

# METAFECTENE<sup>®</sup> PRO

Das hocheffiziente Transfektionsreagenz für Säugerzellen

Bestellinformationen, SDB, Publikationen und Anwendungsbeispiele unter [www.biont.com](http://www.biont.com)

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
METAFECTENE <sup>®</sup> PRO	T040-0.2	0.2 ml
METAFECTENE <sup>®</sup> PRO	T040-1.0	1.0 ml
METAFECTENE <sup>®</sup> PRO	T040-2.0	2 × 1.0 ml
METAFECTENE <sup>®</sup> PRO	T040-5.0	5 × 1.0 ml

**Versand:** Bei Raumtemperatur

**Lagerung:** 4°C

**Stabilität:** Haltbar bis: siehe Label

Liposomenformulierungen wie das METAFECTENE<sup>®</sup> PRO 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<sup>®</sup> PRO ist das Transfektionsreagenz der jüngsten Generation, welches neue Maßstäbe in der Säugerzell-Transfektion setzt. Bisherige Daten können belegen, dass mit METAFECTENE<sup>®</sup> PRO im Vergleich mit METAFECTENE<sup>®</sup> mindestens gleichwertige Ergebnisse erzielt werden und gerade bei Zellen mit mäßiger bis schlechter Transfizierbarkeit eine vielfache Effizienzsteigerung erreichbar ist.

## Inhalt

<b>1. Allgemeine Hinweise</b>	<b>3</b>
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	4
Antibiotika	4
Optimierung	4
Stabile Transfektion	4
<b>2. Arbeitsanleitungen</b>	<b>5</b>
2.1 Transfektion von adhärennten Zellen – ein Standardprotokoll für das 12-Well-Format –	5
2.2 Transfektion von Suspensionszellen – ein Standardprotokoll für das 12-Well-Format -	6
2.3 Transfektion von siRNA – ein Optimierungsprotokoll für das 24-Well-Format -	7
2.4 Co-Transfektionsexperimente (siRNA-DNA)	8
<b>3. Optimierung</b>	<b>9</b>
3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter	9
Verhältnis von Nukleinsäure zu METAFECTENE <sup>®</sup> PRO	9
Quantität des Transfektionskomplexes	9
Auszusäende Zellmengen	9
Serumeffekte	9
3.2 Weitere Optimierungsparameter	10
Inkubationszeit des Transfektionskomplexes auf die Zellen	10
Zeitbereich bis zur Bestimmung des Transfektionsergebnisses	10
DNA-Lipid-Komplexbildung mit PBS anstelle von serumfreien Medium	10
3.3 Optimierungsprotokoll	11
Beispiel für das 12-Well-Format	12
<b>4. Up- und Downscale</b>	<b>13</b>
<b>5. Troubleshooting</b>	<b>14</b>
<b>6. Sonstiges</b>	<b>15</b>
6.1 Puffer	15
6.2 Wichtige Informationen	15
6.3 Gewährleistung	15

# 1. Allgemeine Hinweise

## 1.1 Spezifikation

<b>Anwendung</b>	Transfektion von Säugerzellen mit Nukleinsäuren
<b>Formulierung</b>	Kationische Lipide mit Kolipiden in Wasser
<b>Assays</b>	bis zu 1.500 (24-well) oder bis zu 400 (6-well) bei 1 ml Reagenz
<b>Sterilität</b>	getestet
<b>Zellkultur</b>	getestet
<b>Lagerung</b>	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<sup>®</sup> PRO zeigt keine Serum-inhibition und ist damit auch das Reagenz der Wahl für sehr sensitive Zellen.

### Lagerung

METAFACTENE<sup>®</sup> PRO 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 den Komponenten nicht. Im Gegenteil, es kann dadurch eine mit der Zeit sich leicht verändernde Größenverteilung der Liposomen im METAFACTENE<sup>®</sup> PRO 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 oder Pilze, können Transfektionsergebnisse auf dramatische Weise 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 Zellkern stark unterstützt. Die Zellzahl 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). Die siRNA-Transfektion ist in der Regel unabhängig von der Zellteilung und benötigt zum Transfektionsstart im Vergleich zur DNA-Transfektion üblicherweise eine geringere Zelldichte.

