**PEI 转染法**

材料：

质粒DNA

指数生长的真核细胞

PEI（聚乙烯亚胺）

1×HBS（pH7.4）

配方：

PEI储存液（100μM）：称取125mg PEI粉末溶解于50ml 1×HBS（pH7.4）中，0.2μm滤膜过滤，储存于4℃备用。

100mg/40ml: 2.5mg/ml

1×HBS（pH7.4）：将8.76g NaCl溶解于900ml超纯水，加入20ml 1M的HEPES，调pH值到7.4，定容至1L，过滤（0.2μm滤膜）后储存于4℃备用。

方法：

1．细胞分盘：通过胰酶消化收集细胞，用适当的完全培养基以4×105至8×105细胞/cm2的密度平铺细胞于60mm组织培养皿上（根据实验需要选择培养皿，使细胞贴壁后所占总面积达到培养皿面积的70-90％）。根据细胞贴壁情况于含5％CO2的37℃温箱中孵育8-24h，当细胞贴壁完全后即可开始转染。转染前换入2mL预热的无血清培养基。

2.制备PEI-DNA混合物：以60mm组织培养皿用420μL反应总体积为例。准备两支1.5 mL离心管，一管将质粒DNA（总量2-8μg为佳）加入240μL HBS中，混匀。另一管中则用HBS将100μM的PEI储存液稀释成10μM，充分混合。然后取180μL 10μM PEI溶液加入含有DNA的HBS中，充分混匀后室温静置20-30min。最后将这420μL的PEI-DNA混合液逐滴加入上述单层细胞的细胞培养基中，轻轻摇动平皿混匀，置于含5％～7％CO2的37℃温箱孵育。

注：每次用100μM的PEI储存液前都需要先将其充分混匀，保证所取的浓度一致。

3.培养6-10h后更换为37℃预热的含有血清的培养基，继续培养，16h左右可以观测到报告基因的表达。

6ug DNA

18ul\*2.5mg/ml = 25 ug

～1:4 DNA : PEI

**使用说明**

1.储存液配置

1）材料

PEI 40000、Milli-Q®水/注射用水（WFI）或类似的生物级水、1 mol/L氢氧化钠（NaOH）、一次性0.1~0.2μm PES真空无菌过滤器、无菌HDPE或聚丙烯储存瓶。

2）配置储存液（1mg/mL）

a. 于1L玻璃烧杯，将1g PEI 40000粉末加入900mL Milli-Q®超纯水或其他相当级别的生物用水中，在磁子搅拌器上搅拌均匀。

b. 待PEI 40000完全溶解（通常不到5 min）。

c. 用1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为6.80-6.90。

d. 将溶液转入量筒内，并加水定容到1L。

e. 用一次性0.1~0.2µm PES真空过滤器过滤除菌，即得到**1mg/mL的储存液**。

f. 根据需要分装并储存在4°C，3个月稳定。

2. 转染操作流程（以6孔板为例）

1）接种细胞

为了提高转染效率，建议在转染前一天接种细胞，以转染时细胞密度在70%~80%为宜。

2）配制DNA-PEI核酸-转染试剂复合物

a. 对于每孔细胞，使用100 μL无血清培养基稀释2 μg目的DNA，充分混匀成DNA稀释液。

\*无血清稀释液建议采用Opti-MEM或ddH2O

b. 立刻向100 μL的DNA稀释液中加入4μL的PEI 40000转染试剂，轻轻混匀。

c. 在室温下孵育10~15min，使得形成DNA-PEI阳离子核酸转染试剂复合物。

3）转染细胞

a. 在形成复合物过程中，移除细胞生长培养基，每孔中加入2mL新鲜预热的完全培养基。

b. 直接将100μL DNA-PEI复合物加入细胞中，摇动培养板，轻轻混匀。

c. 37 ℃，5% CO2培养箱培养，转染后最快5 h即可检测到转入基因的表达。请自行确定适合检测时间。

4）稳转筛选（可选）

转染24h后，将细胞传代至新鲜的生长培养基中（将细胞稀释10倍以上），37℃，5% CO2培养箱孵育过夜。第二天加入与转染抗性基因相匹配的筛选药物。约1~2周可筛选到耐药性克隆，在这期间需经常更换含筛选药物的生长培养基。

不同细胞培养容器转染用量（仅供参考）：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 培养皿 | 表面积（cm2） | DNA的量（μg） | 转染试剂的量（μL） | 稀释液体积（μL） | 培养基总量 |
| 96孔板 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 10 | 100 μL |
| 48孔板 | 0.7 | 0.2 | 0.3 | 20 | 200 μL |
| 24孔板 | 1.9 | 0.5 | 1 | 50 | 500 μL |
| 12孔板 | 3.8 | 1 | 2 | 50 | 1mL |
| 6孔板 | 10 | 2 | 4 | 100 | 2 mL |
| 25cm2培养瓶 | 21 | 4 | 8 | 200 | 4 mL |
| 75cm2培养瓶 | 58 | 10 | 20 | 500 | 10 mL |

**注意事项**

1.本品为盐酸盐形式的聚乙烯亚胺，具有易结块倾向。

2.对大多数细胞来而言，每1μg DNA使用3.0μL PEI40000转染试剂都能获得较高转染效率。也可尝试每1μg DNA使用1.5~4μL体积线性PEI40000转染试剂进行优化。

3.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套及通风橱操作。

4.本产品仅用于科研用途，不可用于人体。

**程序 Zhangfeng**

1. 制备聚乙烯亚胺（PEI）转染试剂。将50 mg PEI Max溶解于45 ml的Ultra Pure水中。通过逐滴添加10M NaOH直至pH接近6，然后逐滴添加1M NaOH直至pH达到7.1，将pH调节至7.1。用Ultra Pure水将最终体积调节至50ml。使用Millipore的0.45-μm Steri-flip过滤器进行灭菌。制备50×1ml等分试样并将其储存在−20°C下直至使用。PEI可稳定保存长达1年，并且可以经历5次冻融循环而不会降低转染效率。

2. 慢病毒质粒转染。按照步骤42-44中的说明制备用于慢病毒转染的HEK293FT细胞。

3. 对于每个慢病毒靶标，将以下慢病毒靶标混合物混合在50毫升Falcon管中，并相应放大：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Component | Amount per T225 flask | Final Concentration |
| DMEM (serum free) | 651μl |  |
| pMD2.G(lentiviral helper plasmid) | 3.4μg | 5.2μg/ml |
| psPAX2 (lentiviral helper plasmid) | 6.8μg | 10.4μg/ml |
| Lentiviral target plasmid | 13.6μg | 20.9μg/ml |

**Ratio: 1:2:4**

4. 加入195μl PEI转染试剂，涡旋，室温孵育混合物10分钟。

5. 将25ml **D10培养基**加入转染试剂混合物中。

6. 从细胞中吸出旧培养基，轻轻加入含有转染试剂混合物的新培养基，轻轻摇晃混匀。将T225烧瓶放回培养箱。

7. 转染2天后，按照步骤52所述收获并储存慢病毒。

D10培养基

用于培养HEK 293FT细胞，通过在DMEM中添加GlutaMAX和10%(vol/vol)FBS来制备D10培养基。对于常规细胞系培养和维护，D10可以进一步添加1×青霉素-链霉素。将培养基在4°C下保存长达1个月。