

DOTAP

Das etablierte Transfektionsreagenz für Säugerzellen

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

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
DOTAP	T010-1.0	1.0 ml
DOTAP	T010-2.0	2 x 1.0 ml
DOTAP	T010-5.0	5 x 1.0 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: 4°C (**nicht einfrieren**)

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label

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

Beschreibung

Das monokationische Transfektionsreagenz DOTAP ist eine gebrauchsfertige, wässrige Liposomenformulierung von N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propane methylsulfate (C₄₃H₈₃NO₈S, MW: 774,21) mit einer Konzentration von 1 mg/ml. DOTAP transfiziert Nukleinsäuren sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Serum.

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 Nukleinsäuren	3
Adsorptionsprozesse	4
Optimierung	4
Stabile Transfektion	4
2. Arbeitsanleitungen	4
2.1 Transfektion von adhärenenten Zellen	4
2.2 Transfektion von Suspensionszellen	5
3. Optimierung	5
3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter	5
Verhältnis von Nukleinsäure zu DOTAP	5
Quantität des Transfektionskomplexes	6
Konfluenz der Zellen	6
Serumeffekte	6
3.2 Weitere Optimierungsparameter	7
Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen	7
Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses	7
4. Up- und Downscale	7
5. Sonstiges	8
5.1 Wichtige Informationen	8
5.2 Gewährleistung	8

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder Antisense Oligos
Formulierung	1 mg/ml 1,2-Di-(9Z-octadecenoyl)- 3-trimethylammoniumpropan-Methylsulfat in Wasser
Assays	bis zu 150 (6-Well) oder bis zu 75 (60 mm) pro 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

Lagerung

DOTAP wird **ungekühlt geliefert und sollte nach Erhalt im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert werden**. Eine Lagerung über kurze Zeit bei Raumtemperatur stellt kein Problem dar, solange das Reagenz danach wieder bei 4°C aufbewahrt wird. Das Reagenz darf jedoch nicht eingefroren 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 Transfektions-Experimente zu benutzen. Mikrobielle Kontaminationen, wie z. B. durch Mykoplasmen oder Pilze, können auf dramatische Weise Transfektionsergebnisse negativ beeinflussen.

Antibiotika 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.

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. Oftmals 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. Dies muss für jede Zellart angepasst werden!

Qualität der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren sollten zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von höchstmöglicher Reinheit sein. Insbesondere Verunreinigungen bakterieller Herkunft, wie Endotoxine, beeinträchtigen die Transfektionseffizienz erheblich.

Adsorptionsprozesse

Die Nukleinsäuren sowie das Transfektionsreagenz sollten nicht länger als 5 min in verdünnter Form vor deren Gebrauch zur Komplexbildung in den Gefäßen belassen werden. Durch eine Adsorption der Nukleinsäuren und der Lipide am Behältermaterial kann es zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz kommen. Zudem sollten Gefäße bevorzugt aus Polypropylen verwendet werden, da diese weniger Neigung zur Adsorption zeigen, im Vergleich zu Glas oder Polyethylen. Aus dem gleichen Grund sollte der Lipoplex unmittelbar nach der angegebenen Inkubationszeit auf die Zellen gegeben werden. Die Adsorptionsprozesse erschweren auch Down- und Upscaleprozesse aufgrund unterschiedlicher Verhältnisse der Plastikoberflächen zu den Medienvolumina in den verschiedenen großen Kulturgefäßen.

Optimierung

DOTAP besitzt normalerweise einen breiten Effizienzbereich, trotzdem raten wir zur jeweiligen Optimierung des Transfektionsprotokolls. Jede Zelllinie zeigt charakteristische optimale DNA/Lipid-Mengenverhältnisse, sogar das Format der Zellkulturplatten zeigt Einflüsse auf diese Verhältnisse sowie auch auf zu verwendende Absolutmengen der Reagenzien. Zudem sollte man auf keinen Fall Protokolle, die mit anderen Transfektionsreagenzien durchgeführt werden, direkt auf DOTAP übertragen (oder auf irgendein anderes Transfektionsreagenz). Jedes Transfektionsreagenz besitzt seine charakteristische molekulare Struktur mit ganz spezifischen physikalischen Eigenschaften, die erheblichen Einfluss auf die DNA/Lipid-Verhältnisse haben.

Stabile Transfektion

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

2. Arbeitsanleitungen



Für Erstapplikationen raten wir ein Optimierungsprotokoll durchzuführen.

