

METAFECTENE®

Das effiziente Transfektionsreagenz für Säugerzellen

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

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
METAFECTENE®	T020-0.2	200 µl
METAFECTENE®	T020-1.0	1.0 ml
METAFECTENE®	T020-2.0	2 x 1.0 ml
METAFECTENE®	T020-5.0	5 x 1.0 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: 4°C

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label.

Liposomenformulierungen wie das METAFECTENE® 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® ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Seine spezifische molekulare Struktur ist so konstruiert, dass der Eintritt der DNA bzw. RNA hocheffizient stattfinden kann, indem zunächst die zu transfizierende DNA bzw. RNA in sehr kompakte Strukturen komplexiert wird. In der Zelle wird die Freisetzung der DNA bzw. RNA durch seine eingebaute Möglichkeit zum sog. "Endosome Buffering" gewährleistet.

METAFECTENE® wird als gebrauchsfertige Lösung geliefert. METAFECTENE® zeigt keine Seruminhibition, was es zum Reagenz der Wahl für sehr sensitive Zellen macht.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Qualitätskontrolle	3
1.3 Erläuterungen	3
Lagerung	3
Zustand der Zellen	3
Konfluenz der Zellen	3
Qualität der Nukleinsäure	4
Antibiotika	4
Optimierung	4
Stabile Transfektion	4
2. Arbeitsanleitungen	5
2.1 Transfektion von adhärennten Zellen - Standardprotokoll für das 12-Well-Format -	5
2.2 Transfektion von Suspensionszellen - Standardprotokoll für das 12-Well-Format -	6
3. Optimierung	7
3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter	7
Verhältnis von DNA bzw. RNA zu METAFECTENE®	7
Quantität des Transfektionskomplexes	7
Auszusäende Zellmengen	7
Serumeffekte	7
3.2 Weitere Optimierungsparameter	7
Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen	7
Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses	8
Nukleinsäure-Lipid-Komplexbildung mit PBS anstelle von serumfreien Medium	8
Zugabe des Transfektionskomplexes auf frisch ausgesäten Zellen	8
3.3 Optimierungsprotokoll	8
Beispiel für das 12-Well-Format	9
4. Up- und Downscale	10
5. Troubleshooting	11
6. Sonstiges	12
6.1 Wichtige Informationen	12
6.2 Gewährleistung	12

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von Säugerzellen mit Nukleinsäuren
Formulierung	Kationische Lipide mit Kolipiden in Wasser
Assays	bis zu 1.500 (24-well) oder bis zu 400 (6-well) bei 1 ml Reagenz
Sterilität	getestet
Zellkultur	getestet
Lagerung	4°C

1.2 Qualitätskontrolle

Die Qualität wird durch einen Standardtransfektionstest geprüft. Mittels Thioglycolatlösung wird eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze ausgeschlossen.

1.3 Erläuterungen

METAFACTENE[®] zeigt keine Serum-inhibition und ist damit auch das Reagenz der Wahl für sehr sensitive Zellen.

Lagerung

METAFACTENE[®] wird **ungekühlt geliefert und sollte nach Erhalt im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden**. Eine Lagerung über mehrere Tage bei Raumtemperatur stellt kein Problem dar, solange das Reagenz danach wieder bei 4°C aufbewahrt wird. Einfrier- und Auftauprozesse schaden dem Reagenz nicht. Im Gegenteil, es kann dadurch eine mit der Zeit sich leicht verändernde Größenverteilung der Liposomen im METAFACTENE[®] 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) eine gewisse Zeit 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 oder Pilze, können auf dramatische Weise Transfektionsergebnisse negativ beeinflussen.

Konfluenz der Zellen

Die reale Konfluenz der Zellen (adhärent) kann nicht durch optische Einsichtnahme der Wachstumsfläche per Mikroskop bestimmt werden, sondern optimal erst durch Erstellen einer Wachstumskurve und Vergleich dieser mit der real gezählten Zellzahl. Oft korreliert eine zu 90–100% bedeckte Wachstumsfläche mit 30–60% realer Konfluenz.

Entscheidend für optimale Ergebnisse der DNA-Transfektion ist deren Durchführung während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen, da die Zellteilung den Transport der DNA in den Nukleus stark unterstützt. Die optimale Konfluenz muss daher für jede Zellart angepasst werden!

