

METAFECTENE[®] FluoR

Das Transfektionsreagenz für die Visualisierung
der Lipofektion mit DNA

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

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
METAFECTENE [®] FluoR	T050-0.5	0.5 ml
METAFECTENE [®] FluoR	T050-1.0	1.0 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: 4°C

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label

Liposomenformulierungen wie das METAFECTENE[®] FluoR 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[®] FluoR ist ein fluoreszenz-gelabeltes Reagenz für die Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA. Dabei eröffnet METAFECTENE[®] FluoR mit seinem Rhodamin B-Label Möglichkeiten, den Transfektionsprozess und -Erfolg per Fluoreszenz-Mikroskopie oder FACS zu beobachten.

Das für optimale Mikroskopierbarkeit der Zellen entwickelte Protokoll vereint dabei eine für die Beobachtung der Zellmorphologie geeignete Zelldichte mit guter Transfektionseffizienz.

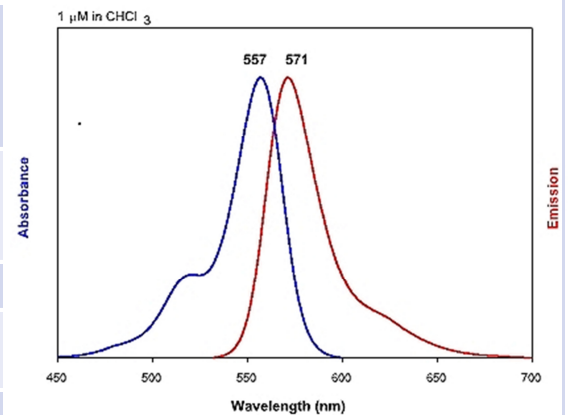
Inhalt

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. Transfektionsprotokoll	4
2.1 Anmerkungen zum Protokoll	4
2.2 Standardprotokoll	4
Aussäen der Zellen	4
Bildung und Zugabe des Lipoplexes	5
Auswertung	5
2.3 Transfer auf andere Formate	6
2.4 Optimierung des Protokolls	6
Optimale Zelldichte	6
Optimierungsprotokoll	6
3. Sonstiges	8
3.1 Wichtige Informationen	8
3.2 Gewährleistung	8

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA; optische Verfolgung des Lipoplex während und nach dem Transfektionsvorgang
Formulierung	Kationische Lipide mit Kolipiden in Wasser; kovalent gebundenes Rhodamin B-Label ($Ex_{max} = 557 \text{ nm}$, $Em_{max} = 571 \text{ nm}$)
Sterilität	getestet
Assays	1 ml Reagenz bis zu 2500 (24-Well) oder 625 (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

Lagerung

METAFECTENE® Fluor 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 METAFECTENE® Fluor 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 ausgeschlossen sein.

Qualität des genetischen Materials

Die eingesetzten Nukleinsäuren sollten zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von größtmöglicher Reinheit sein. Endotoxine zum Beispiel vermindern die Transfektionseffizienz erheblich.

2. Transfektionsprotokoll

2.1 Anmerkungen zum Protokoll

Der Ziel- bzw. Wirkort von DNA (z.B. eines Plasmids) bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen ist der Zellkern. Das Erreichen dieses Ziels wird vor allem durch zwei Barrieren erschwert (neben vielen anderen): Zellmembran und Kernmembran. Das Reagenz bewirkt eine Überwindung der Zellmembran, da der aus DNA und Reagenz gebildete Komplex (Lipoplex) aktiv per Endocytose in das Cytoplasma eingebracht wird. Die Kernmembran kann jedoch vom Lipoplex nicht aktiv überwunden werden, weshalb die Teilung der transfizierten Zelle entscheidend ist; nur während der Zellteilung öffnet sich die Kernmembran und die DNA kann in den Zellkern gelangen.

Hieraus ergibt sich, dass die maximal erreichbare Transfektionseffizienz steigt, je größer die Zellteilungsrate während der Behandlung der Zellen mit dem Lipoplex ist. Die Zellteilungsrate wiederum wird bei adhärennten Zellen vor allem durch ihre Zelldichte (Zellen/cm²) bestimmt. Je größer die Zelldichte, desto größer die Proliferation, desto größer die maximal erreichbare Transfektionseffizienz.