## Qualität der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure sollte zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von höchstmöglicher Reinheit sein. Zum Beispiel vermindern Endotoxine erheblich die Transfektionseffizienz. Die Nukleinsäure sollte vor deren Gebrauch zur Komplexbildung mit METAFECTENE<sup>®</sup> PRO nicht länger als 5 min als Lösung in serumfreien Medium aufbewahrt werden. Die dabei stattfindende Adsorption der Nukleinsäure 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

Wo angegeben, sollten Antibiotika vermieden werden, da diese bei Anwesenheit im Transfektionsmedium zum Zelltod führen können.

## Optimierung

METAFECTENE<sup>®</sup> PRO besitzt normalerweise einen breiten Hocheffizienzbereich, trotzdem raten wir zur jeweiligen Optimierung des Transfektionsprotokolls für jede Kombination von Plasmid und Zelllinie. Jede Zelllinie zeigt charakteristische, optimale Nukleinsäure-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.<sup>1</sup>

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

Weiterführende Information erhalten Sie in Kapitel 3.

## 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 Transfektionsprozess wird das Transfektionsmedium durch ein entsprechend dafür gewähltes Medium inklusive Antibiotika ausgewechselt.

---

<sup>1</sup> Vermutlich spielt hier die unterschiedlich starke Adsorption am Behältermaterial aufgrund unterschiedlicher Oberflächendimensionen eine Hauptrolle.

## 2. Arbeitsanleitungen

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

1. Plattieren Sie  $1.0 - 4.0 \times 10^5$  Zellen (Startpunkt  $2.0 \times 10^5$ ) in einer 12-Well-Kulturschale in 1 ml geeignetem vollständigem Wachstumsmedium aus.<sup>2</sup>
2. Inkubieren Sie die Zellen, je nach Zelltyp, für 18–24 h bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bis die Wachstumsfläche zu 90–100% bedeckt ist.
3. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die auf Raumtemperatur temperierten Stocklösungen von METAFECTENE<sup>®</sup> PRO und der DNA bzw. RNA.

**i** Wir raten zuerst mit den im Optimierungsprotokoll angegebenen Startwerten zu beginnen bzw. eine entsprechende Optimierung nach Protokoll durchzuführen.

Verwendeter Begriff RNA bedeutet Einzelstrang-RNA (ssRNA) und nicht siRNA!

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 antibiotikafreies Medium oder 1x PBS  
Lösung **B:** 1.0 – 7.0 µl METAFECTENE<sup>®</sup> PRO auf 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium oder 1x PBS
5. Mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Die Verhältnisse müssen optimiert werden, wie in Kapitel 3 und 4 beschrieben wird. Das DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnis muss stets zwischen 1:2 und 1:7 [µg DNA bzw. RNA : µl METAFECTENE<sup>®</sup> PRO] liegen.

**Bitte beachten Sie im folgenden Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe:** Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lösung zur Transfektionsreagenz-Lösung und nicht umgekehrt!

6. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch **einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren** und inkubieren Sie die Mischung bei Raumtemperatur für 15–20 min.

Scherkräfte können den DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex zerstören!

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 CO<sub>2</sub>-Inkubator.<sup>3</sup>
8. Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität je nach Zelltyp und Promotoraktivität 24–72 h nach dem Beginn der Transfektion durch.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> Im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen.