2.1 Transfektion von adhärenenten Zellen

1. Plattieren Sie $2.5-10.0 \times 10^5$ Zellen (Startwert 5.0×10^5) in einer 35 mm Kulturschale in 1–2 ml geeignetem vollständigem Wachstumsmedium aus.
2. Inkubieren Sie die Zellen bei 37°C in einem CO₂ Inkubator bis die Wachstumsfläche nahezu (= 90–100%) bedeckt ist. Je nach Zelltyp werden dafür 18–24 Stunden benötigt.
3. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die Stocklösungen von DNA bzw. RNA und DOTAP. Die Lösungen sollten Raumtemperatur besitzen.
4. Stellen Sie folgende Lösungen in einer z. B. 96-Well Platte (cell culture grade) her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA- bzw. RNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommt:
 - Lösung **A**: 1–3 µg DNA auf 100 µl Medium (serum- und antibiotikafrei)
Startpunkt: 2 µg
 - Lösung **B**: 2–30 µl DOTAP Transfektionsreagenz auf 100 µl Medium (serum- und antibiotikafrei),
Startpunkt: 16 µl
5. Mischen Sie die Lösungen durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Geben Sie Lösung A zu Lösung B (nicht umgekehrt!), mischen Sie durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (nicht Vortexen oder Zentrifugieren!) und inkubieren Sie die Lösung bei Raumtemperatur, damit sich der DNA/Lipidkomplex bilden kann. Dies dauert 15–20 Minuten.

7. Während der Komplexbildung waschen Sie die Zellen einmal mit 1–2 ml PBS oder geeignetem Medium und befüllen Sie die Kulturschale mit 1.0 ml frischem antibiotikafreiem Medium inklusive Serum (oder auch ohne, falls serumfreie Bedingungen gewünscht werden).
8. Geben Sie den DNA/Lipid-Komplex zu den Zellen, mischen Sie vorsichtig durch Schwenken der Kulturschale und inkubieren Sie bei 37°C in einem CO₂ Inkubator für 3–10 Stunden (Startpunkt: 6 Stunden).
9. Nach dieser Inkubationszeit ersetzen Sie das Transfektionsmedium mit 1.5 ml komplettem Wachstumsmedium.
10. Führen Sie einen Test auf Reportergenaktivität 24–72 Stunden, je nach Zelltyp und Promoteraktivität, nach dem Beginn der Transfektion durch.

2.2 Transfektion von Suspensionszellen

1. Waschen Sie die Zellen einmal mit PBS oder geeignetem Medium.
2. Säen Sie 1.0–6.0 x 10⁶ Zellen (Startpunkt 2.0 x 10⁶ Zellen) in einer 35 mm Kulturschale in 2 ml frischem antibiotikafreiem Medium je nach Bedarf mit oder ohne Serum aus.
3. Stellen Sie folgende Lösungen in einer z. B. 96-Well Platte (cell culture grade) her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA- bzw. RNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommt. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die Stocklösungen von DNA bzw. RNA und Transfektionsreagenz. Die Lösungen sollten Raumtemperatur besitzen.
 - Lösung **A**: 5 µg DNA auf 100 µl Medium (serum- und antibiotikafrei)
Startpunkt: 2 µg
 - Lösung **B**: 20–50 µl DOTAP Transfektionsreagenz auf 100 µl Medium (serum- und antibiotikafrei)
Startpunkt: 32 µl
4. Mischen Sie die Lösungen durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
5. Vereinigen Sie beide Lösungen indem Sie Lösung A zu Lösung B geben (nicht umgekehrt!), mischen Sie durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (nicht Vortexen oder Zentrifugieren!) und inkubieren Sie bei Raumtemperatur, damit sich der DNA/Lipidkomplex bilden kann. Dies dauert 15–20 Minuten.
6. Geben Sie den DNA/Lipid-Komplex zur Zellsuspension, mischen Sie vorsichtig durch Schwenken der Kulturschale.
7. Inkubieren Sie bei 37°C in einem CO₂ Inkubator für 3–10 Stunden (Startpunkt: 6 Stunden).
8. Nach dieser Inkubationszeit ersetzen Sie das Transfektionsmedium mit komplettem Wachstumsmedium.
9. Führen Sie einen Test auf Reportergenaktivität 24–72 Stunden, je nach Zelltyp und Promoteraktivität, nach dem Beginn der Transfektion durch.

3. Optimierung

3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter

Verhältnis von Nukleinsäure zu DOTAP

Die wichtigste Optimierungseinflussgröße ist das Verhältnis von DNA bzw. RNA zu DOTAP. Für eine erfolgreiche Transfektion ist eine positive Überschussladung des Nukleinsäure/DOTAP-Komplexes unbedingt notwendig. Das dafür optimale Verhältnis hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. Die DOTAP-Menge kann im Bereich von 5–20 µl pro µg Nukleinsäure optimiert werden. Die maximale DOTAP Konzentration sollte nicht über 40 µl/ml Kulturmedium

hinausgehen. Die Nukleinsäuremenge kann in einem Bereich von 0.5-2.5 µg bezüglich einer 35 mm Kulturschale optimiert werden.

