

Polyethylenimine Linear (PEI) MW40000

线性 PEI 转染试剂

产品描述

线性 PEI 转染试剂 PEI 40000 (Polyethylenimine Linear, MW40000 ; PEI 40K) 是一款优秀和低成本的高瞬时性转染试剂。在 HEK293 和 CHO 表达系统中, PEI 在宽广的生产规模内 (从 96 孔板到 100L 生物反应器) 能提供连续性的高基因表达。

作为线性化聚乙烯亚胺 PEI25000 (PEI 25K) 的升级产品, 操作更简单, 且具有连续性的更高表达滴度, 优势在于: 1) PEI 25K 转染溶液通常需几个小时来配置, 然而, PEI 40K 在 2 个小时内即可转化为即用型的溶液; 2) PEI 25K 含 4-11% 残留的丙酰基基团, 该基团阻止聚合物骨架紧密结合到 DNA。然而, PEI 40K 完全去丙酰化结构, 意味着每个批次保持连续性更高转化效率。

本品是 PEI 40K 的无菌溶液, 浓度为 1mg/ml, 直接使用即可。1ml 本品足以用来转染 250 μ g DNA, 或者, 6 孔板内约做 60-120 次转染。

保存与运输方法

保存: +4 $^{\circ}$ C 保存, 1 年有效。

运输: 室温运输。

注意事项

- 1) 请务必使用高质量的无内毒素质粒。通过 260 nm 光吸收测定 DNA 浓度, 260nm/280nm 比值确定 DNA 纯度 (比值应该在 1.8~2.0 的范围之内)。如有可能, 请通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。
- 2) 使用适当保存和经常传代的健康细胞。确保培养基没有被细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞, 请在转染前至少传代两次。
- 3) 对于某些类型的细胞如 HEK-293、HEK293T、NIH/3T3 和 COS 细胞, 在转染前两天铺板可显著提高重组蛋白的表达水平。如果选择转染前两天铺板, 可适当降低铺板密度, 以确保转染时细胞的汇合度仍为 60-80%。
- 4) 对于接触抑制敏感的细胞, 可适当降低铺板密度。
- 5) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

试剂准备

稀释液准备: 用细胞培养级水来制备 150mM NaCl (比如: 称取 876.6mg 高纯 NaCl 加入 80ml 细胞培养级水, 充分溶解后, 定容到 100ml, 经 0.1 或 0.2 μ m 滤膜过滤除菌。)

【注意】: 也可使用商业化的无血清培养基 (比如 Opti-MEM I) 来制备转染复合物。

一、操作方法 (贴壁细胞)

1.1 铺板

a) 转染前 18-24h 进行铺板, 调整合适的细胞密度 (参考表 1), 使其在转染时细胞密度达 60-80%。

【注意】: 高血清水平会抑制转染效率, 大多数情况, 低血清水平 ($\leq 5\%$) 能产生最高的转染效率。

培养器皿	培养表面积 (cm ²)	接种细胞数	培养器皿	培养表面积 (cm ²)	接种细胞数
96 孔板	0.3	(1.2-2.4) $\times 10^4$	35mm 培养皿	9.6	(3.5-7.0) $\times 10^5$
48 孔板	1.0	(4.0-8.0) $\times 10^4$	60mm 培养皿	21	(0.9-1.8) $\times 10^6$
24 孔板	1.9	(0.8-1.6) $\times 10^5$	100mm 培养皿	58	(2.2-4.4) $\times 10^6$
12 孔板	3.5	(1.5-3.0) $\times 10^5$	T75 培养瓶	75	(3.0-6.0) $\times 10^6$
6 孔板	9.6	(4.0-8.0) $\times 10^5$	T175 培养瓶	175	(0.7-1.4) $\times 10^7$

1.2 转染步骤（以 6 孔板的单孔为例）

- a) 转染前 1-2h, 每孔替换为 3ml 含 2%血清的新鲜生长培养基。
- b) 制备 PEI 40K-DNA 转染复合物（严格按照顺序进行）：①往 300 μ l 稀释液内加入 2 μ g 质粒 DNA, 低速混合/涡旋均匀；②往混合物内加入 8 μ l PEI 40K (1mg/ml) (DNA/PEI 40K=1: 4), 低速涡旋 5s；③无菌环境, 室温静置 20min 以形成 PEI 40K-DNA 转染复合物。④用移液枪上下吹打 3 次, 轻轻混匀。
- c) 将 PEI 40K-DNA 转染复合物转到孔内。轻轻晃动培养皿或轻微涡旋, 使得复合物分散均匀。

【注意】: 以上步骤可通过调整 PEI 40K-DNA 复合物在稀释液内的体积（稀释液为培养总体积的 10%）来进行放大或缩小（可参考表 2）。确保 DNA/PEI 40K=1: 4!

培养器皿	培养体积 (ml)	质粒 DNA (μ g)	稀释液 (ml)	PEI 40K (μ l)
6 孔板, 单孔	3	2-4	0.3	8-16
35mm 培养皿	3	2-4	0.3	8-16
60mm 培养皿	5	6-12	0.5	24-48
100mm 培养皿	10	12-24	1.0	48-96
T75 培养瓶	15	18-36	1.5	72-144
250ml 摇瓶	50	50-100	2.5	200-400

1.3 孵育

- a) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养细胞, 转染后 12-18h, 去除含 PEI 40K-DNA 复合物的培养液, 更换新鲜的生长培养基。
- b) 通常, 转染后 36-48h 能检测到重组蛋白表达。一般在转染后 72-96h 能观察到最大水平的表达。

二、操作方法（悬浮细胞）

2.1 接种准备

于转染前 2-3h, 按照 1.0×10^6 /ml 培养接种细胞。

2.2 转染步骤（以：50ml 培养物/250ml 摇瓶为例）

- a) 制备 PEI 40K-DNA 转染复合物（严格按照顺序进行）：
 - ①往 2.5ml 稀释液内加入 50 μ g 质粒 DNA, 低速混合/涡旋均匀；
 - ②往混合物内加入 200 μ l PEI 40K (1mg/ml) (DNA/PEI 40K=1: 4), 低速涡旋 5s；
 - ③无菌环境, 室温静置 20min 以形成 PEI 40K-DNA 转染复合物。
 - ④用移液枪上下吹打 3 次, 轻轻混匀。
- b) 将全部转染溶液加入 25ml 悬浮细胞内。
- c) 将悬浮细胞放回培养箱内。

2.3 孵育

- a) 在培养箱内摇动培养 2-3h, 之后加入 25ml 新鲜生长培养基。重新放回培养箱。
- b) 通常, 转染后 36-48h 能检测到重组蛋白表达。一般在转染后 72-96h 能观察到最大水平的表达。

订购信息

产品名称	产品编号	规格
Polyethylenimine	NBS4000-1ml	1ml
Linear (PEI) MW40000	NBS4000-10ml	10ml
线性 PEI 转染试剂	NBS4000-50ml	50ml