

INSECTOGENE

Das hocheffiziente Transfektionsreagenz für Insektenzellen

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

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
INSECTOGENE	T030-1.0	1.0 ml
INSECTOGENE	T030-2.0	2 x 1.0 ml
INSECTOGENE	T030-5.0	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 Transfektionsreagenz INSECTOGENE besteht aus einer wässrigen Formulierung von positiv geladenen Lipiden mit einer Gesamtkonzentration von 1 mg/ml. Es wurde speziell für die optimale liposomen-vermittelte Transfektion von Insektenzellen entwickelt. Mit INSECTOGENE sind wesentlich höhere Transfektionseffizienzen an Insektenzellen erreichbar als mit anderen Reagenzien wie z.B. Ca-Phosphat, DEAE-Dextran.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Qualitätskontrolle	3
1.3 Erläuterungen	3
Lagerung	3
Zustand der Zellen	3
Qualität der Nukleinsäuren	3
Optimierung	4
2. Arbeitsanleitung – ein allgemeines Standardprotokoll -	4
3. Arbeitsanleitung – ein Beispielprotokoll für die Baculovirus-Expression -	5
3.1 Co-Transfektion von Sf9 Zellen mit INSECTOGENE	5
Materialien	5
Prozedur	6
Bemerkungen zum Beispielprotokoll.....	6
4. Optimierung	7
4.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter	7
Verhältnis von DNA bzw. RNA zu INSECTOGENE.....	7
Quantität des Transfektionskomplexes	7
Serumeffekte.....	7
4.2 Weitere Optimierungsparameter	7
Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen.....	7
Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses	8
Konfluenz der Zellen	8
Pluronic F68.....	8
5. Sonstiges.....	8
5.1 Wichtige Informationen	8
5.2 Gewährleistung	8

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von Insektenzellen mit Nukleinsäuren
Formulierung	Kationische Lipide und Colipide 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

INSECTOGENE 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

Benutzen Sie nur Zellen im höchstproliferierenden Zustand (Mittlere-log-Phase = 40-50% reale Konfluenz) mit einer Viabilität > 98%, welche sich in einem maximalen Zeitrahmen von 24 Stunden duplizieren. 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 raten wir nur regelmäßig passagierte Zellen für Transfektionsexperimente zu benutzen. Mikrobielle Kontaminationen, wie z.B. durch Mykoplasmen oder Pilze, können auf dramatische Weise Transfektionsergebnisse negativ beeinflussen. 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 real gezählter Zellzahl. Häufig korreliert eine zu 90-100% bedeckte Wachstumsfläche mit 40-50 % realer Konfluenz.

Bei frisch aufgetauten Zellen entfernen Sie bitte jegliches DMSO ca. 2 h vor dem Beginn der Transfektionsprozedur. Benutzen Sie keine Zellen, die schon länger als 3-4 Monate kultiviert wurden. Insektenzellen verlieren zunehmend die Fähigkeit durch einen Virus infiziert zu werden, obwohl sie unverändert lebensfähig und gesund aussehen. Bewahren Sie die Zellkultur-Platten bzw. Flaschen bei 27°C in einer CO₂-freien Atmosphäre auf. Halten Sie während des Transfektionsprozesses die Zellen immer in feuchter Umgebung.

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.

Qualität der Nukleinsäuren

Die DNA bzw. RNA sollte zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von sehr hoher Reinheit sein. Die gereinigte DNA bzw. RNA sollte frei von Cäsium- und Endotoxin-Rückständen sein. Die DNA bzw. RNA sollte vor deren Gebrauch zur Komplexbildung mit INSECTOGENE

nicht länger als 30 min als Lösung mit serumfreiem Medium aufbewahrt werden. Die dabei stattfindende Adsorption der DNA bzw. RNA am Behältermaterial kann einen Abfall der Transfektionseffizienz verursachen.