## 2.2 Transfektion von Suspensionszellen – ein Standardprotokoll für das 12-Well-Format -

1. Säen Sie per Well einer 12-Well-Kulturschale  $0.4 - 1.6 \times 10^5$  Zellen in 1 ml eines geeigneten vollständigen Wachstumsmediums aus.
2. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die auf Raumtemperatur temperierten Stocklösungen von METAFECTENE® PRO und der DNA bzw. RNA.
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 antibiotikafreies Medium oder 1x PBS  
Lösung **B:** 1.0 – 7.0 µl METAFECTENE® PRO auf 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium oder 1x PBS
4. Mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Die Verhältnisse müssen optimiert werden, wie in Kapitel 3 und 4 beschrieben wird. Das DNA- bzw. RNA-Lipid-Verhältnis muss stets zwischen 1:2 und 1:7 [µg DNA bzw. RNA : µl METAFECTENE® PRO] liegen.

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

5. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch **einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren** und inkubieren Sie die Mischung bei Raumtemperatur für 15–20 min.

Scherkräfte können den DNA- bzw. RNA-Lipid-Komplex zerstören!

6. 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 CO<sub>2</sub>-Inkubator.<sup>4</sup>
7. 24–72 h nach dem Beginn der Transfektion – je nach Zelltyp und Promotoraktivität – zentrifugieren Sie die Zellen und führen den Reporter-Gen-Aktivitätstest durch.

---

<sup>4</sup> Im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen.

## 2.3 Transfektion von siRNA – ein Optimierungsprotokoll für das 24-Well-Format –

1. Plattieren Sie  $0.1 - 1.0 \times 10^5$  Zellen in einer 24-Well-Kulturschale in 0.5 ml geeignetem, frischem und vollständigem Wachstumsmedium aus. Für die meisten Zelltypen ist der angegebene Zellmengenbereich ausreichend zur Erlangung der notwendigen optischen Konfluenz von 30–50%.<sup>5</sup>
2. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die auf Raumtemperatur temperierten Stocklösungen von METAFECTENE<sup>®</sup> PRO und der siRNA.
3. Stellen Sie folgende Lösungen in einer 96-Well-Platte (cell culture grade) oder in anderen Gefäßen aus Glas, Polypropylen oder Polystyrol (vorzugsweise Polypropylen) her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und siRNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen:

Gefäßaufschrift	R1	R2	R3	R4
<b>Volumen serumfreies Medium oder 1x PBS</b>	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
<b>siRNA</b>	0.1 µg (ca. 7.5 pmol)	0.2 µg (ca. 15 pmol)	0.5 µg (ca. 40 pmol)	2 µg (ca. 150 pmol)

Gefäßaufschrift	M1	M2	M3	M4
<b>Volumenzugabe serumfreies Medium oder 1x PBS</b>	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
<b>METAFECTENE<sup>®</sup> PRO</b>	0.5 µl	1 µl	2.5 µl	10 µl

4. Mischen Sie die Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

**Bitte beachten Sie im folgenden Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe:** Geben Sie die siRNA-Lösung zur Transfektionsreagenz-Lösung und nicht umgekehrt!

5. Vereinigen Sie die Lösungen R1 + M1, R2 + M2, R3 + M3, R4 + M4, mischen Sie jeweils durch **einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren** und inkubieren Sie die Mischungen bei Raumtemperatur für 15–20 min.
6. Geben Sie die siRNA-Lipid-Komplexlösung so schnell wie möglich nach der Inkubationszeit tropfenweise zu den Zellen, mischen Sie durch **äußerst vorsichtiges Schwenken des Gefäßes** und inkubieren Sie bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator.
7. Testen Sie in Abhängigkeit vom Zelltypus, der Stabilität der siRNA und des Zielproteins die Knock-down-Rate des Zielgens innerhalb von 24–72h nach dem Beginn der Transfektion. Ein Austausch des siRNA-Transfektionsmediums mit frischem komplettem Medium ist während dieser Zeit nicht notwendig.<sup>6</sup>

Zur Optimierung der Knock-down Effizienz muss gegebenenfalls das siRNA-Lipid-Mengenverhältnis zueinander noch variiert werden!

