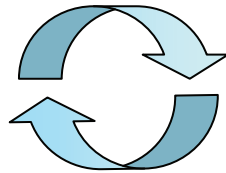


## Nichtvirale Transfektion von CHO-Zellen mit einem Markergen

### Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 23](#)



### Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 11](#)

### 1. Prinzip

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung fremder (heterologer) DNA in eukaryotische Zellen. In diesem Versuch ist die heterologe DNA das Plasmid pEGFP-N1, welches das Gen für das Green Fluorescent Protein (GFP) sowie die für die Expression notwendigen Regulationseinheiten enthält. Das Plasmid soll mit Hilfe zwei verschiedener Transfektionsreagenzien (jetPEI™, FuGene-6™) in Chinese-Hamster-Ovar-(CHO)-Zellen eingebracht werden.

### 2. Materialien

- CHO-Zellen
- Plasmid-DNA (pEGFP-N1)
- Transfektionsreagenzien jetPEI™ und FuGene-6™
- Zellkulturmedium (bestehend aus 9 Teilen DMEM/Nut.MixF12 mit GlutaMax, 1 Teil FKS, 1 g/100ml Pen./Strep)
- Serumfreies Medium (DMEM/Nut.MixF12 + GlutaMax + 1 g/100mL Pen./Strep.)
- 150 mmol/L NaCl-Lösung, steril
- sterile 24well-Kulturschale, sterile 1,5 mL-Eppendorfgefäße
- sterile Pipettenspitzen, sterile Pipetten, sterile Werkbank

### 3. Durchführung

#### 1.Tag

- Aussaat von CHO-Zellen in eine 24well-Kulturschale mit einer Zelldichte von  $0,5-1,0 \times 10^5$  lebenden Zellen pro well. Pro well 1,0 mL Medium. Eventuell nicht benutzte wells sollten dennoch mit Medium oder PBS gefüllt werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Kultivierung der frisch ausgesäten Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

**2. Tag**

- Transfektion der CHO-Zellen bei 60-80 % Konfluenz nach folgendem Schema:

| 24well   | 1 | 2                                       | 3  | 4  | 5  | 6                                       |
|----------|---|---|--|--|--|---|
| <b>A</b> | X | X                                       | X  | X  | X  | X                                       |
| <b>B</b> | X | CHO-Zellen ohne Transfektion            | Verhältnis FuGene [µL] / DNA [µg]<br>3:2 (Eppi 1A) | Verhältnis FuGene [µL] / DNA [µg]<br>3:1 (Eppi 1B) | Verhältnis FuGene [µL] / DNA [µg]<br>6:1 (Eppi 1C) | CHO-Zellen mit nativer DNA transfiziert |
| <b>C</b> | X | CHO-Zellen mit nativer DNA transfiziert | JetPEI / DNA Verhältnis N/P=3<br>(Eppi 2A)         | JetPEI / DNA Verhältnis N/P=5<br>(Eppi 2B)         | JetPEI / DNA Verhältnis N/P=8<br>(Eppi 2C)         | CHO-Zellen ohne Transfektion            |
| <b>D</b> | X | X                                       | X  | X  | X  | X                                       |

Abb.1: Transfektionsschema

- Vorbereitung der pEGFP-N1/FuGene-6-Komplexe:
  - in drei 1,5 mL-Eppendorf-Gefäße werden jeweils 100 µL serumfreies Medium vorgelegt
  - in das erste [1A] und zweite Eppi [1B] werden jeweils 3 µL und in das dritte Eppi [1C] werden 6 µL FuGene-6 direkt in das vorgelegte Medium pipettiert
  - in einem vierten Eppi [1D] werden 2 µg DNA ad 50 µL mit serumfreiem Medium und in einem fünften Eppi [1E] werden 2 µg DNA ad 100µL mit serumfreiem Medium aufgefüllt
  - die 50 µL DNA-Lösung aus Eppi 1D werden in Eppi 1A pipettiert, der Inhalt wird gut gemischt
  - in die Eppis 1B und 1C werden jeweils 50 µL der DNA-Lösung aus Eppi 1E pipettiert und ebenfalls gut gemischt
  - die Ansätze in den Eppis 1A, 1B und 1C werden bei RT für 30 min inkubiert
- Vorbereitung der pEGFP-N1/jetPEI-Komplexe
  - in drei 1,5 mL-Eppendorf-Gefäße werden 1,2 µL [2A], 2,0 µL [2B] bzw. 3,2 µL [2C] jetPEI pipettiert und jeweils auf 50 µL mit NaCl-Lösung (150 mmol/L) aufgefüllt
  - in einem vierten Eppi [2D] werden 3 µg DNA auf 150 µL mit NaCl-Lösung (150 mmol/L) aufgefüllt und gut gemischt
  - je 50 µL der DNA-Lösung aus Eppi 2D werden zu den Ansätzen 2A, 2B und 2C pipettiert, gut gemischt und für 30 min bei RT inkubiert

- Vorbereitung der nativen DNA
  - zu der restlichen DNA (~2µg) im ausgegebenen Eppi werden 200 µL Medium pipettiert und bis zur Transfektion auf Eis gelagert
  
- Vorbereitung der Zellen für die Transfektion
  - für eine erfolgreiche Transfektion mit DNA/FuGene-Komplexen müssen die Zellen in serumfreien Medium kultiviert werden
  - entsprechend dem Transfektionsschema werden in den Wells B3-B6 jeweils 900 µL serumfreies Medium vorgelegt
  - eine Transfektion mit DNA/jetPEI-Komplexen ist auch in Anwesenheit von Serum erfolgreich, daher ist in den sonstigen Wells kein Mediumwechsel notwendig
  
- Transfektion
  - nach der Vorinkubation der Komplexe werden die Ansätze 1A, 1B und 1C bzw. 2A, 2B und 2C entsprechend dem Transfektionsschema jeweils tropfenweise zu den Zellen pipettiert
  - ebenfalls entsprechend dem Transfektionsschema werden jeweils 100 µL der nativen DNA zu den Zellen pipettiert
  - die Zellen werden über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

### 3. Tag

- Kernfärbung
  - Ca. 24 h nach der Transfektion wird das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen werden für 10 min mit PBS gewaschen.
  - Anschließend werden die Zellen für 15 min mit 3,7 % Formaldehyd (in PBS) fixiert sowie danach für 10 min mit PBS gewaschen.
  - Die Kernfärbung erfolgt für 10 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 [1 µg/mL in PBS; 500 µL/well]; (von jetzt an sollten die Zellen während der Inkubationszeiten möglichst dunkel stehen, da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist).
  - Die Zellen werden wiederholt für 10 min mit PBS gewaschen, anschließend mit VE-Wasser entsalzt und am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.
  
- Anfertigung eines vollständigen Protokolls