Optimierung

INSECTOGENE besitzt normalerweise einen breiten Effizienzbereich, trotzdem raten wir zur jeweiligen Optimierung des Transfektionsprotokolls bezüglich der Kombination DNA bzw. RNA und verwendeter Zelllinie. Jede Zelllinie zeigt charakteristische optimale DNA- bzw. RNA-Lipid-Mengenverhältnisse, sogar das Format der Zellkulturplatten zeigt Einflüsse auf diese Verhältnisse sowie auf zu verwendende Absolutmengen der Reagenzien (hier spielt die unterschiedlich starke Adsorption am Behältermaterial aufgrund unterschiedlicher Oberflächendimensionen eine Hauptrolle). Zudem sollte man niemals Protokolle, die mit anderen Transfektionsreagenzien durchgeführt werden, direkt auf INSECTOGENE übertragen.

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 im Kapitel „Optimierung“ gegeben.

2. Arbeitsanleitung – ein allgemeines Standardprotokoll –

		Adhärente Zellen (Subkultivierung am Tag vor der Transfektion! Je nach Zelltyp 18-24 h Inkubation)			Suspensionszellen (am Tag der Transfektion)
1.	Durchmesser der Kulturschale	35 mm	60 mm	100 mm	
	Zellzahl pro Schale* [x 10⁶]	30-60% reale (ca. 90-100% optische) Konfluenz am Tage der Transfektion			
		0.25-1.0 (0.5)	0.6-3.0 (1.2)	1.5-6.0 (2.5)	0.5 - 3.0 x 10 ⁵ /ml
	Mediumsvolumen pro Kulturschale	1.5 ml	5 ml	12 ml	2-5 ml
2.	DNA- bzw. RNA-INSECTOGENE-Mischung herstellen.				
2a.	Nukleinsäuremenge	1-3 µg (2.5)	2-6 µg (5)	3-9 µg (7.5)	2-6 µg (5)
	Endvolumen der Nukleinsäure / Medium-Lösung (serum-+antibiotikafrei)	50 µl	100 µl	150 µl	100 µl
2b.	Menge an INSECTOGENE-Transfektionsreagenz	3-26 µl (16)	6-52 µl (32)	9-78 µl (48)	6-52 µl (32)
	Endvolumen der INSECTOGENE / Medium-Lösung (serum-+antibiotikafrei)	50 µl	100 µl	150 µl	100 µl

3a.	DNA- bzw. RNA (2a)-Lösungen zu INSECTOGENE (2b)-Lösungen bei Raumtemperatur geben (nicht umgekehrt), vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und für 15-20 min inkubieren.			
3b.	Während Komplexbildung entfernen des Mediums, waschen der Zellen mit frischem Medium (antibiotikafrei, wahlweise mit oder ohne Serum)			
	Zugabemenge an frischem Medium	ca. 1.0 ml	ca. 2.5 ml	ca. 4.0 ml
4.	Zugabe der DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplexlösung zu den Zellen und Inkubation für 3-10 h im Inkubator.			
5.	Anschließend der Austausch des Transfektionsmediums mit komplettem Medium (Volumen siehe 1.)			
6.	Expressionsanalyse nach 24-72 h, je nach Zelltyp und Promoteraktivität.			

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

Angegeben sind die verschiedenen Reagenzmengen für jeweilige Kulturgefäße. In Rundklammern sind die vorgeschlagenen Startwerte für die Optimierung angegeben. Wenn Sie die in Klammern in der Tabelle angegebenen Startwerte dafür anwenden, wird der Optimierungsaufwand minimiert.

3. Arbeitsanleitung – ein Beispielprotokoll für die Baculovirus-Expression -

3.1 Co-Transfektion von Sf9 Zellen mit INSECTOGENE

Es handelt sich hier um ein Protokoll für Sf9 Zellen, welches exemplarisch für das Baculovirus Expressionssystem (BES) ist. Eine Anpassung bei spezifischen Anwendungen des Kunden wird für alle Fälle empfohlen (DNA/Lipid-Verhältnis-Optimierung, d.h. optimale DNA-Menge und diesbezügliche optimale Lipidmenge).

