

聚凝胺 Polybrene 使用说明

浓度: 10mg/ml

规格: 50 μ L

保存: -20°C 可保存 2 年, 建议分装保存, 避免反复冻融.

产品说明:

Polybrene(聚凝胺, hexadimethrine bromide) 是一种多聚阳离子聚合物, 常用于哺乳动物细胞的 DNA 转染实验以增强转染效率。目前 Polybrene 广泛用于逆转录病毒/慢病毒介导的转染。

作用机理: 可能为通过中和细胞表面唾液酸与病毒颗粒之间的静电排斥从而促进吸附作用。

本产品为即用型溶液, 粉末用 0.9% NaCl 配置成 10mg/ml 的溶液, 并用 $0.22\mu\text{M}$ 滤膜过滤除菌。使用时一般按 1:1000-1:2000 稀释, 依细胞种类不同稀释比例不同, 具体请查阅相关文献。

注: Polybrene 对某些细胞如末端分化的神经元, DC 细胞毒性较大, 初次应先做毒性测试。

操作步骤(仅供参考, 具体使用浓度请参考相关文献)

实验 1: 病毒感染 (viral Infection)

1. 重组逆转录病毒原液的制备: 取 5ml 生长培养基 (5%血清) 加入约含单层转染逆转录包装细胞的 100mm 培养盘内。孵育 24h 后, 吸去培养液并用 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤。
2. 待感染细胞的培养: 100mm 培养盘内加入 10ml 完全培养基, 细胞密度为 5×10^5 /盘。
3. 病毒感染: 细胞培养 24h 后, 吸去完全培养液。用含 polybrene 的 2ml 病毒上清 (或将病毒原液稀释到 2ml) 感染细胞, polybrene 的终浓度为 $5\mu\text{g}$ - $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。 37°C 孵育 3-6h。
4. 收集病毒颗粒: 加入 8ml 完全培养基。感染 3 天后, 按照 1:5 的比例用选择培养基裂解细胞。

实验 2: 转染

1. 完全生长培养基培养细胞, 培养细胞密度约 50%;
2. 孵育细胞 18-24h 后准备 DNA-培养基- Polybrene 混合液, 按如下操作制备混合液:
 - ①添加完全培养基 (60mm 培养皿 2ml, 100mm 培养皿 3ml), 37°C 预热;
 - ②添加 10ng~10 μg 质粒轻轻混匀;
 - ③加入 Polybrene 至终浓度为 $5\mu\text{g}$ - $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。轻轻混匀。以上每个成分需要按顺序加入。
3. 去除培养基, 在细胞中加入 DNA-培养基-Polybrene 溶液, 在 37°C 孵育细胞 6-20h。细胞培养的前 6h 内约每 1.5h 轻柔混匀。
4. 去除 DNA-培养基-Polybrene 溶液。用 DMSO shock solution (15%DMSO in 1X HBSS) 轻轻盖住细胞 (60mm 培养皿 3ml, 100mm 培养皿 4ml)。每次加入溶液时用手轻晃培养盘 10s, 使得液体均匀分布。然后 37°C 孵育细胞 4min。
5. 立即去除 DMSO shock solution, 用完全生长培养基轻轻清洗细胞 2 次。对于 60mm 培养皿每次用 5ml 培养液清洗, 100mm 培养皿每次用 10ml 培养液清洗。
6. 加入完全培养基到细胞中;
7. 稳定转化: 去除生长培养基, 按照 1:5 的比例用选择培养基裂解细胞。
瞬时表达: 去除生长培养基, 加入新鲜的生长培养基。24-72h 后收获细胞。

注意事项: 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。