

Protocole de transfection au phosphate de calcium en Corning® HYPERFask® Cell Culture Vessel

CORNING

Introduction

Un des outils les plus utiles dans la recherche en biologie cellulaire est l'introduction de molécules exogènes (comme l'acide nucléique) dans les cellules eucaryotes. La transfection de lignées de cellules de mammifères avec de l'ADN est l'une des techniques les plus populaires pour y parvenir. La stratégie traditionnelle est basée sur la co-précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium. En outre, dans de nombreux travaux de recherche aujourd'hui, la transfection de grandes quantités de cellules est de plus en plus fréquente. L'utilisation du phosphate de calcium est idéale pour ces applications à cause de son rendement relativement bon et surtout son faible coût. L'utilisation de l'HYPERFask Corning est adaptée pour ses performances, démontrées dans des protocoles de transfection de routine. À cette fin, nous avons élaboré un protocole validé qui peut être appliqué et modifiés si nécessaire à vos besoins. Le protocole a été développé sur des cellules CHO (Chinese hamster ovary), mais a été appliquée avec succès à d'autres types cellulaires, notamment les cellules HeLa. Ce protocole est conçu comme un point de départ et peut être optimisée avec vos propres lignées cellulaires. Nous avons utilisé dans nos manipulations un kit de transfection au phosphate de calcium (Invitrogen Cat. No. K2780-01).



Jour 1

La procédure ci-dessous est adaptée à l'utilisation des HYPERFask ainsi qu'à des plaques de culture 24 puits. La plaque 24 puits sert de contrôle pour suivre l'efficacité de transfection standard et dans les conditions à grande échelle. Si vous choisissez d'utiliser un format de plaque différent pour les contrôles, veuillez modifier les volumes de réactifs en équivalence ml/cm².

Dépôt des cellules

REMARQUE: Utilisez des cultures fraîches (5 à 20 passages) avec 80 à 90% de confluence.

1. ensemercer à 20 000 cellules/cm² dans 0,326 ml/cm² de milieux de croissance (IMDM avec 10% de SVF).

CONSEIL PRATIQUE: Nous recommandons la réalisation de contrôles sur plaques pour suivre l'efficacité de transfection (tableau 1) : témoins positifs et négatifs, ainsi que le contrôle du précipité réalisé pour la transfection à grande échelle.

CONSEIL PRATIQUE: Les cultures doivent être à 80% de confluence après 24 heures de culture.

2. Incuber une nuit à 5% de CO₂, 37 ° C.

Tableau 1.

	Surface (cm ²)	Volume de milieu (ml)	Concentration cellulaire
HYPERFlask™ Vessel	1720/flacon	560/flacon	34.4x10 ⁶ /flacon
Plaque 24 puits	2/puit	0.650/puit	4.0x10 ⁶ /flacon

Jour 2

Préparation du précipité ADN/Sel

REMARQUE: toute cette étape doit être réalisée sous hotte en conditions stériles.

REMARQUE: Ces étapes ont été modifiées par rapport au protocole standard du kit de transfection Invitrogen

1. 3 à 4 heures avant la transfection, changer le milieu de culture de toutes les cultures à transfecter.

REMARQUE: Pour la manipulation des HYPERFlask, se référer au mode d'emploi correspondant.

CONSEIL PRATIQUE: Utilisez une pompe à vide pour aspirer délicatement le milieu hors de l'HYPERFlask et ainsi minimiser la perte de cellules tout en réduisant les risques de contamination.

2. Dans des tubes stériles (microtubes ou tubes coniques), préparer le mélange d'ADN pour la transfection (tableau 2),

Tableau 2.

Solution A	Par puits (plaque 24 puits) (0,650 ml/puit)	Par HYPERFlask Vessel (560 ml/flacon)
2 M de CaCl ₂	2,34 µL	2,02 ml
ADN	1 µg	1 mg
H ₂ O	17,16 µL	14,8 ml
Volume final (A)	19,5 µL	16,8 ml

3. Dans des tubes séparés stériles qui peuvent contenir les volumes totaux de la solution A et de la Solution B (par exemple, 33.6 ml / HYPERFlask), ajouter la quantité appropriée de Solution B (2x solution HBSS) (tableau 3).

Tableau 3.

Solution B (2x Hepes Buffered Saline Solution - HBSS)	Par puits (plaque 24 puits) (0,650 ml/puit)	Par HYPERFlask Vessel (560 ml/flacon)
2xHBSS	19,5 µL	16,8 ml

4. Lentement, par addition goutte à goutte et en agitant doucement au vortex, ajouter la solution A à la solution B.

REMARQUE: la solution A **DOIT** être ajouté à la solution B et non l'inverse.

5. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Un précipité devrait être visible.

REMARQUE: ne pas dépasser 30 minutes, ceci conduirait à une précipitation trop importante pour une bonne efficacité de transfection. Le temps d'incubation peut être optimisé en le raccourcissant.

Ajout du précipité

1. Plaque 24 puits de contrôle

- a. Retirer 39 μ L de milieu à chaque puits à transfecter.
- b. Lentement, goutte à goutte ajouter 39 μ L du mélange ADN/sel.
- c. Agiter la plaque pour bien mélanger.
- d. Prendre 39 μ L du précipité préparé pour l'*HYPERFlask* et l'ajouter à un puits de la plaque.

REMARQUE: Si vous le souhaitez, jusqu'à 3 puits peuvent être testés avec le précipité préparé pour l'*HYPERFlask*

- e. Incuber dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂ à 37 ° C, 24 à 48h suivant les lignées

2. Ajout du précipité à l'*HYPERFlask* :

- a. Vider l'*HYPERFlask* en versant délicatement tout le milieu dans une bouteille de stockage ou une fiole Erlenmeyer de 500ml.
- b. Retirer 33,6 ml de ce milieu et le transférer dans un tube stérile de 50 ml.
- c. Lentement, par addition goutte à goutte et tout en mélangeant, ajouter le reste du mélange ADN /sel dans le flacon de 500 ml contenant le milieu retiré de l'*HYPERFlask*.

CONSEIL PRATIQUE: Agitez doucement d'une main le flacon de stockage contenant le milieu tout en y ajoutant le mélange ADN/sel.

- d. Verser délicatement le mélange de transfection dans l'*HYPERFlask*.

CONSEIL PRATIQUE: Verser lentement le long du col incliné pour éviter la formation de bulles.

- e. Si nécessaire, utilisez le milieu conservé dans le tube de 50 ml pour compléter le volume de milieu jusqu'au niveau adéquat (premier cran du pas de vis sur le col).

- f. Incuber dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂, 37 ° C, 24 à 48 H suivant la lignée cellulaire.

3. Utiliser les cellules transfectées selon les besoins.