Materialien

- Sf9 Zellen (verwenden Sie für jede Transfektion $2.0-3.0 \times 10^6$ Insekten-Zellen pro 60 mm Petrischale bzw. entsprechend angepasst an jeweiliges Plattenformat und Zellart.
- Sf 900II (Invitrogen) Insektenzellen-Medium oder jegliches äquivalentes Medium wie z.B. Grace´s Insektenzellen-Medium oder ExCell 420 (JRH Biosciences)
- Optional fötales Kälberserum
- 60 mm für Zellkultur geeignete Petrischalen (Titerplatten)
- Sterile Röhrchen
- Linearisierte virale DNA der Konz. $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)
- Rekombinantes Transferplasmid der Konz. $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in TE (für den Fall der Genexpression kloniert im Baculovirus Transfervektor)
- Sterile Pipettentips unterschiedlicher Größen
- Inversmikroskop, Schüttler (nicht kreisförmig)
- 27°C Inkubator

Prozedur

1. Säen Sie $2.0\text{-}3.0 \times 10^6$ Zellen in einer 60 mm Petrischale für jede Transfektion aus. Schütteln Sie vorsichtig die Platten ohne Kreisbewegung zur Bildung einer gleichmäßigen Monolayer, nachdem die Zellen in die Schalen pipettiert wurden (Die Platten nicht rotieren, da sich sonst die Zellen im Zentrum ansammeln!).
2. Lassen Sie die Zellen komplett am Untergrund festsetzen (30 min - 4 h bei 27°C). Die resultierende Konfluenz der Zellen sollte bei ca. 50% liegen.
3. Verifizieren Sie anhand eines Inversmikroskops, ob sich alle Zellen am Untergrund festgesetzt haben. Dann sind die Zellen für die Transfektion geeignet.
4. Für jede Co-Transfektion bereiten Sie folgende Transfektionslösung in einem 1.5 ml sterilem Röhrchen:
Mischen Sie $x \mu\text{l}$ (total $0.84 \mu\text{g}$) linearisierte virale DNA, $y \mu\text{l}$ (total $4.2 \mu\text{g}$) rekombinantes Transferplasmid mit serum- und antibiotikafreiem Medium auf ein Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$.

Optional:

Positive Transfektionskontrolle: Verwenden Sie $4.2 \mu\text{g}$ Transfektionskontrollplasmid (β -Galaktosidase- oder β -Glucuronidase-kodierend) anstelle von rekombinantem Transferplasmid. Dies erzeugt Plaques von erfolgreich transfizierten Zellen über X-Gluc- oder X-Gal-Färbung.

Negative Transfektionskontrolle: Verwenden Sie eine entsprechende Menge an Medium anstelle von rekombinantem Transferplasmid. Damit kann der Hintergrundwert bestimmt werden, der aus der nicht-rekombinanten Nukleinsäure (von übriger ungeschnittener Nukleinsäure stammend) resultiert.

5. Für jede Transfektion mischen Sie $100\text{-}x \mu\text{l}$ serum- und antibiotikafreies Medium mit $x \mu\text{l}$ INSECTOGENE. Als Startwert für eine Optimierung können $32 \mu\text{l}$ INSECTOGENE eingesetzt werden.
6. Geben Sie nun unmittelbar die DNA-Lösung mit der INSECTOGENE-Lösung zusammen, mischen vorsichtig und inkubieren Sie 15-20 min bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie während der Inkubation das Medium von den Zellen und waschen Sie die Zellen in den jeweiligen Kulturgefäßen 2-mal mit 2 ml antibiotikafreiem Medium. Geben Sie acht, dass der Zellmonolayer nicht zerstört wird, dass die Sterilität gewahrt bleibt und der Monolayer nicht austrocknen kann. Nach dem zweiten Waschen fügen Sie sehr vorsichtig zum Zellmonolayer 2.5 ml antibiotikafreies Medium hinzu (es kann optional auch serumhaltiges Medium eingesetzt werden).
8. Nach der Inkubation wird die Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Nach 3-10 h geben Sie 2.5 ml serum- and antibiotikahaltiges (komplettes) Medium zu den Zellen (optional Entfernung der Transfektionslösung bei empfindlichen Zellen). Inkubieren Sie 24-72 h weiter bei 27°C.
9. 24-72 h nach Transfektionsstart können Sie das Virus über das Zellkulturmedium ernten.