- 
- 5 Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und -größe ab. Eine Mengenoptimierung z.B. über die Erstellung einer Wachstumskurve ist eventuell notwendig. Behalten Sie immer dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei.
  - 6 Im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen. Falls während des Transfektionsprozesses serumfreies Medium verwendet wurde, tauschen Sie die siRNA-Transfektionslösung innerhalb 3–6 h nach Transfektionsstart mit komplettem Medium aus.

## 2.4 Co-Transfektionsexperimente (siRNA-DNA)

METAFACTENE<sup>®</sup> PRO ist hervorragend in der Lage, siRNA zusammen mit plasmidischer DNA in Zellen zu transfizieren (sog. Co-Transfektion). Üblicherweise benötigt die Plasmidtransfektion eine höhere Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion als die siRNA Transfektion zur Erlangung optimaler Ergebnisse. Bitte beachten Sie folgende Ratschläge:

1. Plattieren Sie die Zellen gemäß Anleitung (Kapitel 2.1 Punkt 1) für die DNA Transfektion am Tag vor der Transfektion aus.
2. Sie müssen das gleiche Verhältnis von *gesamter* Nukleinsäuremenge zu Lipidmenge beibehalten, wie Sie es für die siRNA-Menge allein eingestellt hatten. D.h. falls Sie die Gesamtmenge an Nukleinsäure [ $\mu\text{g}$ ] erhöhen, müssen Sie ebenso die METAFACTENE<sup>®</sup> PRO-Menge [ $\mu\text{l}$ ] proportional zum vorher eingestellten Verhältnis erhöhen.
3. Verwenden Sie auf jeden Fall ein minimales Verhältnis von Nukleinsäure [ $\mu\text{g}$ ] zu METAFACTENE<sup>®</sup> PRO [ $\mu\text{l}$ ] von 1:2.



# 3. Optimierung

## 3.1 Die wichtigsten Optimierungsparameter

### Verhältnis von Nukleinsäure zu METAFECTENE® PRO

Der wichtigste Optimierungsparameter ist das Verhältnis von Nukleinsäure zu METAFECTENE® PRO.

Für eine erfolgreiche Transfektion ist eine positive Überschussladung des Nukleinsäure-METAFECTENE® PRO-Komplexes notwendig. Das dafür optimale Nukleinsäure-METAFECTENE® PRO-Verhältnis hängt von der jeweiligen Zelllinie ab.

### Quantität des Transfektionskomplexes

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

Das optimale Nukleinsäure-METAFECTENE® PRO-Verhältnis und die optimale Menge des Nukleinsäure-Lipid-Komplexes variiert mit der vorhandenen Anzahl der Zellen. Zur Gewährleistung reproduzierbarer Optimierung dieser Parameter muss die Zellzahl und Inkubationsperiode des Transfektionsprozesses konstant gehalten werden.

### Auszusäende Zellmengen

Bitte beachten Sie hierzu die Ausführungen unter Kapitel 5.

### Serumeffekte

Bislang zeigten mit METAFECTENE® PRO 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® PRO ohne Serum, unter serumreduzierten (z.B. bei 5% Serum) und unter Totalmedium-Bedingungen (10% Serum) durchgeführt werden.

Während der **Komplexbildung** zwischen METAFECTENE® PRO und dem genetischen Material 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 Nukleinsäure zu METAFECTENE® PRO und der Menge des Nukleinsäure-Lipid-Komplexes kann bei verschiedenen Serumkonzentrationen variieren.

Die Optimierung dieser wichtigsten Parameter führt bei Anwendung der Optimierungsanleitung unter Kapitel 3.3 zu absolut befriedigenden Ergebnissen.

## **3.2 Weitere Optimierungsparameter**

### **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.

### **DNA-Lipid-Komplexbildung mit PBS anstelle von serumfreiem Medium**

In vielen Versuchsreihen zeigte sich, dass bei Verwendung von 1x PBS zur Nukleinsäure-Lipid-Komplexbildung anstelle von serum- und antibiotikafreiem Medium besser reproduzierbare und teils auch höhere Transfektionsraten, vor allem bei niedrigen Lipid-Mengen, erzielbar sind. Zur Herstellung siehe Kapitel 6.1.