Gewöhnlich wird man beste Ergebnisse bei einer Bedeckung der Wachstumsfläche von 90–100% erreichen (optische Konfluenz, siehe Kapitel 5).

Qualität der Nukleinsäure

Die DNA bzw. RNA sollte zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von höchstmöglicher Reinheit sein. Zum Beispiel vermindern Endotoxine erheblich die Transfektionseffizienz. Die DNA bzw. RNA sollte vor deren Gebrauch zur Komplexbildung mit METAFECTENE® nicht länger als 5 min als Lösung in serumfreiem Medium aufbewahrt werden. Die dabei stattfindende Adsorption der DNA bzw. RNA am Behältermaterial kann einen Abfall der Transfektionseffizienz verursachen. Polypropylen zeigt im Vergleich zu z.B. Glas und Polyethylen die geringste Neigung zur Adsorption von Transfektionsreagenz und genetischem Material.

Antibiotika

Diese müssen in den Arbeitsschritten vermieden werden, in denen extra darauf hingewiesen wird. Die Verwendung von Antibiotika im Transfektionsmedium kann in manchen Fällen zum Zelltod führen.

Optimierung

METAFECTENE® besitzt normalerweise einen breiten Effizienzbereich, trotzdem raten wir zur jeweiligen Optimierung des Transfektionsprotokolls für jede Kombination von Plasmid und Zelllinie. Jede Zelllinie zeigt charakteristische, optimale DNA- bzw. RNA-Lipid-Mengenverhältnisse. Sogar das Format der Zellkulturplatten sowie der eingesetzten Gefäße zur Lipoplexbildung zeigt Einflüsse auf diese Verhältnisse und auf die zu verwendenden Absolutmengen der Reagenzien (vermutlich spielt hier die unterschiedlich starke Adsorption am Behältermaterial aufgrund unterschiedlicher Oberflächendimensionen eine Hauptrolle).

Zudem sollte man auf keinen Fall Protokolle, die mit anderen Transfektionsreagenzien durchgeführt werden, direkt auf METAFECTENE® übertragen (oder auf irgendein anderes Transfektionsreagenz). Jedes Transfektionsreagenz besitzt seine charakteristische molekulare Struktur mit ganz spezifischen physikalischen Eigenschaften, die erheblichen Einfluss auf die DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnisse haben. Eine entsprechende Optimierungsanleitung ist unter Kapitel 3 gegeben. Wenn Sie die in Klammern in der Tabelle (Kapitel 4) angegebenen Startwerte als solche dafür anwenden, wird der Optimierungsaufwand minimiert.

Stabile Transfektion

Bei stabilen Transfektionen folgen Sie der allgemeinen Arbeitsanleitung und säen die Zellen jedoch in niedrigerer Zelldichte aus. Am Tage der Transfektion sollten die Zellen weniger als 50% konfluent sein. Nach dem Transfektionsprozedere wird das Transfektionsmedium durch ein entsprechend dafür gewähltes Medium inklusive Antibiotika ausgewechselt.

2. Arbeitsanleitungen

Für die Erzielung optimaler Ergebnisse raten wir eine entsprechende Optimierung nach Protokoll durchzuführen.

2.1 Transfektion von adhärenenten Zellen - Standardprotokoll für das 12-Well-Format -

1. Plattieren Sie $1.0 - 4.0 \times 10^5$ Zellen (Startpunkt 2.0×10^5) in einer 12-Well-Kulturschale in 1 ml geeignetem vollständigem Wachstumsmedium aus. Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und Zellgröße ab und eine Mengenoptimierung z.B. über die Erstellung einer Wachstumskurve ist eventuell notwendig. Behalten Sie in jedem Fall dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei.
2. Inkubieren Sie die Zellen, je nach Zelltyp, für 18–24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator bis die Wachstumsfläche zu 90–100% bedeckt ist.
3. Die Stocklösungen von DNA bzw. RNA und das Transfektionsreagenz sollen Raumtemperatur besitzen. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die Stocklösungen.
4. Stellen Sie folgende Lösungen in einer 96-Well-Platte (cell culture grade) oder in anderen Gefäßen aus Polypropylen, Glas oder Polystyrol (vorzugsweise Polypropylen) her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA- bzw. RNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen.
 - Lösung **A**: 0.5 – 1.5 µg DNA bzw. RNA auf 50 µl serum- und antibiotikafreiem Medium oder in 1xPBS
 - Lösung **B**: 1.0 – 7.0 µl METAFECTENE® auf 50 µl serum- und antibiotikafreiem Medium oder in 1xPBS
5. Mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Das DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnis muss stets zwischen 1:2 und 1:7 [µg DNA bzw. RNA: µl METAFECTENE®] liegen.