Bei der Mikroskopie sind jedoch häufig Zelldichten gewünscht, die weit kleiner sind als die Zelldichte, bei der das Proliferationsoptimum von adhärennten Zellen liegt. Dies ist nötig, da sich bei geringer Zelldichte die Morphologie einzelner Zellen gut beobachten lässt.

Ein Transfektionsprotokoll bei geringen Zelldichten kann daher stets nur einen Kompromiss der beiden Parameter Mikroskopierbarkeit und Transfektionseffizienz darstellen.

Das Hauptaugenmerk bei der Entwicklung des Protokolls von METAFECTENE® Fluor liegt auf exzellenter Mikroskopierbarkeit. Die maximal erreichbare Transfektionseffizienz wird im hier angewendeten Protokoll aufgrund der niedrigen Zelldichten durch die verhältnismäßig kleine Proliferationsrate der Zellen begrenzt.

Für einen guten Transfektionserfolg sollte daher die Zelldichte für die eingesetzte Zellart und die Anforderungen des Experiments optimiert werden. Dies wird im Kapitel 2.4 „Optimierung des Protokolls“ näher erläutert.

2.2 Standardprotokoll

Die folgende Anleitung bezieht sich auf ein Well mit 1 cm² Wachstumsfläche (entspricht dem Well einer 48-Well-Platte). Eine Tabelle mit Angaben für andere Well-Formate befindet sich in Kapitel 2.3.

Das nachfolgende Protokoll nennt empfohlene Startwerte für die Zellkonzentration, die Plasmidmenge und das DNA:Lipid-Verhältnis [$\mu\text{g}:\mu\text{l}$]. Alle Parameter sollten für jede Zelllinie oder Zellart optimiert werden. Dies wird im Kapitel 2.4 „Optimierung des Protokolls“ beschrieben.

Aussäen der Zellen

Am **1. Versuchstag** werden in ein Well einer 48-Well-Platte 250 μl Zellsuspension mit einer Konzentration von $0.5 - 1.0 \times 10^5$ Zellen/ml in komplettem Kulturmedium gegeben.

Danach folgt eine Inkubationszeit von 24 h bei Standard-Kulturbedingungen für die verwendeten Zellen (z.B. 37°C in CO₂-haltiger Atmosphäre).

Bildung und Zugabe des Lipoplexes

Vorbereiten der Lösungen

Am **2. Versuchstag** werden vor der Lipoplexbildung das METAFECTENE® FluoR und die DNA-Lösung auf Raumtemperatur gebracht und jeweils kurz gevortext.

Die folgenden Lösungen werden in sterilen, für die Zellkultur geeigneten Gefäßen (Tubes, Reaktionsgefäße, Well-Platten; vorzugsweise aus Polypropylen) hergestellt. **Legen Sie dabei stets das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA-Lösung nicht direkt mit der Gefäßoberfläche in Kontakt kommen:

DNA-Lösung: 0.05 – 0.2 µg DNA (Startwert: 0.1 µg) auf
15 µl serum- und antibiotikafreies Medium

Lipid-Lösung: 0.2 – 1.3 µl METAFECTENE® FluoR (Startwert: 0.5 µl) auf
15 µl serum- und antibiotikafreies Medium

Die angegebenen Mengen von DNA und Lipid ergeben mögliche DNA:Lipid-Verhältnisse [µg/µl] von 1:4 bis 1:6,5. Das empfohlene Startverhältnis beträgt 1:5 µg:µl.

Lipoplexbildung

Geben Sie die DNA-Lösung zu der Lipid-Lösung und mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Bitte beachten Sie die Reihenfolge der Lösungszugabe:
Die DNA-Lösung wird zur METAFECTENE® FluoR-Lösung zugegeben!

Inkubieren Sie die Lösung für 15–20 min bei Raumtemperatur.

Zugabe des Lipoplexes

30 µl der Lipoplexlösung werden zu den angewachsenen Zellen in das Kulturmedium zugegeben und durch Schwenken des Kulturgefäßes gemischt.

Starke Scherkräfte können den DNA-Lipid-Komplex (Lipoplex) zerstören!