### 3.3 Optimierungsprotokoll

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



**Im Falle von siRNA-Anwendungen siehe Protokoll unter Punkt 2.3.**

1. Variieren Sie die Menge an METAFECTENE<sup>®</sup> PRO innerhalb des in der Tabelle im Kapitel 4 vorgeschlagenen Intervalls (z.B. 12-Well Format: 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12 µl etc.). 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<sup>®</sup> PRO-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 (Startpunkt  $2.0 \times 10^5$ ) in einer 12-Well-Kulturschale in 1 ml geeignetem vollständigen Wachstumsmedium aus.<sup>7</sup>
2. Inkubieren Sie die Zellen, je nach Zelltyp, für 18–24 h bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bis die Wachstumsfläche zu 90–100% bedeckt ist.
3. Vortexen Sie vor dem Gebrauch sanft die auf Raumtemperatur temperierten Stocklösungen von METAFECTENE<sup>®</sup> PRO und DNA bzw. RNA.
4. Pipettieren Sie 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium oder 1x PBS 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 – C4und 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<sup>®</sup> PRO in D1 – D4
  - 2 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl METAFECTENE<sup>®</sup> PRO in E1 – E4
  - 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl METAFECTENE<sup>®</sup> PRO in F1 – F4und mischen Sie die Lösungen vorsichtig durch einmaliges Auf- und Abpipettieren.

**Bitte beachten Sie im folgenden Schritt die Reihenfolge der Lösungszugabe:** Geben Sie die DNA- bzw. RNA-Lösung zur Transfektionsreagenz-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 Sie jeweils durch **einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren** (Scherkräfte können den Lipoplex zerstören!) und inkubieren Sie die Mischungen 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 CO<sub>2</sub>-Inkubator.<sup>8</sup>
8. Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität je nach Zelltyp und Promotoraktivität 24–72 h 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 übliche Formate.

---

<sup>7</sup> 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.

<sup>8</sup> Im Falle äußerst sensibler Zellen sollte man die Transfektionslösung nach 3–6 h entfernen und durch entsprechendes frisches komplettes Medium ersetzen.

## 4. Up- und Downscale

1. Der optimale Verhältnisbereich von Nukleinsäure [ $\mu\text{g}$ ] zu METAFECTENE<sup>®</sup> PRO [ $\mu\text{l}$ ] liegt nach bisherigen Resultaten i.d.R. zwischen 1:2 and 1:7. Im Falle von siRNA-Anwendungen verwenden Sie das spezielle siRNA-Optimierungsprotokoll.
2. Passen Sie die Mengenverhältnisse (Nukleinsäure:Lipid) an das Kulturschalenformat über den entsprechenden Proportionalitätsfaktor an.
3. Aufgrund von Adsorptionsvorgängen verwendeter Agenzien an Gefäßwände sollte bei erheblich unterschiedlichen Formaten die Lipoplexmenge und das Nukleinsäure-Lipid-Verhältnis eigens optimiert werden.

### Reagenzmengen für verschiedene Kulturgefäße

(In Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte.)

