

## Transzfekció PEI

Ez a protokoll kifejezetten HEK293 vagy 293T sejtek transzfekciójára ajánlott, plazmid bevitelére.

Szükséges oldatok:

**150 mM NaCl** (sterilre szűrt, 0,22 µm PVDF)

**PEI (25 kDa):**

- 4,5 mg PEI /10 ml deszt. vízben oldani
- pH: 6,5-7,5
- sterilre szűrni ((sterilre szűrt, 0,22 µm PVDF)
- 4°C-on tárolható
  
- 24 well plate O/N 293T
- mediumcsere: DMEM (4,5 g/L glukóz **w/o FCS**)
- eppendorf csöbe mérjük ... µl NaCl (150 mM, sterilre szűrt) és 1 µg plazmid DNS-t. a végtérfogat 150 ml legyen.
- egy másik csöbe tegyük 48 µl NaCl-t és 2 µl PEI oldatot
- majd az **50 µl PEI/NaCl oldatot cseppenként adjuk hozzá a DNS/NaCl oldathoz**
- állni hagyjuk 15-30' RT
- majd mérjük hozzá a sejtekhez
- a transzfekció 5-6 óra alatt lezajlódik, ezután pótoljuk ki a sejtek médiumát 20% os FCS-DMEM-el, hogy a végkoncentráció 10% FCS legyen
  
- a GFP 22-24 óra múlva már jól látszik
- médium eltávolítása
- mosás 2x PBS-el
- fixálás: 96% etOH 20' -20°C
- alkohol eltávolítása, és pár percig hagyjuk megszáradni a platet
- rehidráció: PBS-el, majd lehet nézni

well format	DNA ug	NaCl to ul	PEI ul	NaCl to ul	TOTAL VOLUME
96	0,25	10	0,5	10	20
48	0,5	25	1	25	50
24	1	50	2	50	100
12	2	50	4	50	100
<b>6</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>200</b>
60mm dish	5	250	10	250	500

Protocoll

1. Dilute 1 ug DNA in 50 ul NaCl
2. Vortex briefly and spin
3. Dilute 2ul Pei in 50 ul NaCl
4. Vortex briefly and spin
- 5. Add the PEI to the DNA (NOT VICEVERSA!)**
6. Vortex and spin briefly
7. Incubate 15-30 minutes at room temperature
8. Add the 100ul mixture to the cells and mix by swirling the plate

## **PEI TRANSFECTION PROTOCOL**

PEI, ALDRICH 408727

15cm Petri=147.8cm<sup>2</sup> and 25ml DMEM

10cm Petri=60cm<sup>2</sup> and 10ml DMEM

6 wellplate/well =9.4cm<sup>2</sup>=15cm Petri/16

293 cells 3\*10<sup>7</sup> /15ml, DMEM(4.5g/l glucose, 10%FBS) 24 hours.

Total 1.5\*10<sup>8</sup>/12petri (10cm)

Before transfection 70%confluence.

Optional: change media 1h before transfection.

All calculations are for five plates of 15cm or 12-13 plates of 10cm.

Total DNA/15cm plate=50ug

For 5 dishes use 250 ug DNA in 5ml 150mM NaCl

1ugDNA for 20-50 ulNaCl

Plasmids: controls and active.

### **DNA solution**

In 50ml tube, combine plasmids+150mM NaCl to 5ml.

### **PEI solution:**

562.5(5\*112.5)ul PEI(25kda, 10mM)+ NaCl150mM to 5ml

7ul PEI+20-50 ul NaCl for 1ug DNA

Add dropwise (cseppenkent) PEI solution to DNA solution. Wait for 1 minute after each ml PEI solution.

Incubate 15-30min at room temperature.

Meanwhile, take of the medium. Add 12ml of DMEM 4.5g/l glucose+1%FBS.

Add 2ml of transfection complex to each plate, dropwise. Swirl plates.

Incubate for 5-7 hours.

Add 12ml DMEM1g/l glucose+10%FBS.

Incubate cells for 72 hours

Dear Balint,

There are many PEI sold by SIGMA. The one we used is :

Polyethylenimine (PEI) MW=25 000 (Aldrich) (= SIGMA)

working solution:

Dissolve 4,5 mg of pure PEI in 8 ml of deionized water  
(mix well)

Neutralize with HCl (pH 6,5-7,5)

Adjust the volume to 10 ml

Filter sterilize through 0,2  $\mu$ m

The solution is 10 mM of nitrogens

Then proceed for transfection as described in the  
protocol we  
followed during the ELC.

Good luck and best regards,

Anne