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

Mediumwechsel 5 h nach Lipoplexzugabe

5 h nach der Zugabe des Lipoplexes wird das gesamte Medium gegen frisches komplettes Kulturmedium getauscht.

Auswertung

Das Rhodamin-Label macht eine Visualisierung des Transfektionsvorgangs, sowie Untersuchungen zur Lokalisierung und Aufnahme des Lipoplexes möglich. Zusätzlich kann METAFECTENE® FluoR in Verbindung mit einer in geeigneter Weise fluoreszenzgelabelten DNA zur Aufklärung der Lokalisierung des eingebrachten genetischen Materials, des Genproduktes und des Lipoplexes dienen.

Der Zeitpunkt der Auswertung sollte je nach Untersuchungsgegenstand gewählt werden. Grundsätzlich ist die mikroskopische Beobachtung ab der Lipoplexzugabe möglich (z.B. Live Imaging), wobei zu beachten ist, dass der erste Mediumwechsel – wie im Protokoll angegeben – erst 5 h nach der Lipoplexzugabe erfolgen darf. Andernfalls ist mit deutlich verringerten Transfektionsraten zu rechnen.

Die höchsten exprimierten Proteinmengen werden häufig nach 48 h erhalten. Der optimale Zeitpunkt wird durch die Eigenschaften des Zelltypus und des Expressionsproduktes sowie der Promotoraktivität bestimmt.

Um bei Durchlicht- oder Fluoreszenzaufnahmen eine optimale Bildqualität zu erhalten, kann das Medium bei der abschließenden Auswertung gegen 1× PBS getauscht werden.

2.3 Transfer auf andere Formate

Format	Wachstumsfläche [cm ²]	Zell-suspension [µl]	Medium f. Lipoplex-Bildung [µl]	METAFECTENE® Fluor [µl]	DNA Menge [µg]	Lipoplex Volumen [µl]
96 Well	0.3	100	2× 10	0.1 – 0.65 (0.25)	0.025–0.1 (0.05)	20
48 Well	1.0	250	2× 15	0.2 – 1.3 (0.5)	0.05 – 0.2 (0.1)	30
24 Well	1.9	500	2× 30	0.4 – 2.6 (1.0)	0.1 – 0.4 (0.2)	60
12 Well	3.6	1000	2× 50	0.8 – 5.2 (2.1)	0.2 – 0.8 (0.4)	100
6 Well	9.0	2000	2× 100	1.6 – 10.4 (4.2)	0.4 – 1.6 (0.8)	200
60 mm Dish	22	5000	2× 250	3.9 – 26.0 (10.4)	1.0 – 4.0 (2.0)	500
100 mm Dish	60	15000	2× 750	10 – 65 (26)	2.5 – 10 (5.0)	1500

In Klammern sind die empfohlenen Startwerte für Reagenzvolumen und DNA-Menge angegeben.

2.4 Optimierung des Protokolls

Optimale Zelldichte

Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Lipoplexzugabe beeinflusst die erreichbare Transfektionseffizienz stark (siehe Kapitel 2.1). Daher sollte als erster Parameter die Zellkonzentration der Zellsuspension, die am 1. Tag ausgesät wird, optimiert werden.

Dabei gilt es, den besten Kompromiss aus Beobachtbarkeit (geringe Zelldichte vorteilhaft) und Transfektionsrate (hohe Zelldichte vorteilhaft) zu finden. Die ausgesäte Zellkonzentration sollte also so groß wie möglich sein und dabei noch die Auswertung zum gewünschten Zeitpunkt erlauben.

Das Aussäen einer Zellsuspension mit der Konzentration von $0.5 - 1.0 \times 10^5$ Zellen/ml führt bei vielen Zellen zu einer Bedeckung der Wachstumsfläche nach 2–3 Tagen. Von diesem empfohlenen Startbereich ist je nach Anforderung im Experiment abzuweichen.

Optimierungsprotokoll

Im folgenden Optimierungsprotokoll werden Zellen in neun Kulturgefäße (Wells oder Dishes) mit drei DNA-Mengen (I, II und III) und drei verschiedenen DNA:Lipid-Verhältnissen (1:4 / 1:5 / 1:6.5 [µg:µl]) transfiziert. Um dies zu erreichen, werden drei verschiedene Lipoplex-Lösungen mit den genannten DNA:Lipid-Verhältnissen hergestellt und davon drei verschieden große Volumina auf je drei Wells verteilt.

