

METAFECTENE® EASY⁺

Das schnelle, einfache und effektive
Transfektionsreagenz für Säugerzellen

Bestellinformationen, SDB, Publikationen und Anwendungsbeispiele unter www.biont.com

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
METAFECTENE® EASY ⁺	T090-1.0	EASY ⁺ Transfection Reagent 1x1.0 ml 10 x EASY ⁺ buffer 1x2.0 ml
METAFECTENE® EASY ⁺	T090-2.0	EASY ⁺ Transfection Reagent 2x1.0 ml 10 x EASY ⁺ buffer 2x2.0 ml
METAFECTENE® EASY ⁺	T090-5.0	EASY ⁺ Transfection Reagent 5x1.0 ml 10 x EASY ⁺ buffer 5x2.0 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: EASY⁺ Reagenz 4°C
10 x EASY⁺ buffer 4°C (**nicht einfrieren**)

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label.

Liposomenformulierungen wie das METAFECTENE® EASY⁺ verändern bei sehr langer Lagerung bei 4°C ihre Größenverteilung. Dies verringert die Transfektionseffizienz in geringem Maße. Durch einen Einfrier-/Auftauprozess kann dieser Effekt rückgängig gemacht werden. Wir empfehlen daher das Reagenz vor der ersten Anwendung und anschließend alle 4 Wochen einem Einfrier-/Auftauprozess zu unterziehen, um optimale Resultate zu erzielen.

Gebrauch: Nur für Forschungszwecke *in vitro*, nicht zur diagnostischen, therapeutischen oder anderer klinischen Anwendung an Mensch oder Tier.

Beschreibung

METAFECTENE® EASY⁺ verbindet sehr geringe Toxizität mit hervorragenden Transfektionsergebnissen bei einem denkbar einfachen und schnellen Protokoll. Es lassen sich deshalb Transfektionen mit einem festen DNA-Lipid-Verhältnis effizient durchführen, eine aufwendige Optimierung ist nicht erforderlich. Mit dem neu entwickelten Protokoll von METAFECTENE® EASY⁺ sind zudem zwei aufeinanderfolgende Versuche pro Woche möglich, da das Standardprotokoll nur noch drei Versuchstage vorsieht. METAFECTENE® EASY⁺ zeigt keine Serum-inhibition und ist damit auch das Reagenz der Wahl für sensitive Zellen.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Qualitätskontrolle	3
1.3 Erläuterungen	3
Lagerung	3
Zustand der Zellen	3
Qualität des genetischen Materials	3
2. Arbeitsanleitungen	4
2.1 Anmerkungen zum Protokoll	4
2.2 Vorbereitung der Reagenzien	4
2.3 Vorbereiten der Zellen	4
2.4 Herstellung des Lipoplexes	4
2.5 Transfektion	5
2.6 Auswertung	5
2.7 Transfer auf andere Zellformate	5
2.8 Werte bei bekannter geeigneter Lipoplexmenge	5
2.9 Weitere Anmerkungen	6
3. Sonstiges	7
3.1 Wichtige Informationen	7
3.2 Gewährleistung	7

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von Säugerzellen mit DNA
Formulierung	Kationische Lipide mit Kolipiden in Wasser
Sterilität	getestet
Assays	1 ml: bis zu 750 (24-Well); bis zu 160 (6-Well)
Lagerung	4°C

1.2 Qualitätskontrolle

Die Qualität wird durch einen Standardtransfektionstest geprüft. Mittels Thioglycolat-Test wird eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze ausgeschlossen.

1.3 Erläuterungen

Fast, Easy, Efficient – das sind die Schlagworte mit denen sich dieses Transfektionsreagenz von Biontex am besten beschreiben lässt. Durch intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeit ist es gelungen, hervorragende Transfektionsergebnisse bei einem festen DNA-Lipid-Verhältnis zu erreichen. Somit entfällt die aufwendige Optimierung dieses Verhältnisses, was in Verbindung mit einem denkbar einfachen Protokoll zu deutlich kürzeren Versuchszeiten führt. Hinsichtlich der Transfektionseffizienz von METAFECTENE® EASY⁺ werden bei einer Vielzahl von Zellen – auch sensitiven – exzellente Resultate erreicht.

