

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



**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 appliquée 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.



**Jour 1**

La procédure ci-dessous est adaptée à l'utilisation des HYPERFlask ainsi qu'à des plaques de culture 24 puits. La plaque 24 puits sert de contrôle pour suivre l'efficacité de transfection standard et dans les conditions à grande échelle. Une fois le protocole optimisé, la multiplication des contrôles n'est plus nécessaire. Si vous choisissez d'utiliser un format de plaque différent pour les contrôles, veuillez modifier les volumes de réactifs en équivalence ml/cm<sup>2</sup>.

**Lire entièrement le protocole avant de commencer la manipulation.**

**Dépôt des cellules**

**CONSEIL:** Pour la manipulation des HYPERFlask, se référer au mode d'emploi correspondant.

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

1. Ensemencer à 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans 0,326 ml/cm<sup>2</sup> de milieu de croissance (6,13x10<sup>4</sup> cellules/ml) dans les flacons HYPERFlask (Cat. n ° 10010) et les plaques 24 puits (Cat. n ° 3524), voir le Tableau 1. Ces concentrations cellulaires doivent être optimisées pour votre lignée. Les cultures doivent être à 80% de confluence 24 heures après l'ensemencement.

**Tableau 1**

	Surface de croissance (cm <sup>2</sup> )	Volume de milieu (ml)	Concentration cellulaire
HYPERFlask	1720/flacon	560 ml/flacon	34.4x10 <sup>6</sup> /flacon
Plaque 24 puits	2/puits	0.650 ml/puits	4.0x10 <sup>4</sup> /puits

**Conseil utile:** Nous recommandons la mise en place de contrôle en plaque de culture de 24 puits ou similaires pour suivre l'efficacité de transfection. Les contrôles doivent intégrer des témoins négatifs et positifs de transfection ainsi que des contrôles sur la grande quantité de précipité préparée

pour la transfection en *HYPERFlask*

2. Incuber une nuit à 37°C, incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub>

## Jour 2

### Préparation du complexe jetPEI™/ADN

**REMARQUE:** Cette partie du protocole doit être réalisée sous hotte en conditions stériles.

**REMARQUE:** Ces étapes ont été modifiées par rapport au protocole standard du kit de transfection jetPEI Polyplus (Part. n ° 101-40N) optimisé pour 1 µg d'ADN avec un ratio jetPEI N:P de 5.

1. Solution d'ADN - Solution A

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

\* à préparer dans un tube pouvant contenir 2 fois le volume final

2. Solution B\*\* JetPEI™

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

\*\* Optimisé 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.**

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

4. Incuber à température ambiante pendant 30 min. La solution peut apparaître turbide.

## Transfection

1. *HYPERFlask* Cell Culture Vessel

1.1 Vider l'*HYPERFlask* en versant délicatement tout le milieu dans une bouteille de stockage stérile ou une fiole Erlenmeyer stérile de 500ml. Aspirer le milieu contenu dans les puits de la plaque de contrôle.

1.2 Retirer 86.2 ml du milieu conservé dans le flacon de stockage et en conserver 40ml dans un tube stérile de 50 ml.

1.3 Lentement, tout en mélangeant, ajouter 86.2 ml du complexe jetPEI/ADN dans le flacon de 500 ml contenant le milieu retiré de l'HYPERFlask.

1.4 Verser délicatement le mélange de transfection dans l'HYPERFlask.

**CONSEIL PRATIQUE:** Si nécessaire, utilisez le milieu conservé dans le tube de 50 ml pour compléter le volume de milieu dans l'HYPERFlask jusqu'au niveau adéquat (premier cran du pas de vis).

1.5 Reboucher le flacon et tapotez doucement pour recueillir toutes les bulles d'air dans le piège à air.

1.6. Retirer 0.650ml/puit de milieu de l'HYPERFlask et ajouter les dans trois puits de contrôle de la plaque 24 puits.

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

## 2. Plaque 24 puits de contrôle positif et négatif

2.1. Prélever 100  $\mu$ L de milieu de tous les puits de contrôle positif et négatif

2.2 Lentement, goutte à goutte ajouter 100  $\mu$ L du complexe jetPEI/ADN dans les puits de contrôle positif et du milieu seul (« mock solution ») dans les puits de contrôle négatifs. Agiter la plaque par rotation pour bien mélanger.

Volume final	par puits (plaque 24 puits)	Par HYPERFlask
ml	0.650	560
ml/cm <sup>2</sup>	0.326	0.326

3. Incuber l'HYPERFlask et la plaque 24 puits 2 à 37°C, incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures.

4. Utiliser les cellules transfectées selon les besoins.