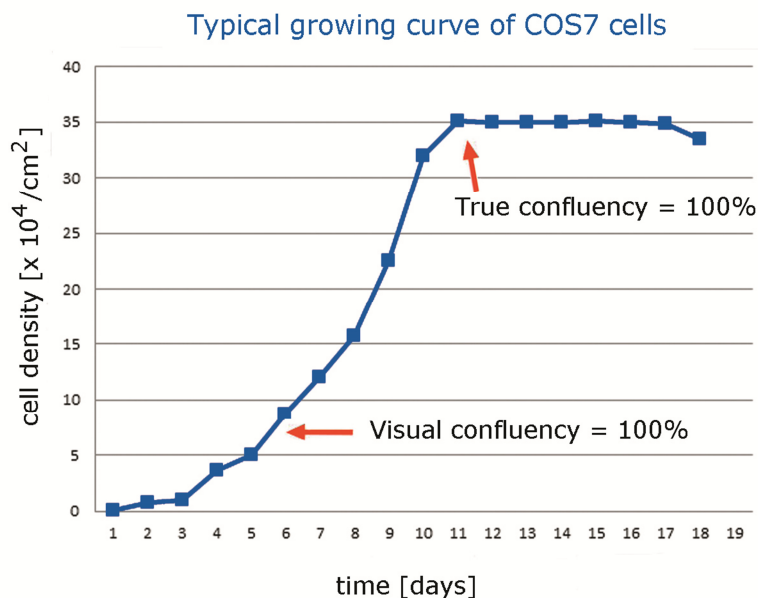
Quantität des Transfektionskomplexes

Um höchste Transfektionseffizienzen erzielen zu können, muss auch die Menge des DNA/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/DOTAP-Verhältnis und die optimale Menge des DNA/Lipid-Komplexes variiert mit der vorhandenen Anzahl der Zellen. Zur Gewährleistung reproduzierbarer Optimierung dieser Parameter muss die Zellzahl und Inkubationsperiode bis zur Lipoplexgabe konstant gehalten werden.

Konfluenz der Zellen

Gewöhnlich wird man beste Ergebnisse für die Transfektion erreichen, wenn die Lipoplexgabe zum Zeitpunkt der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase stattfindet. Dies entspricht in der Regel einer Bedeckung der Wachstumsfläche von 90-100%. Die Zellteilung ist die Basis für erfolgreichen Transport der DNA in den Nukleus. Der Zeitpunkt sollte für jede Zelllinie durch Erstellen einer Wachstumskurve ermittelt werden.



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%.

Serumeffekte

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der vom Serum ausgeübte Effekt auf Transfektionseffizienzen. Die meisten der mit DOTAP transfizierten Zelllinien zeigten bessere Ergebnisse, wenn die Transfektionen bei **Anwesenheit** von Serum durchgeführt wurden. Nichtsdestoweniger zeigen manche Zelllinien ein davon abweichendes Ergebnis. Demgemäß kann die Transfektion mit DOTAP auch ohne Serum, unter serumreduzierten (z.B. 5% Serum) oder unter Totalmedium-Bedingungen (z. B. 10% Serum) durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu ist während der **Komplexbildung** zwischen DOTAP und DNA die Anwesenheit von Serum **absolut zu vermeiden**. Das Serum ist in der Lage, die Komplexbildung zu inhibieren. Ist jener Komplex erst einmal gebildet, spielt ein Kontakt mit Serum keine Rolle.

3.2 Weitere Optimierungsparameter

Folgende Parameter können bei weiterer schrittweise Optimierung zu noch besseren Ergebnissen führen.

Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen

Die zu transfizierenden Zellen können über einen Zeitbereich von 3-72 Stunden dem Transfektionskomplex ausgesetzt werden, wobei aber üblicherweise ein Bereich von 3-10 Stunden völlig ausreichend ist. Die beste angewandte Transfektionszeit hängt von der Sensitivität der Zellen ab. Bei sehr empfindlichen und/oder schnell proliferierenden Zellen wirkt sich nach der Transfektion die Zugabe von frischem komplettem Medium oder der Ersatz des alten durch frisches komplettes Kulturmedium günstig aus.

Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses

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

4. Up- und Downscale

In der Tabelle sind die verschiedenen Reagenzmengen für jeweilige Kulturgefäße angegeben (in Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte für ein Standardprotokoll).

	Adhärente Zellen (Subkultivierung am Tag vor der Transfektion)			Suspensionszellen
Durchmesser der Kulturschale	35 mm	60 mm	100 mm	
Zellzahl pro Schale* [x 10 ⁶]	30-60% reale Konfluenz am Tage der Transfektion			
	0.25-1.0 (0.5)	0.6-2.4 (1.2)	1.5-6.0 (2.5)	0.5 – 3.0 x 10 ⁵ /ml
Mediumsvolumen pro Kulturschale	2 ml	5 ml	12 ml	2-5 ml
Nukleinsäuremenge	ca. 2.5µg	ca. 5µg	ca. 7.5µg	ca. 5 µg
Endvolumen der Nukleinsäurelösung	100 µl	200 µl	300 µl	100 µl
Startmenge an DOTAP-Transfektionsreagenz	16 µl	32 µl	48 µl	32 µl
Endvolumen der DOTAP/ serumfreies Medium Lösung	100 µl	200 µl	300 µl	100 µl

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

5. Sonstiges

5.1 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.

5.2 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*