Lagerung

METAFECTENE® EASY⁺ wird **ungekühlt geliefert und alle Einzelkomponenten sollte nach Erhalt im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.** Eine Lagerung über mehrere Tage bei Raumtemperatur stellt kein Problem dar, solange die Komponenten danach wieder bei 4°C aufbewahrt werden. Einfrier- und Auftauprozesse schaden den Komponenten nicht. Im Gegenteil, es kann dadurch eine mit der Zeit sich leicht verändernde Größenverteilung der Liposomen im METAFECTENE® EASY⁺-Transfection Reagent wieder optimiert werden.

Zustand der Zellen

Die zu transfizierenden Zellen sollten in gut proliferierendem und gesundem Zustand sein. Zellen, die vor dem Ausplattieren (zur Transfektion) total konfluent waren, können bei Weitem nicht so effizient transfiziert werden wie schnell wachsende Zellen. Daher wird geraten, nur regelmäßig passagierte Zellen für Transfektionsexperimente zu benutzen. Mikrobielle Kontaminationen, wie z.B. durch Mykoplasmen, können Transfektionsergebnisse auf dramatische Weise negativ beeinflussen und müssen deshalb ausgeschlossen werden.

Qualität des genetischen Materials

Die DNA sollte zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von größtmöglicher Reinheit sein. Endotoxine zum Beispiel vermindern die Transfektionseffizienz erheblich.

2. Arbeitsanleitungen

2.1 Anmerkungen zum Protokoll

Verschiedene Zellen bzw. Zelllinien unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrer Robustheit bezüglich der Toleranz gegenüber Transfektionsreagenzien. Im folgenden Protokoll werden daher Zellen in zwei Wells (Kulturgefäßen) mit zwei verschiedenen Mengen an DNA-Lipid-Komplex (Lipoplex) transfiziert.

Nach der Auswertung dieses Versuchs wird dann entschieden, welche der beiden Lipoplexmengen für die transfizierten Zellen ideal ist. Diese Menge muss für jede Zellart empirisch bestimmt werden.

Ist bekannt, welche Lipoplexmenge für die Zellart die geeignete ist, wird nur noch diese verwendet. In Kapitel 2.8 finden sich die entsprechenden Pipettiertabellen.

Die nachfolgende Anleitung bezieht sich auf ein Well mit 1 cm² Wachstumsfläche (entspricht einem Well einer 48-Well-Platte). Eine Tabelle mit Angaben für andere Well-Formate befindet sich in Kapitel 2.7.

2.2 Vorbereitung der Reagenzien

Zunächst wird 1× EASY⁺ buffer aus dem mitgelieferten 10× EASY⁺ buffer hergestellt. Dazu wird 1 Teil 10× EASY⁺ buffer mit 9 Teilen sterilem, zellkulturgeeignetem Wasser unter sterilen Bedingungen gemischt.

Vor der Transfektion werden der 1× EASY⁺ buffer und das METAFECTENE[®] EASY⁺ Transfection Reagent auf Raumtemperatur gebracht und kurz gevortext. Die DNA-Lösung wird auf Raumtemperatur gebracht und sanft gemischt.

2.3 Vorbereiten der Zellen

Es werden 500 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 4 – 8 x 10⁵ Zellen/ml in komplettem Kulturmedium hergestellt.

Zwei Wells einer 48-Well-Platte (*Well 1* und *Well 2*) werden mit je 250 µl Zellsuspension gefüllt.

2.4 Herstellung des Lipoplexes

75 µl 1× EASY⁺ buffer werden in ein Reaktionsgefäß (idealerweise aus PP) vorgelegt.

2.0 µl METAFECTENE[®] EASY⁺ Transfection Reagent werden in den 1× EASY⁺ buffer pipettiert. Es wird durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren gemischt.

2.0 µg DNA werden dazu pipettiert und es wird erneut einmalig sanft gemischt.

Sanft mischen!

Scherkräfte schädigen den Lipoplex, wodurch die Transfektionseffizienz verringert wird.

Danach wird 15 min bei RT inkubiert.

2.5 Transfektion

Nun wird die Lipoplexlösung wie folgt auf die beiden mit Zellsuspension gefüllten Wells verteilt: 25 µl des Lipoplexes in *Well 1* und 50 µl in *Well 2*.