Kulturplatte	96-Well Platte	24-Well Platte	12-Well Platte	6-Well Platte	60mm	100mm
<b>Wachstumsfläche [cm<sup>2</sup>]</b>	0.31	1.9	3.7	9	22	60
<b>Proportionalfaktor</b>	0.03	0.2	0.4	1.0	2.5	6.7
<b>Ausgesäte Zahl adhärenter Zellen* (1 Tag vor der Transfektion) [<math>\times 10^5</math>]</b>	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)
<b>Ausgesäte Zahl Suspensionszellen* (am Tag der Transfektion) [<math>\times 10^5</math>]</b>	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)
<b>Zellsuspensionsvolumen [ml]</b>	0.15	0.5	1.0	2.0	4.5	12.0
<b>DNA(RNA)-Menge [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	0.04 – 0.3 (0.1)	0.08 – 1.0 (0.5)	0.2 – 2.0 (1.0)	0.4 – 5.0 (2.0)	0.8 – 12.0 (6.0)	1.6 – 34.0 (14.0)
<b>METAFECTENE<sup>®</sup> PRO Volumen [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	0.2 – 4.0 (0.6)	0.4 – 7.0 (2.0)	0.8 – 15.0 (3.0)	1.6 – 35.0 (6.0)	3.2 – 90.0 (18.0)	6.4 – 250 (42.0)
<b>Verdünnungsvolumen von DNA bzw. RNA [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	15 - 30	30	50	100	300	700
<b>Verdünnungsvolumen METAFECTENE<sup>®</sup> PRO [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	10 - 50	10 - 50	50	100	300	700
<b>Gesamtvolumen [ml]</b>	0.175 – 0.23	0.54 – 0.58	1.1	2.2	5.1	13.4

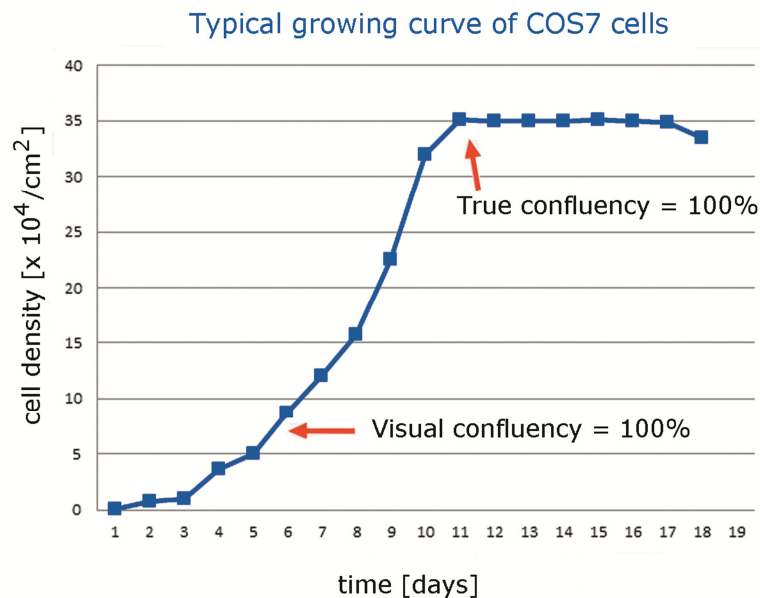
\* Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus und Zellgröße ab und eine Mengenoptimierung z.B. über die Erstellung einer Wachstumskurve ist eventuell notwendig. Behalten Sie in jedem Fall dieselben Bedingungen zwischen den Experimenten bei. I.d.R. benötigt die plasmidische bzw. DNA-Transfektion eine höhere Zelldichte am Tage der Transfektion als die siRNA-Transfektion.

## 5. Troubleshooting

1. Vermeiden Sie den Kontakt purer METAFECTENE® PRO-Lösung und purer Nukleinsäure-Lösung mit dem Behältermaterial (z.B. 96-Well Platten).

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

2. Die im Medium befindlichen Nukleinsäure- und METAFECTENE® PRO-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 METAFECTENE® PRO – Nukleinsäure-Menge vermieden werden.
5. Geben Sie keine Antibiotika zum Medium während der Transfektion, 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 Puffer

### 10x PBS

40 g	NaCl	1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g	KCl	5,75 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O

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

### 1x PBS

In einem 1l Messkolben werden 100 ml 10x PBS auf 1:10 mit Wasser verdünnt und autoklaviert.

## 6.2 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.

## 6.3 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](mailto:contact@biontex.com)  
Internet: [www.biontex.com](http://www.biontex.com)*