

Plasmid DNA

- DNA sollte in der “supercoiled” Form vorliegen. Der Vorteil von supercoiled Plasmid-DNA ist, dass sie viel effizienter transkribiert wird (wenn nicht supercoil, dann können zu viele nicks in der DNA entstehen), als lineare DNA. Manche Gruppen verwenden auch linearisierte DNA besonders dann, wenn stabile Klone hergestellt werden sollen (damit sie besser integriert werden könne). Aber die Linearisierung kann natürlich zu einem erhöhtem Abbau durch Nucleasen führen.

Ca-Phosphat-Transfektion

Die DNA wird bei dieser Technik mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt. Dabei kommt es zu einer Ausbildung feiner DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die sich, wenn sie mit den Zellen in Kontakt kommen, auf der Zelloberfläche niederschlagen, die DNA wird dann mittels Endocytose aufgenommen.

Calcium-Ionen im Überschuss verändern die Durchlässigkeit der Membran so, dass eine gesteigerte Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA erlangt wird (Mechanismus nicht bekannt).

Optional: Eine anschließende Glycerol- oder DMSO-Behandlung der Zellen erhöht die Transfektionseffizienz.

Wichtig: Die Ca-Phosphat-Transfektion verträgt kein Serum, da durch die entstehenden Löcher nicht nur DNA, sondern auch Serumproteine ins Zytoplasma strömen.

Damit möglichst feine Calciumphosphat-Kristalle entstehen gibt man den die DNA/Calciumchlorid Lösung tröpfchenweise zum phosphathaltigen Puffer und später auch tröpfchenweise zu den Zellen.

Lipofektamin

Bei der Transfektion mit kationischen Lipiden, der Lipofektion, bilden die Lipide im wässrigen Milieu Mizellen oder Liposomen. Die Mizellen bestehen aus einem Lipidmonolayer und haben einen Durchmesser von 1-10 nm. Die Liposomen bilden Bilayer und sind mit 30 µm deutlich größer. Die DNA komplexiert damit zu Lipoplexen. Bei dieser Komplexbildung darf allerdings kein Serum anwesend sein. Die Lipoplexe werden endocytotisch aufgenommen. Beim Zerfall des Endosoms penetriert die DNA ins Zytoplasma.

Wichtig:

- Alle synthetischen Karriersysteme setzen die DNA im Zytoplasma frei. Ist sie größer als 1000 bp, wird sie, wegen der "Nuclear Barrier", nicht in den Kern transportiert. Aber auch kleine DNA gelangt nur während der Mitose in den Kern. Daher lassen sich gut teilende Zellen mit synthetischen Transfektionsreagenz transfizieren, schwach proliferierende Zellen hingegen nicht.
- Hohe DNA Konzentrationen inhibieren die Transfektion

The Nucleofector Technology (Amaxa)

- Transfizierte DNA gelangt sofort in den Nucleus (Vorteil: Zellen die nicht stark proliferieren können transfiziert werden).
- Für stabile Klone soll linearisierte DNA verwendet werden
- Expressionstarte ca. 2h nach Transfektion
- Während der Transfektion sind Zellen in Suspension
- Wenig Optimierung möglich/nötig da die entsprechenden Lösungen und Programme bereits von der Firma vorgegeben werden