Bitte beachten Sie im folgendem Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe:
Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lösung zur METAFECTENE® - Lösung und nicht umgekehrt!

6. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen vorsichtig und inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 15–20 min.
7. Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexe so schnell wie möglich nach der Inkubationszeit zu den Zellen, mischen Sie **äußerst vorsichtig** durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie bei 37°C in einem CO₂ Inkubator (im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen).
8. Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität 24–72 h, je nach Zelltyp und Promotoraktivität, nach dem Beginn der Transfektion durch.

2.2 Transfektion von Suspensionszellen - Standardprotokoll für das 12-Well-Format -

1. Sähen Sie per Well einer 12-Well-Kulturschale $0.4 - 1.6 \times 10^5$ Zellen in 1ml eines geeigneten vollständigen Wachstumsmediums aus. Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und Zellgröße ab und eine Mengenoptimierung z.B. über die Erstellung einer Wachstumskurve ist eventuell notwendig. Behalten Sie dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei.
2. Die Stocklösungen von DNA bzw. RNA und Transfektionsreagenz sollen Raumtemperatur besitzen. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die Stocklösungen.
3. Stellen Sie folgende Lösungen in einer 96-Well-Platte (cell culture grade) oder in anderen Gefäßen aus Polypropylen, Glas oder Polystyrol (vorzugsweise Polypropylen) her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA- bzw. RNA -Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen:
 - Lösung **A**: 0.5 – 1.5 µg DNA bzw. RNA auf 50 µl serum- und antibiotikafreiem Medium oder in 1xPBS
 - Lösung **B**: 1.0 – 7.0 µl METAFECTENE[®] auf 50 µl serum- und antibiotikafreiem Medium oder in 1xPBS
4. Mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Das DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnis muss stets zwischen 1:2 und 1:7 [µg DNA bzw. RNA: µl METAFECTENE[®]] liegen.

Bitte beachten Sie im folgendem Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe:
Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lösung zur METAFECTENE[®] - Lösung und nicht umgekehrt!

5. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen vorsichtig und inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 15–20 min.
6. Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexe so schnell wie möglich nach der Inkubationszeit tropfenweise zur Zellsuspension, mischen Sie **äußerst vorsichtig** durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren bei 37°C in einem CO₂ Inkubator (im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man nach 3–6 h die Transfektionslösung entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen).
7. Zentrifugieren Sie die Zellen und führen Sie einen Reporter-Gen-Aktivitätstest 24–72 h nach dem Beginn der Transfektion durch.

3. Optimierung

3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter

Verhältnis von DNA bzw. RNA zu METAFECTENE®

Die wichtigste Optimierungseinflussgröße ist das **Verhältnis** von DNA bzw. RNA zu METAFECTENE®.

Für eine erfolgreiche Transfektion ist eine positive Überschussladung des DNA- bzw. RNA-METAFECTENE®- Komplexes notwendig.

Das dafür optimale DNA- bzw. RNA- METAFECTENE® - Verhältnis hängt von der jeweiligen Zelllinie ab.

Quantität des Transfektionskomplexes

Um höchste Transfektionseffizienzen erzielen zu können, muss auch die Menge des DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexes optimiert werden. Eine zu große Menge kann zur Überexpression und/oder Lysis der Zellen führen (Lipide sind auch Zell-Lysis-Reagenzien!) und damit zur Effizienzverringern.

Das optimale DNA- bzw. RNA- METAFECTENE®- Verhältnis und die optimale Menge des DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexes variiert mit der vorhandenen Anzahl der Zellen. Zur Gewährleistung reproduzierbarer Optimierung dieser Parameter muss die Zellzahl und Inkubationsperiode bis zum Transfektionsprozess konstant gehalten werden.

Auszusäende Zellmengen

Bitte beachten Sie hierzu die Ausführungen unter Kapitel 5.