Die folgende Tabelle zeigt die sich daraus ergebenden neun Lipoplex-Zusammensetzungen am Beispiel einer Optimierung für das 48-Well-Format:

		DNA:Lipid-Verhältnis in µg:µl		
		➔		
DNA-Menge ↓		1:4, 0.05 µg	1:5, 0.05 µg	1:6.5, 0.05 µg
		1:4, 0.1 µg	1:5, 0.1 µg	1:6.5, 0.1 µg
		1:4, 0.2 µg	1:5, 0.2 µg	1:6.5, 0.2 µg

Die so ermittelten Optima für DNA-Menge und DNA:Lipid-Verhältnis gilt nur für die Kombination aus gewählter Zellart und Zelldichte.

Aussäen der Zellen

Am 1. Versuchstag wird eine Zellsuspension mit der für die benutzte Zellart ermittelten Konzentration in neun Kulturgefäße ausgesät. Das Volumen der Zellsuspension ist der Tabelle in Kapitel 2.3 zu entnehmen.

Danach folgt eine Inkubationszeit von 24 h bei Standard-Kulturbedingungen für die verwendeten Zellen (z.B. 37°C in CO₂-haltiger Atmosphäre).

Vorbereiten der Lösungen

Vier Reaktionsgefäße (idealerweise aus PP) werden beschriftet mit „DNA-Lösung“, „Lipid 1:4“, „Lipid 1:5“ und „Lipid 1:6,5“.

Danach werden in diesen Gefäßen die DNA-Lösung und drei Lipid-Lösungen angesetzt. Die jeweiligen Volumina für Medium und Reagenz, sowie die einzusetzenden DNA-Mengen, sind für das entsprechende Kulturformat der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Das folgende Beispiel bezieht sich auf Wells einer 48-Well-Platte mit je 1 cm² Wachstumsfläche:

DNA-Lösung: 90 µl serum- und antibiotikafreies Medium und 1.2 µg DNA

Lipid-Lösungen:

1:4 30 µl serum- und antibiotikafreies Medium und 4.8 µl METAFECTENE[®] Fluor

1:5 30 µl serum- und antibiotikafreies Medium und 6.0 µl METAFECTENE[®] Fluor

1:6.5 30 µl serum- und antibiotikafreies Medium und 7.8 µl METAFECTENE[®] Fluor

Format	Wachstumsfläche [cm ²]	Medium für DNA-Lösung [µl]	DNA-Menge [µg]	Medium für Lipid-Lösungen [µl]	Lipidvolumen [µl]		
					1:4	1:5	1:6,5
96 Well	0.3	60	0.6	3× 20	2.4	3.0	3.9
48 Well	1.0	90	1.2	3× 30	4.8	6.0	7.8
24 Well	1.9	180	2.4	3× 60	9.6	12.0	15.6
12 Well	3.6	300	4.8	3× 100	19.2	24.0	31.2
6 Well	9.0	600	9.6	3× 200	38.4	48.0	62.4
60 mm Dish	22	1500	24	3× 500	96	120	156
100 mm Dish	60	4500	60	3× 1500	240	300	390

Lipoplexbildung

Je 30 µl der DNA-Lösung werden zu den drei Lipidlösungen 1:4, 1:5 und 1:6.5 gegeben. Danach wird durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren der Lösung gemischt.

Bitte beachten Sie die Reihenfolge der Lösungszugabe:

Die DNA-Lösung wird zur METAFECTENE[®] Fluor-Lösung zugegeben!

Anschließend werden die Lösungen für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zugabe des Lipoplexes

Es wird nun die Lipoplexlösung zu den neun mit Zellen bewachsenen Kulturgefäßen pipettiert. Aus jeder der drei Lipoplexlösungen 1:4, 1:5 und 1:6.5 werden je drei Volumina zugegeben:

Format	Lipoplexvolumen[μ l]		
	V ₁	V ₂	V ₃
96 Well	5	10	20
48 Well	7.5	15	30
24 Well	15	30	60
12 Well	25	50	100
6 Well	50	100	200
60 mm Dish	125	250	500
100 mm Dish	375	750	1500

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

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*