

9. Anhang

Erarbeitung eines Elektrotransfektionsprotokolls für Säugerzellen:

Für jedes neue System müssen die Elektroporationsbedingungen optimiert werden. Die beigefügten Protokolle geben Richtlinien, nach denen die optimalen Parameter für das System erarbeitet werden müssen.

Folgende Punkte sind zu beachten:

1. Test der Medien

- a. Die Leitfähigkeit des Elektroporationsmediums beträgt ca. **3.4 mS/cm ±0.2 bei 20°C**. Da sich die Leitfähigkeit allgemein proportional zur Temperatur erhöht, ist darauf zu achten, dass die **Temperatur des Mediums 22°C nicht überschreitet** (Leitfähigkeit 3.6 mS/cm bei 22°C).
- b. Test der Zellen im **hypoosmolaren Elektroporationsmedium**
Durchweg läuft die Elektrotransfektion am Besten im hypoosmolarem Medium ab. Dieses Medium wird nicht von allen Zellen in gleicher Weise vertragen, empfindliche können lysieren. Inkubieren Sie die Zellen 30 Minuten darin (bei Raumtemperatur) und bestimmen Sie die Überlebensrate. Sind mehr als **10% der Zellen lysiert**, so mischen Sie das hypoosmolare Medium schrittweise mit dem isoosmolarem Medium bis Sie ein befriedigendes Ergebnis erhalten.

2. Anspruch an die Zellkultur

- a. Die Zellen müssen frei von **Mycoplasmen** sein und sind deshalb vorher darauf zu testen. (Mycoplasmentest: Fa. Biochrom, Berlin, Kat. Nr. D 7001)
- b. Die Zellen für die Elektrotransfektion sollten in der **exponentiellen Wachstumsphase** sein.
- c. Adhärenente Zellen sind mit **Enzymen abzulösen** (z.B. 0.1 mg/ml Dispase, Trypsin ohne EDTA 0.01 mg/ml). Dabei ist die Verwendung von **Komplexbildnern** (z.B. EDTA) zu vermeiden. Anschließend werden die Zellen einmal mit Kulturmedium gewaschen.
Trypsin kann bereits die Membran vorpermeabilisieren, so dass der Spannungsaufbau über die Membran gestört wird. Wenn Trypsin eingesetzt werden muss, sollte es in einer Konzentration von 1: 20 und ohne EDTA verwendet werden.

3. Plasmid- bzw. Proteinlösungen

- a. Plasmide bzw. Proteine, die in die Zellen eingeschleust werden, sollten möglichst in Wasser gelöst sein. Sollte das nicht möglich sein, sind nur anorganische Reagenzien als Puffer zu verwenden. **Organische Puffer** (z.B. Tris, MES etc.) und **Komplexbildner** (z. B. EDTA; EGTA) sind zu **vermeiden**.
- b. Die Konzentration der Plasmidlösung sollte ca. 1 mg/ml, die der Proteinlösung ca. 5-10 mg/ml betragen.

4. Erarbeitung der Elektroporationsparameter

a. Spannungspuls:

Unter den hypoosmolaren Bedingungen von 1.b. wird der Zellradius im Mikroskop oder, wesentlich genauer, in einem Cell Counter (z.B. CASY oder Coulter Counter) bestimmt.- Bei Verwendung eines Cell Counters ist zu beachten, dass das Gerät auf das niedrigleitende Porationsmedium kalibriert sein muss-. Mit Hilfe des Radius lässt sich die kritische Feldstärke E_c berechnen.

$$E_c = \frac{V_c}{1.5 \times a}$$

E_c : kritische Feldstärke

V_c : Durchbruchspannung (1 V bei 22°C, 2 V bei 4°C)

a : Zellradius

- a. Pulsdauer: Mit Hilfe des Radius lässt sich die Relaxationszeit τ berechnen.

$$\tau = a \cdot C_m (r_i + 0.5r_e)$$

τ : Relaxationszeit

a : Zellradius

C_m : Membrankapazität

r_i : innerer spezifischer Widerstand der Zelle

r_e : äusserer spezifischer Widerstand des Porationsmediums

Dabei ist zu beachten, dass das Gleichgewichtspotential, d. h. der Membrandurchbruch nach 5τ erreicht wird.

- a. Anzahl der Pulse: 1-3 Pulse sind für die jeweiligen Zellen zu testen

5. Zelldichte

Die optimale Zelldichte beträgt **1×10^6 Zellen/ml**.

Bei einer höherer Zelldichte kann es zu Zellfusion kommen, bzw. die Zellen werden dem elektrischen Feld nicht gleichmäßig ausgesetzt, so dass es zu unterschiedlichen Permeabilisierung der Zellmembran kommen kann.