Serumeffekte

Bislang zeigten mit METAFECTENE® transfizierte Zellen, welche bei Anwesenheit von Serum transfiziert wurden, fast immer die besten Ergebnisse. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass spezielle Zelllinien ein anderes Verhalten zeigen. Demgemäß kann die Transfektion mit METAFECTENE® genauso ohne Serum, unter serumreduzierten und unter Totalmedium-Bedingungen (10% Serum) durchgeführt werden.

Während der **Komplexbildung** zwischen METAFECTENE® und DNA bzw. RNA ist die Anwesenheit von Serum absolut verboten!

Das Serum ist in der Lage, die Komplexbildung zu inhibieren. Ist jener Komplex erst einmal gebildet, spielt ein Kontakt mit Serum keine Rolle mehr.

Das optimale Verhältnis von DNA bzw. RNA zu METAFECTENE® und die optimale Menge an DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex kann bei verschiedenen Serumkonzentrationen variieren.

Die Optimierung dieser wichtigsten Parameter führt bei Anwendung der Optimierungsanleitung zu absolut befriedigenden Ergebnissen.

3.2 Weitere Optimierungsparameter

Folgende Parameter können bei weiterer schrittweiser Optimierung zu noch besseren Ergebnissen führen:

Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen

Die zu transfizierenden Zellen können über einen sehr breiten Zeitbereich (3–72 h) dem Transfektionskomplex ausgesetzt werden. Die beste anzuwendende Transfektionszeit hängt von der Sensitivität der Zellen ab.

Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses

Der Genaktivitätsassay sollte in einem Bereich von 24–72 h nach Beginn der Transfektion durchgeführt werden. Die optimale Zeit wird durch den Zelltypus, die Promotoraktivität und dem Expressionsprodukt (z.B. Toxizität) bestimmt.

Nukleinsäure-Lipid-Komplexbildung mit PBS anstelle von serumfreiem Medium

In vielen Versuchsreihen zeigte sich, dass bei Verwendung von PBS zur DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexbildung anstelle von serum- und antibiotikafreiem Medium besser reproduzierbare und teilweise auch höhere Transfektionsraten, vor allem bei niedrigen Lipid-Mengen, erzielbar sind.

PBS-Zusammensetzung:

10x PBS:

40 g	NaCl
1 g	KCl
1 g	KH ₂ PO ₄
5,75 g	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O

Die Salze werden abgewogen, vereinigt und auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt und gelöst. Danach wird autoklaviert.

1x PBS:

In einem Messkolben wird 10x PBS auf 1:10 mit Wasser verdünnt und autoklaviert.

Zugabe des Transfektionskomplexes auf frisch ausgesäten Zellen

Gibt man den Transfektionskomplex auf adhärente Zellen kurz (innerhalb ca. 1 Stunde), nachdem jene in das entsprechende Kulturgefäß ausgesät wurden, so kann in einigen Fällen eine erhebliche Effizienzsteigerung erreicht werden. Die anschließende übliche Inkubationszeit muss nicht eigens angepasst werden. **Außerdem kann auf diese Weise die Dauer des Transfektionsversuches um 24 Stunden verkürzt werden!**

3.3 Optimierungsprotokoll

Verwenden Sie dafür Reporter-gen-Plasmide wie z.B. pCMVβGal, pND2Lux, pEGFP etc.

1. Variieren Sie die Menge an METAFECTENE[®] innerhalb des in der Tabelle im Kapitel 4 vorgeschlagenen Intervalls (z.B. 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12 µl etc. METAFECTENE[®]). Halten Sie die Anzahl der Zellen bis zum Beginn der Transfektion und die DNA- bzw. RNA-Menge konstant bei den vorgeschlagenen Mengen. Die Serumkonzentration während der Transfektionszeit (= Inkubation mit dem DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex) sollte mit der zur Kultivierung der Zellen verwendeten übereinstimmen.
2. Variieren Sie die Mengen an DNA bzw. RNA (z.B. 1 µg, 1.5 µg, 2 µg, 2.5 µg, 3 µg etc.), indem man aber die unter Schritt 1 vorgeschlagenen METAFECTENE[®]-Mengen-Intervalle proportional beibehält. Halten Sie die Anzahl der Zellen bis zum Beginn der Transfektion konstant. Die Serumkonzentration während der Transfektionszeit (= Inkubation mit dem DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex) sollte mit der zur Kultivierung der Zellen verwendeten übereinstimmen. Bestimmen Sie damit die optimalen DNA bzw. RNA- und Lipid-Mengen.
3. Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2 unter serumreduzierten und serumfreien Bedingungen.
4. Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2 mit anderen Startwerten für die Zellzahl am Anfang des Transfektionsprozesses.

