



Dr. Stefan Hofreiter
Biontex Laboratories GmbH
Frankfurter Ring 193a
im Münchner Technologiezentrum
80807 München

15. März 2007

Bericht über die Nutzung von Metafectene Pro

Wir haben Transfektionsexperimente in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Diese waren

- CHO-Zellen ("chinese hamster ovary")
- NT2-Zellen (human)
- PC12-Zellen (Ratte).

Folgendes Protokoll wurde gewählt:

4-well Kulturschalen: $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden pro Deckgläschen ausplattiert und 18-24 h bei 37°C im Zellkulturinkubator (10% CO₂) inkubiert bis die Zellen 90-100% konfluent waren.

Das Medium wurde entfernt und folgende Lösungen (pro Deckgläschen) angesetzt:

A: 0.5-1.5 µg DNA in 50 µl serum- und antibiotika-freiem Medium (Optimem)

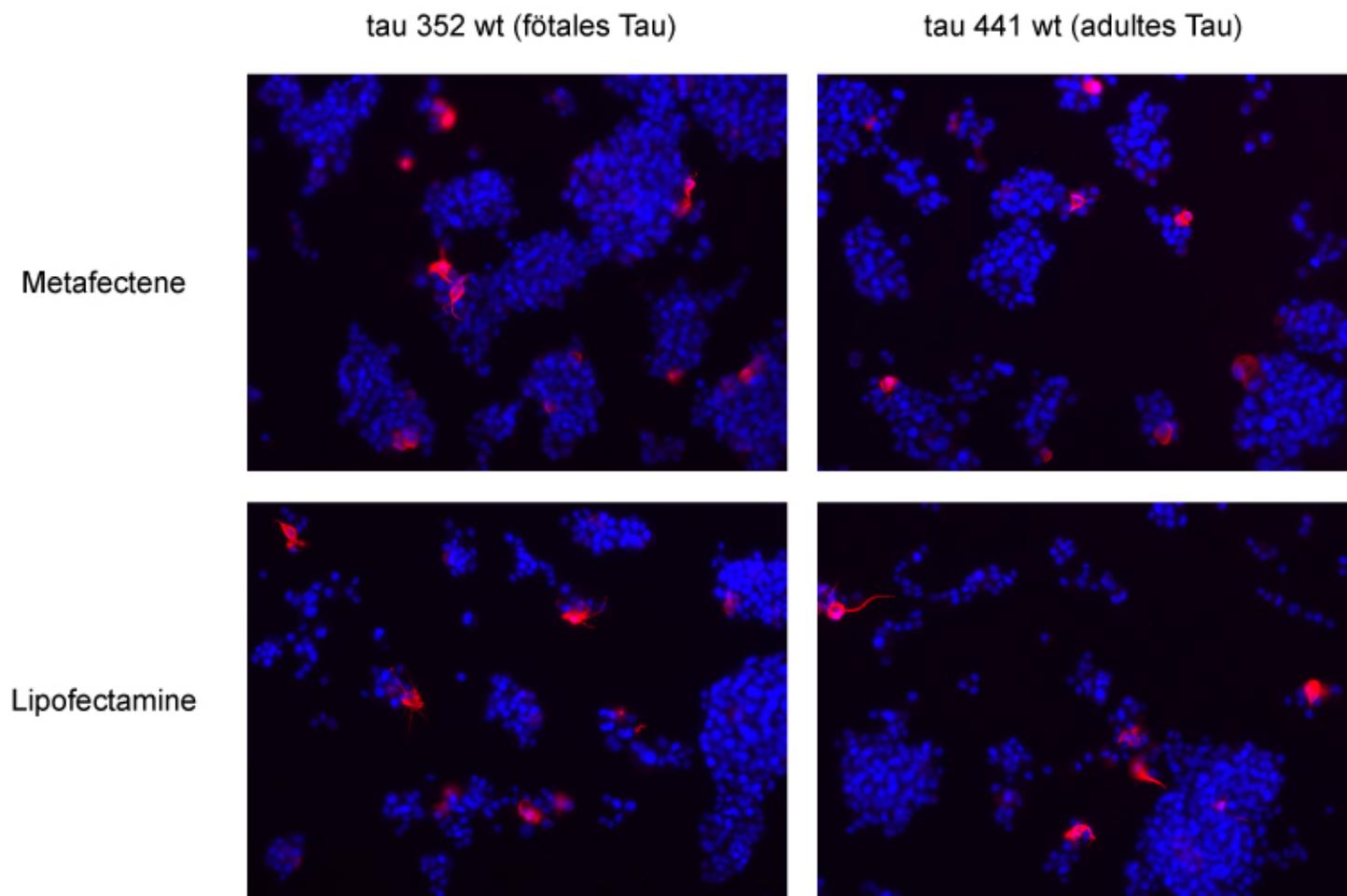
B: 1.0-6.0 µl Transfektionsreagenz in 50 µl serum- und antibiotika-freiem Medium (Optimem)

Die Lösungen wurden vorsichtig gemischt indem sie einmal auf- und abpipettiert wurden. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und 15-20 Minuten inkubiert. Danach wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig verteilt, indem die Kulturschale leicht geschwenkt wurde. Nach 6 Stunden wurde 260 µl Serum-DMEM zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 500 µl Serum-DMEM gewechselt.

