

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 (100 μ M): 称取 125 mg PEI 粉末溶解于 50 ml 1×HBS (pH7.4) 中, 0.2 μ m 滤膜过滤, 储存于 4°C 备用。

1×HBS (pH7.4): 将 8.76 g NaCl 溶解于 900 ml 超纯水, 加入 20 ml 1 M 的 HEPES, 调 pH 值到 7.4, 定容至 1 L, 过滤 (0.2 μ m 滤膜) 后储存于 4°C 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 4×10^5 至 8×10^5 细胞/ cm^2 的密度平铺细胞于 60 mm 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% CO_2 的 37°C 温箱中孵育 8–24 h, 当细胞贴壁完全后即可开始转染。转染前换入 2 mL 预热的无血清培养基。
2. 制备 PEI-DNA 混合物: 以 60 mm 组织培养皿用 420 μ L 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 2–8 μ g 为佳) 加入 240 μ L HBS 中, 混匀。另一管中则用 HBS 将 100 μ M 的 PEI 储存液稀释成 10 μ M, 充分混合。然后取 180 μ L 10 μ M PEI 溶液加入含有 DNA 的 HBS 中, 充分混匀后室温静置 20–30 min。最后将这 420 μ L 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% CO_2 的 37°C 温箱孵育。

注: 每次用 100 μ M 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 6–10 h 后更换为 37°C 预热的含有血清的培养基, 继续培养, 16 h 左右

可以观测到报告基因的表达。