6. Elektrotansfektionsablauf

- a. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.
Keine organischen Puffer oder Komplexbildner verwenden.
- b. Zelldichte auf **1x10⁶ Zellen/ml** einstellen.
- c. Einmal mit Porationsmedium waschen.
- d. In Porationsmedium (**22°C oder 4°C**) resuspendieren.
- e. Plasmid, in Wasser gelöst, (5-20 µg/ml) bzw. Proteine (10-100 µg/ml) hinzufügen.
Keine organischen Puffer oder Komplexbildner verwenden.
- f. Suspension in Porationsküvetten blasenfrei überführen.
(bei Elektroporation bei 4°C Küvetten vorher auf Eis stellen)
- g. Elektroporation:

Puls: 1-3fach der berechneten Durchbruchspannung im hypoosmolarem Porationsmedium und der entsprechenden Temperatur

Pulsdauer: a: bei 22°C: 40-100 µs
 b: bei 4°C: 15-40 µs

Anzahl: 1-3 Pulse

- h. a: Elektroporation bei 22°C
Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
b: Elektroporation bei 4°C:
Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 2 Minuten auf Eis, danach 8 Minuten bei 37°C inkubieren (Wasserbad)
- i. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml **CGM ohne Phenolrot** (37°C) waschen.
Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, so dass kein Aluminium in Lösung geht.
- j. In Kulturmedium aufnehmen.

Wichtig: Die Zellen dürfen nicht länger als 30 Minuten im hypoosmolarem Porationsmedium bleiben.

Transfektionsprotokoll für L929 mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. mit Dispase (0.1 mg/ml in CGM) abgelöst und in CGM gewaschen (10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur). Zelldichte auf **1x10⁶ Zellen/ml** einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**100 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren (Zellradius 10.4±0.1 µm)
4. Plasmid (5-10 µg/ml) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 µl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:

 Puls: 2 kV/cm (400 V Einstellung am Multiporator)
 Pulsdauer: 100 µs
 Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, damit kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml CGM ohne Phenolrot pro Porationsküvette (400 µl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

Transfektionsprotokoll für H73C11 mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. 10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur, abzentrifugiert. Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**150 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren (Zellradius $80. \pm 0.1 \mu\text{m}$)
4. Plasmid (5-20 $\mu\text{g/ml}$) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 μl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:
 - Puls: 0.8 kV/cm (160 V Einstellung am Multiporator)
 - Pulsdauer: 40 μs
 - Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, damit kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml CGM ohne Phenolrot pro Porationsküvette (400 μl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

Transfektionsprotokoll für SP2/0-Ag 14 mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. 10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur, abzentrifugiert. Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**150 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren. (Zellradius $7.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$)
4. Plasmid (5-20 $\mu\text{g/ml}$) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 μl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:
 - Puls: 0.8 kV/cm (160 V Einstellung am Multiporator)
 - Pulsdauer: 100 μs
 - Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, damit kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml CGM ohne Phenolrot pro Porationsküvette (400 μl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

Transfektionsprotokoll für Jurkat mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. 10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur, abzentrifugiert. Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**100 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren. (Zellradius $9.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$)
4. Plasmid (5-20 $\mu\text{g/ml}$) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 μl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:
 - Puls: 1.2 kV/cm (240 V Einstellung am Multiporator)
 - Pulsdauer: 40 μs
 - Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, so dass kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml CGM ohne Phenolrot pro Porationsküvette (400 μl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

Transfektionsprotokoll für CFB (primäre Cardiofibroblasten aus dem Rattenherz) mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) waschen, mit Trypsin ohne EDTA (0.1 mg/ml in PBS) ablösen und in CGM waschen (10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur). Zelldichte auf **1×10^6 Zellen/ml** einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**100 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren (Zellradius $10.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$)
4. Plasmid (5-10 $\mu\text{g/ml}$) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 μl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:

Puls: 4 kV/cm (800 V Einstellung am Multiporator)
Pulsdauer: 100 μs
Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, damit kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml McCoys pro Porationsküvette (400 μl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

Transfektionsprotokoll für ES (embryonale Stammzellen aus der Maus) mit pEGFP-C1:

1. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, d.h. zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) waschen, mit Trypsin ohne EDTA (0.1 mg/ml in PBS) ablösen und in CGM waschen (10 Minuten bei 200 g, Raumtemperatur). Zelldichte auf **1×10^6 Zellen/ml** einstellen.
2. Einmal mit Porationsmedium (**100 mOsmol**) waschen, (10 Minuten bei 200 g).
3. In Porationsmedium (**22°C**) resuspendieren (Zellradius $10.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$)
4. Plasmid (5-10 $\mu\text{g/ml}$) hinzufügen.
5. Suspension in Porationsküvetten (400 μl Volumen, 2 mm Elektrodenabstand) blasenfrei überführen (**22°C**).
6. Elektroporation:
 - Puls: 1 kV/cm (200 V Einstellung am Multiporator)
 - Pulsdauer: 70 μs
 - Anzahl: 1 Puls
7. Zellsuspension nach dem Puls in der Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen.
8. Vorsichtig aus Küvette entnehmen (eventuell Pasteur-Pipette) und in 5 ml CGM ohne Phenolrot (37°C) waschen (10 Minuten bei 200 g). Bei der Entnahme der Zellsuspension ist zu beachten, dass man die Aluminiumelektrode nicht berührt, damit kein Aluminium in Lösung geht.
9. In je 1 ml HAm-F12 pro Porationsküvette (400 μl) aufnehmen und in 24-Well-Platte kultivieren.

Für die Expression des Plasmids pEGFP-C1 erreicht man nach 2 Tagen die maximale Ausbeute.

