

**Protocole de transfection rapide avec le jetPEI™
(Polyplus-transfection)
en Corning® HYPERFlask® Cell Culture Vessel**

CORNING

Ceci est une version optimisée plus rapide du protocole standard de transfection avec le jetPEI™ de (Polyplus-transfection) en HYPERFlask® Corning® (voir CLS-AN-111). Ce nouveau protocole en une étape a été développé pour gagner du temps et diminuer le coûts de la transfection.

Introduction

Un des outils les plus utiles dans la recherche en biologie cellulaire est la transfection, l'introduction d'ADN étranger dans une cellule eucaryote. Dans de nombreux travaux de recherche aujourd'hui, la transfection de grandes quantités de cellules est de plus en plus fréquente. Le jetPEI™ de Polyplus-Transfection, est un réactif de transfection de haute efficacité, faible toxicité ; polymère soluble dans l'eau il peut être utilisé en présence de sérum dans le milieu de culture. Ceci élimine les étapes de remplacement du milieu avant et après la transfection: cette caractéristique en fait la méthode idéale pour les transfusions à grande échelle en HYPERFlask Corning. Le protocole a été optimisé sur des cellules HeLa mais a été appliqué avec succès à d'autres types cellulaires, notamment les cellules CHO (Chinese hamster ovary). Le protocole est conçu comme un point de départ et peut être optimisé avec vos propres lignées cellulaires.



Réalisation de la culture cellulaire en suspension

La procédure ci-dessous est adaptée à l'utilisation de flacons HYPERFlask (Cat. n ° 10010 ou 10024) et les plaques 24 puits (Cat. n ° 3524),. La plaque 24 puits sert de contrôle pour suivre l'efficacité de transfection standard et dans les conditions à grande échelle. Si vous choisissez d'utiliser un format de plaque différent pour les contrôles, veuillez modifier les volumes de réactifs en équivalence ml/cm² (Tableau 1)

REMARQUE: Utilisez des cultures fraîches (5 à 20 passages) avec 80 à 90% de confluence.

1. Récolter les cellules en utilisant les techniques de récolte standard, centrifuger pendant 10 min à 1000 tr/min et remettre en suspension les cellules dans 50 ml de milieu de croissance frais.

CONSEIL : Si nécessaire, homogénéiser les cellules en cell stainer

2. Préparer une suspension cellulaire à $1,82 \times 10^5$ cellules/ml dans un volume final de 424 ml de milieu frais pour chaque HYPERFlask.

3. Préparer une suspension cellulaire à $1,82 \times 10^5$ cellules/ml dans un volume final de 550 µl pour chaque puits témoin

Note : Tous les replicats de contrôle positif et négatif, peuvent être préparé comme une solution unique, puis être répartis dans chaque puits.

Préparation du complexe JetPEI/DNA

Les étapes ont été modifiées par rapport au protocole standard de transfection jetPEI Polyplus' (kit n° 101-40N) optimisé pour 1 µg d'ADN et avec un ratio jetPEI/ADN de 5..

1. Solution A d'ADN . Préparer la solution dans un tube pouvant contenir 2x le volume final.

Solution A	Témoin négatif par puits (plaque 24 puits (0,650 ml/puits)	Témoin positif par puits (plaque 24 puits (0,650 ml/puits)	Par HYPERFlask (560 ml/flacon)
ADN	-	0,5 µg / cm ² (1µg)	0,5 µg / cm ² (860 µg)
150 mM NaCl	50 µl	qsp 50 µl	qsp 43.1 ml
Volume final	50 µl	50 µl	43.1 ml

2. Solution B** JetPEI™

Solution B	Témoin négatif par puits (plaque 24 puits (0,650 ml/puits)	Témoin positif par puits (plaque 24 puits (0,650 ml/puits)	Par HYPERFlask (560 ml/flacon)
Réactif JetPEI	2 µl	2 µl	1.72 ml
150 mM NaCl	48 µl	48 µl	41.4 ml
Volume final	50 µl	50 µl	43.1 ml

** Optimisée pour un ratio N:P de 5

3. Rapidement, tout en mélangeant délicatement, ajouter la solution jetPEI B à la solution A d'ADN; bien mélanger par vortex.

Note importante: Ne pas ajouter dans l'ordre inverse.

Volume final	par puits (plaque 24 puits)	Par HYPERFlask
Complexe JetPEI/DNA	100 µl	86.2 ml

4. Incuber à température ambiante pendant 15 min. La solution peut apparaître turbide.

Transfection

Pour la manipulation de l'HYPERFlask se référer aux Instructions d'utilisation correspondantes ou visualiser la présentation vidéo sur le site Corning Life Sciences.

En HYPERFlask Cell Culture Vessel

1. Lentement, tout en mélangeant, ajouter 86,2 ml du complexe jetPEI™/ADN à la suspension cellulaire.

Note: Réduire au minimum la formation de mousse lors du mélange de milieu.

2.ensemencer 650 µL/puits du mélange cellules/ complexe d'ADN dans une plaque 24 puits pour servir de contrôle pour le précipité en large volume.

Note: Jusqu'à 3 puits témoins peuvent être réalisés sans interférer avec l'efficacité de la transfection en HYPERFlask

3. Verser délicatement le reste de la solution dans l'HYPERFlask, enlever tout l'air piégé et reboucher le flacon

Conseil utile: Si nécessaire, utilisez du milieu de croissance frais pour ajuster le volume de liquide dans l' *HYPERFlask* au niveau approprié.

Puits de contrôle

4. Lentement, tout en mélangeant délicatement ajouter le complexe jetPEI™/ADN à la suspension cellulaire
- 5.ensemencer 650 µL/puits de la solution correspondante dans les puits de contrôle.
6. Incuber toutes les cultures à 5% de CO₂, 37 ° C pendant 48 heures.
7. Utiliser les cellules transfectées selon les besoins.