Beispiel für das 12-Well-Format

1. Plattieren Sie $1.0 - 4.0 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 12-Well Mikrotiterplatte in 1 ml geeignetem vollständigem Wachstumsmedium aus (Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und Zellgröße ab und dessen Optimierung ist eventuell notwendig. Behalten Sie dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei).
2. Inkubieren Sie die Zellen bei 37°C in einem CO₂ Inkubator bis die Wachstumsfläche zu 90–100% bedeckt ist. Je nach Zelltypen variiert die benötigte Zeit, sie beträgt aber in der Regel 18-24 h.
3. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die Stocklösungen des Reportergens und von METAFECTENE®. Die Lösungen sollten Raumtemperatur besitzen.
4. Pipettieren Sie 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium oder 1xPBS zu jedem unten angegebenen Well in einer 96-Well-Platte (cell culture grade, PP), anschließend addieren Sie:
0.5 µg DNA bzw. RNA in A1-A4
1.0 µg DNA bzw. RNA in B1-B4
1.5 µg DNA bzw. RNA in C1-C4
und mischen Sie die Lösungen vorsichtig durch einmaliges Auf- und Abpipettieren.
5. Pipettieren Sie 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium oder 1xPBS zu jedem unten angegebenen Well in einer 96-Well-Platte (cell culture grade, PP), anschließend addieren Sie:
1 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl METAFECTENE® in D1-D4
2 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl METAFECTENE® in E1-E4
4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl METAFECTENE® in F1-F4
und mischen Sie die Lösungen vorsichtig durch einmaliges Auf- und Abpipettieren.

Beachten Sie im folgendem Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe: Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lösung zur METAFECTENE®-Lösung und nicht umgekehrt!

6. Vereinigen Sie beide Lösungen (A1+D1, A2+D2 etc., B1+E1, B2+E2 etc., C1+F1, C2+F2 etc.), mischen vorsichtig (Scherkräfte können den sich bildenden Komplex zerstören!) und lassen Sie die Lösungen bei Raumtemperatur 15–20 min inkubieren.
7. Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexe so schnell wie möglich nach der Inkubationszeit zu den Zellen, mischen Sie **äußerst vorsichtig** durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie bei 37°C in einem CO₂ Inkubator (im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen).
8. Führen Sie einen Test auf Reportergenaktivität 24–72 h, je nach Zelltyp und Promotoraktivität, nach dem Beginn der Transfektion durch.

Sind die Ergebnisse befriedigend, kann man nach Bedarf up- oder downscalen. Siehe diesbezüglich die unter Kapitel 4 angegebenen Parameter für alle üblichen Formate.

4. Up- und Downscale

Angegeben sind die verschiedenen Reagenzmengen für jeweilige Kulturgefäße (in Rundklammern sind die vorgeschlagenen Startwerte der Optimierung angegeben).

Bitte beachten Sie:

1. Der optimale Verhältnisbereich von DNA bzw. RNA [μg] zu METAFECTENE® [μl] liegt nach bisherigen Resultaten in den meisten Fällen zwischen 1:2 und 1:7.
2. Aufgrund von Adsorptionsvorgängen verwendeter Agenzien an Gefäßwände sollte bei erheblich unterschiedlichen Formaten die Lipoplexmenge und das DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnis eigens optimiert werden.

In Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte.

