

Polyethylenimine Linear, MW 40000 线性化聚乙烯亚胺 PEI 40000

产品信息:

产品名称: Polyethylenimine Linear, MW 40000 线性化聚乙烯亚胺 PEI 40000

规格:

目录号	产品名称	规格
X13134	PEI 40K Transfection Reagent 线性化聚乙烯亚胺转染试剂	1ml
X13135	PEI 40K Transfection Reagent 线性化聚乙烯亚胺转染试剂	10ml
X13136	PEI 40K Transfection Reagent 线性化聚乙烯亚胺转染试剂	50ml

特性说明:

浓度	1mg/ml
运输条件	室温运输
储存条件	常温保存, 4°C可延长保存, 有效期 1 年

产品描述:

线性化聚乙烯亚胺 PEI 40000 (Polyethylenimine Linear, MW 40000; PEI 40K)是一款优秀和低成本瞬时性转染试剂。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。

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)来制备转染复合物。

一、贴壁细胞操作方法

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。

表 1.不同培养皿的建议接种密度

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

表 2.不同培养体系内转染用各组分建议用量

培养器皿	培养体积(ml)	质粒 DNA (ug)	稀释液	PEI 40K (ul)
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°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、悬浮细胞操作方法

2.1 接种准备

于转染前 2-3h, 按照 1.0x 10⁶/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。

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。

本产品仅供科研使用, 不可用于临床诊断应用或其他用途。