Ergebnisse:

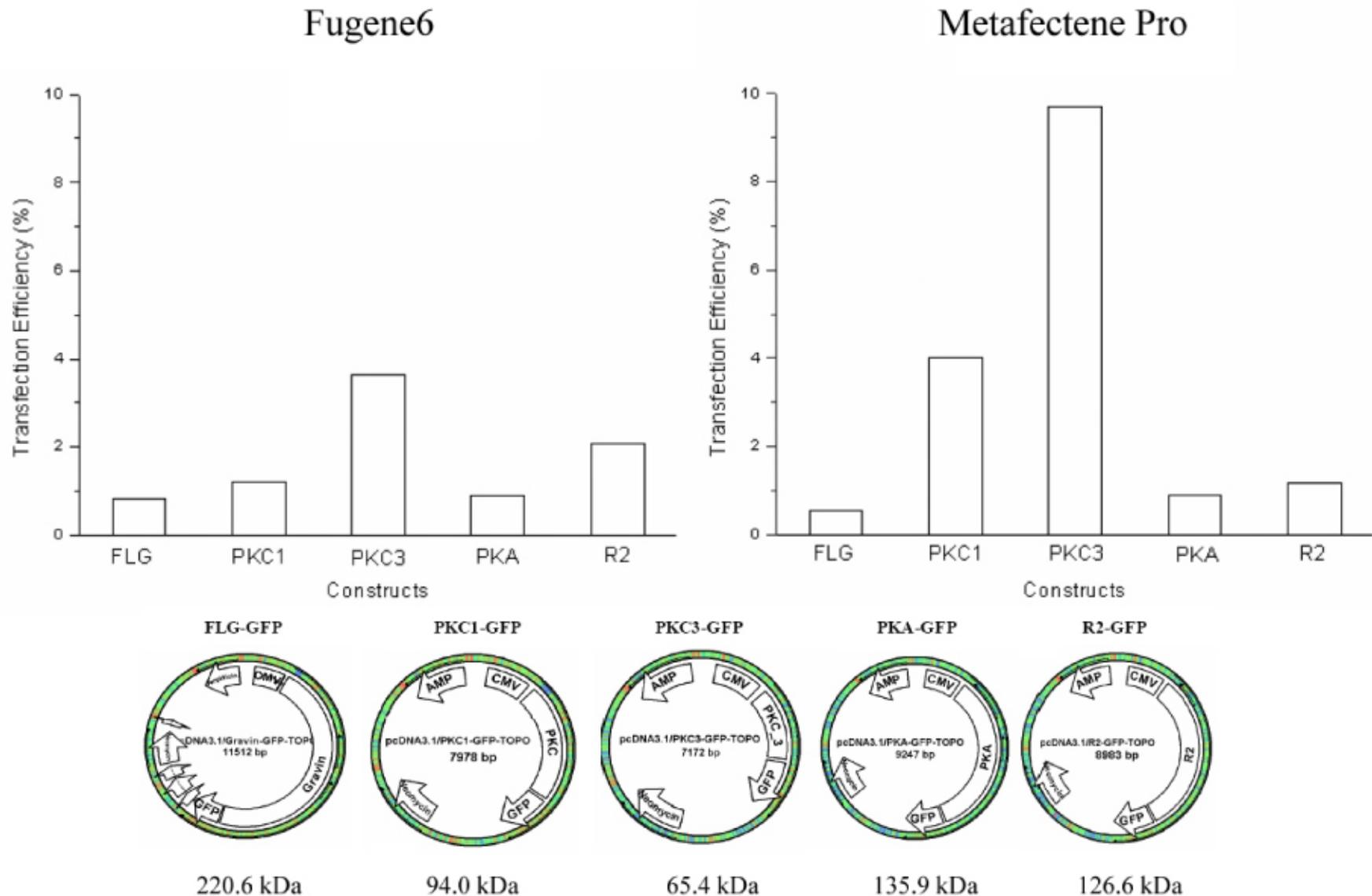
- (1) Alle drei genannten Zelllinien lassen sich gut mit Metafectene Pro transfizieren.
- (2) Die Transfektionseffizienz von PC12 Zellen mit Metafectene entspricht der Effizienz eines Vergleichspräparats (Lipofectamine). Auch die Zellmorphologie der behandelten Zellen und die Stärke des Fluoreszenzsignals ist ähnlich (Figure 1). Kernfärbung (DAPI) gibt keinen Hinweis auf eine wesentliche Zytotoxizität bei den gewählten Bedingungen.
- (3) Die Transfektionseffizienz ist sowohl bei Metafectene Pro wie bei einem Vergleichspräparat (Fugene6) abhängig von der Größe des transfizierten Konstrukts. Selbst große Konstrukte (11.5 kbp) lassen sich in CHO Zellen transfizieren. Dabei scheint Metafectene bei kleinen Konstrukten, aber nicht bei den größeren, eine höhere Transfektionseffizienz als das Vergleichspräparat zu haben (Figure 2).

Expression von fötalem und adultem humanem Tau Protein in Ratten PC12 Zellen: Metafectene versus Lipofectamin



Verwendung von pRC-CMV als Expressionsvektor (Größe ca. 6.6 kb, exprimiertes Protein etwa 36.7 bzw. 45.8 kDa), FLAG-Epitopmarkiert, Detektion: anti-FLAG (M5) Antikörper (Maus), anti-Maus-Cy3. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

Expression von humanen Gravin-Konstrukten unterschiedlicher Größe in CHO-Zellen: Metafectene versus Fugene6



Verwendung von pCDNA3.1 als Expressionsvektor (Größen zwischen ca. 7.2 kbp und 11.5 kbp, exprimierte Proteine zwischen 65.4 und 220.6 kDa), GFP-Epitopmarkiert, Detektion: anti-GFP Immunfärbung.