Kulturplatte	96-Well Platte	24-Well Platte	12-Well Platte	6-Well Platte	60mm	100mm
Wachstumsfläche [cm²]	0.31	1.9	3.7	9	22	60
Proportionalfaktor	0.03	0.2	0.4	1.0	2.5	6.7
Ausgesäte Zahl adherenter Zellen (1 Tag vor der Transfektion) [$\times 10^5$]*	0.10–0.60 (0.30)	0.4–2.0 (1.0)	1.0–4.0 (2.0)	2.5–10.0 (5.0)	6.0–24.0 (12.0)	15.0–60.0 (25.0)
Ausgesäte Zahl Suspensionszellen (am Tag der Transfektion) [$\times 10^5$]*	0.04–0.24 (0.12)	0.16–0.8 (0.40)	0.4–1.6 (0.8)	1.0–4.0 (2.0)	2.4–9.6 (4.8)	6.0–24.0 (10.0)
Zellsuspensionsvolumen [ml]	0.15	0.5	1.0	2.0	4.5	12.0
DNA-bzw.RNA-Menge [μg]	0.05-0.3 (0.1)	0.15–1.0 (0.5)	0.3–2.0 (1.0)	0.4–5.0 (2.0)	1.0–12.0 (6.0)	2.0–34.0 (14.0)
METAFECTENE® Menge [μl]	0.2–4.0 (0.6)	0.5–7.0 (2.0)	1.0–15.0 (3.0)	2.0–35.0 (6.0)	4.0–90.0 (18.0)	10-250 (42.0)
Verdünnungsvolumen von DNA/RNA [μl]	15-30	30	50	100	300	700
Verdünnungsvolumen METAFECTENE® [μl]	10-50	10-50	50	100	300	700

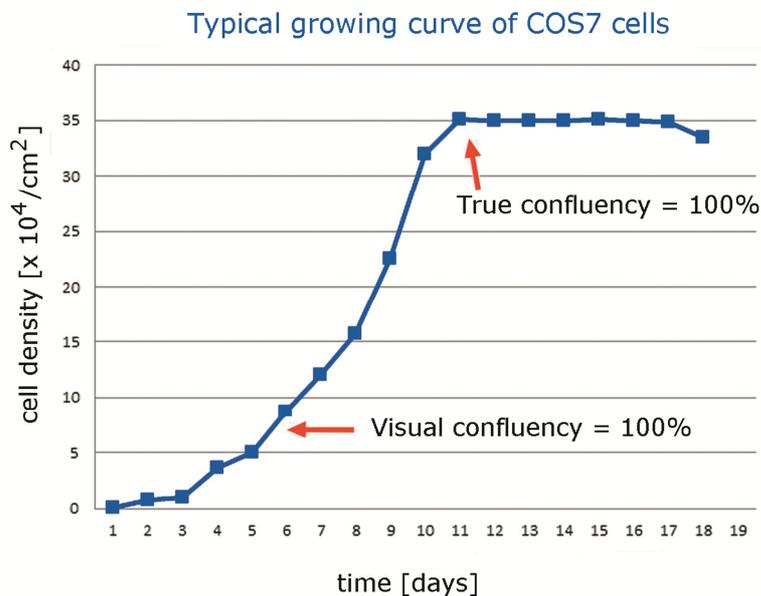
* Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und Zellgröße ab und dessen Optimierung ist eventuell notwendig. Behalten Sie dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei.

5. Troubleshooting

1. Vermeiden Sie den Kontakt **purere** METAFECTENE®-Lösung und **purere** DNA- bzw. RNA-Lösung mit dem Behältnismaterial.

Schlussfolgerung: Legen Sie immer serum- und antibiotikafreies Medium vor und geben die jeweiligen puren Lösungen dazu!

2. Die im Medium befindlichen DNA- bzw. RNA- und METAFECTENE®-Lösungen sollten innerhalb von 5 Minuten vereinigt werden.
3. Die Konfluenz der Zellen, die optisch per Mikroskop bestimmt werden kann ("optische" Konfluenz = prozentuale Bedeckung der Wachstumsfläche mit Zellen) ist **nicht identisch** mit der Konfluenz, welche über die Wachstumskurve bestimmt werden kann (= reale Konfluenz). Beste Resultate werden erzielt, wenn die Transfektion mit Zellen im höchsten Proliferierungszustand (= 30–60% reale Konfluenz) durchgeführt wird. Dies korreliert meistens mit der "optischen" Konfluenz von 90–100%.



4. Vermindertes Zellwachstum und/oder Toxizitätserscheinungen gehen sehr oft einher mit Überexpression (bei z.B. hoher Transfektionseffizienz). Dies kann durch erhöhte Konfluenz der Zellen und/oder erniedrigte Lipoplex-Menge vermieden werden.
5. Geben Sie während der Transfektion kein Antibiotika zum Medium, da dies Zelltod verursachen und damit die Transfektionseffizienz mindern kann.
6. Im Falle sehr empfindlicher Zellen sollte die Transfektionslösung nach 3–6 h durch frisches komplettes Medium ausgetauscht werden.

6. Sonstiges

6.1 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.

6.2 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*