Bemerkungen zum Beispielprotokoll

- Die optimale Exposition des Transfektionsgemisches hängt von der Sensitivität der transfizierten Zelllinie ab. Bei hoher Sensitivität ist die Entfernung des Transfektionsgemisches mit zweimaligem Waschen der Zellen vor Zugabe des kompletten Mediums und die Kultivierung für 72 Stunden (siehe Punkt 8.) ratsam.
- Die Zellen können auch visuell auf erfolgreiche Transfektion überprüft werden: Das virale Gen kann manchmal in Form der in den transfizierten Zellen eingeschlossenen Viren (Kristalle) bei 250-400 facher Vergrößerung beobachtet werden. Ein weiteres positives Merkmal ist eine Vergrößerung des Zelldurchmessers um 25-50% und Zell-Lyse.
- Virus Plaque-Assay: Das Infektionspotential der Baculovirus-Stock-Lösung kann durch Prüfung und Zählung der in der immobilisierten Monolayerkultur entstandenen Plaques bestimmt werden. Es sind viele Variationen dieser Technik je nach Zelllinie, Art des Rekombinant-Konstruktes und der Identifikationsmethodik im Gebrauch. Gebräuchliche Identifikationsmethoden sind X-Gal- oder X-Gluc- oder Neutralrot Färbung. Protokolle hierfür sind über entsprechende BES-Hersteller-Manuals erhältlich.

4. Optimierung

4.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter

Verhältnis von DNA bzw. RNA zu INSECTOGENE

Die wichtigste Optimierungseinflussgröße ist das Verhältnis von DNA bzw. RNA zu INSECTOGENE.

Für eine erfolgreiche Transfektion ist eine positive Überschussladung des DNA- bzw. RNA-INSECTOGENE-Komplexes unbedingt notwendig. Das dafür optimale DNA- bzw. RNA-INSECTOGENE-Verhältnis hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. Die INSECTOGENE-Menge kann im Bereich von 2-12 µl pro µg Nukleinsäure optimiert werden. Die maximale INSECTOGENE Konzentration sollte nicht über 35 µl/ml Kulturmedium hinausgehen. Die Nukleinsäuremenge kann in einem Bereich von 1.0-3.0 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 Effizienzverringering.

Beachte: Das optimale DNA- bzw. RNA-INSECTOGENE-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.

Serumeffekte

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der vom Serum ausgeübte Effekt auf Transfektionseffizienzen. Die meisten der mit INSECTOGENE 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 INSECTOGENE auch ohne Serum, unter serumreduzierten (z.B. 5% Serum) oder unter Totalmedium-Bedingungen (z.B. 10% Serum) durchgeführt werden.

Beachte: Während der **Komplexbildung** zwischen INSECTOGENE 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.

Die optimalen Verhältnisse von DNA bzw. RNA zu INSECTOGENE und der DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex-Konzentrationen können mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen variieren.

Die Optimierung dieser wichtigsten Parameter sollte zu sehr zufrieden stellenden Ergebnissen führen.

4.2 Weitere Optimierungsparameter

Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen

Die zu transfizierenden Zellen können über einen Zeitbereich von 3-72 h dem Transfektionskomplex ausgesetzt werden, wobei aber üblicherweise ein Bereich von 3-10 h 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.

Konfluenz der Zellen

Gewöhnlich wird man beste Ergebnisse bei einer Bedeckung der Wachstumsfläche von 90–100% erreichen. Entscheidend dabei ist die Transfektion während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen, da die Zellteilung Basis für erfolgreichen Transport der DNA in den Nukleus ist. Dies muss auf jede Zelllinie angepasst sein.

Beachte: 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%.

Pluronic F68

Die Zugabe von Pluronic F68 oder ähnlicher Agenzien zum Insektenzellkulturmedium kann sich sehr positiv auf den Transfektionserfolg auswirken, denn jene Substanzen sind in der Lage, die empfindliche Insektenzellmembran zu stabilisieren.

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*