Die Lösungen in beiden Wells werden durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend wird bei den für die verwendete Zelllinie üblichen Bedingungen inkubiert, z.B. 37°C in CO₂-haltiger Atmosphäre.

2.6 Auswertung

Nach 24–72 h wird die Auswertung durchgeführt. Die besten Ergebnisse bzw. die höchsten Proteinmengen werden häufig nach 48 h erhalten. Der optimale Zeitpunkt wird durch die Eigenschaften der Zellen und des Expressionsproduktes sowie der Promotoraktivität bestimmt.

2.7 Transfer auf andere Wellformate

Format	Fläche	Zell- suspension	1× EASY ⁺ buffer	M. EASY ⁺ Transf. Reagent	DNA	Lipoplexvolumen	
						Well 1	Well 2
96 Well	0.3 cm ²	2× 100 µl	30 µl	0.6 µl	0.6 µg	10 µl	20 µl
48 Well	1.0 cm ²	2× 250 µl	75 µl	2.0 µl	2.0 µg	25 µl	50 µl
24 Well	1.9 cm ²	2× 500 µl	150 µl	3.8 µl	3.8 µg	50 µl	100 µl
12 Well	3.6 cm ²	2× 900 µl	300 µl	7.2 µl	7.2 µg	100 µl	200 µl
6 Well	9.0 cm ²	2× 2.2 ml	600 µl	18 µl	18 µg	200 µl	400 µl
60 mm Schale	22 cm ²	2× 5.5 ml	1.5 ml	44 µl	44 µg	500 µl	1.0 ml
100 mm Schale	60 cm ²	2× 15 ml	4.5 ml	120 µl	120 µg	1.5 ml	3.0 ml

2.8 Werte bei bekannter geeigneter Lipoplexmenge

Format	Lipoplexmenge 1			Lipoplexmenge 2		
	1× EASY ⁺ buffer	M. EASY ⁺ Transf. Reagent	DNA	1× EASY ⁺ buffer	M. EASY ⁺ Transf. Reagent	DNA
96 Well	10 µl	0.2 µl	0.2 µg	20 µl	0.4 µl	0.4 µg
48 Well	25 µl	0.7 µl	0.7 µg	50 µl	1.3 µl	1.3 µg
24 Well	50 µl	1.3 µl	1.3 µg	100 µl	2.5 µl	2.5 µg
12 Well	100 µl	2.5 µl	2.5 µg	200 µl	5.0 µl	5.0 µg
6 Well	200 µl	6 µl	6 µg	400 µl	12 µl	12 µg
60 mm Schale	500 µl	15 µl	15 µg	1.0 ml	29 µl	29 µg
100 mm Schale	1.5 ml	42 µl	42 µg	3.0 ml	78 µl	78 µg

2.9 Weitere Anmerkungen

Insbesondere bei schnell wachsenden Zellen sollte bei verbrauchtem Kulturmedium ein Medienwechsel durchgeführt werden.

Bei sehr empfindlichen Zellen kann ein Mediumwechsel ca. 6–8 h nach dem Aussäen der Zellen bzw. nach der Transfektion vorteilhaft sein.

Falls geringere Zelldichten erwünscht sind, kann das Volumen der Zellsuspension um bis zu 30% reduziert werden. Nach dem Anwachsen (6–8 h) sollte in diesem Fall mit Kulturmedium aufgefüllt werden.

3. Sonstiges

3.1 Wichtige Informationen

Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Forschung und für *in vitro* Anwendungen entwickelt und wird nur für diese Zwecke verkauft. Es darf nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke an Mensch oder Tier angewendet werden.

METAFECTENE[®] ist eine eingetragene Handelsmarke der Biontex Laboratories GmbH.

3.2 Gewährleistung

Biontex gewährleistet nur dann für die beschriebenen Eigenschaften dieses Produktes bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum, wenn es gemäß der in diesem Manual angegebenen Informationen gelagert und angewendet wurde. Sollten Sie trotzdem mit diesem Produkt nicht zufrieden sein, kontaktieren Sie bitte Biontex Laboratories GmbH.

*Biontex Laboratories GmbH
Landsberger Straße 234
im MGH
80687 München/Laim
Germany*

*Tel.: +49 (0)89 3247995-0
Fax: +49 (0)89 3247995-2
E-Mail: contact@biontex.com
Internet: www.biontex.com*