA 稀释液，如右图所示。

**注意事项: 必须准确加入300 $\mu\text{l}$  DNA稀释液以保证获得相似的电阻值，可提高实验的重复性。**



3. 将电极置于目标板孔底部，用手指扶稳电极。
4. 设置电转染参数，测量、记录电阻，并执行电转程序。

**注意事项：测量到得电阻值应处于170-300  $\Omega$ 之间。**

5. 将电极抬高至与孔内细胞分离，旋转**90°**后放回孔中（该步骤是为了增大转染面积）。
6. 再次测量、记录电阻，并执行电转程序。记录第2次执行电转程序后，仪器显示的电流、能量等参数，这些数据可用于trouble shooting。
7. 将DNA 稀释液回收至原1.5ml 离心管中待用。

**注意事项：溶液中的DNA 是过量的，因此1.5ml 管中的DNA 稀释液可重复使用12次（转染12孔细胞），DNA 溶液体积减少时，可用EP buffer 补充。**

8. 进行下一目标孔的电转染，重复步骤1-7。

**注意事项：**

- 1、 必须将第1孔设置为空白对照。即，加入300 $\mu$  l DNA 稀释液后，只放入电极但不执行电转染程序；这是为了观察细胞状态，以便确认是否由于电击原因导致细胞死亡。
- 2、 执行一系列目标孔的电转程序时，电压应逐步递增；即第2孔的程序电压是最低的，第3孔、第4孔依次递增，这样可最大限度的减少DNA 稀释液的损耗。

## 六、电转后观察

电转后6小时开始有荧光表达，但由于细胞群体的异质性，有些细胞基因表达速度较慢，总体来说，电转后24hr 达到转染高峰；**若要拍照，以转染后48hr 为宜。**

## 电极的维护

在电转过程中，电极的不锈钢表面很容易被细胞或蛋白质弄脏。每次进行12孔电转染后，电极表面需用牙刷蘸水清理干净，并用砂纸擦亮（建议选择筛目数为1000 的砂纸），否则会影响电极的导电性，降低细胞的转染效率。

