

## CANFAST

Cat. No. MBL082 (1 mL)

Versión: 2005

### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

El CANFAST es un reactivo de transfección de genes que pertenece a una nueva generación de polímeros catiónicos. Tiene varias facultades únicas y necesarias para mejorar la eficiencia de transfección tales como la condensación del DNA y la liberación endosomal.

Comparado con otros reactivos de transfección, el CANFAST presenta como principales ventajas su alta estabilidad, es más resistente que otros reactivos al medio con suero, no es citotóxico, tiene una alta eficiencia de transfección y es útil para la transfección de células primarias así como de líneas celulares estables.



Después de largos períodos de almacenamiento, el CANFAST podría presentar turbidez debido a la precipitación de algunos de sus compuestos. Esta turbidez no afecta la actividad biológica del producto. Se recomienda agitar el reactivo justo antes de utilizarlo (no dar vortex).

### CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Se presenta a una concentración de 1mg/ml.

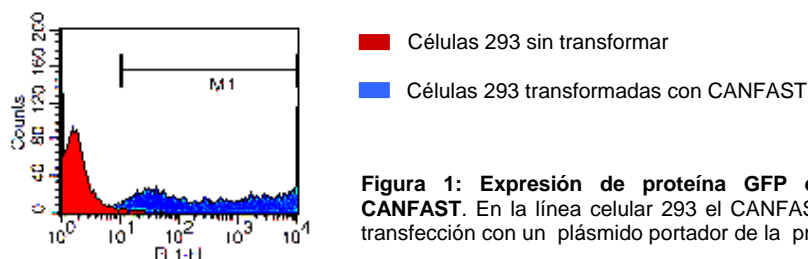
Se envía a temperatura ambiente y debe ser **almacenado a 4°C**. Estable por un año.

Se recomienda conservar el producto en su tubo original.

### APLICACIONES

El reactivo de transfección CANFAST es un reactivo que puede ser usado tanto en células primarias como en líneas celulares estables. En la tabla 1 se indican las líneas celulares que han sido exitosamente transfectadas con CANFAST.

Tabla 1. Líneas celulares ensayadas con CANFAST			
Línea celular	Origen	Tipo de célula	% Transfección
HEK 293	Humano	Riñón embrionario	99
HeLa	Humano	Carcinoma cervical	
NIH3T3	Ratón	Fibroblasto embrionario	57
BNL CL2	Ratón	Hígado embrionario	
HepG2	Humano	Hepatocarcinoma	58
COS7	Mono	Hígado transformado con SV40	
CHO	Hamster chino	Ovario	85
5HSY-5Y	Humano	Neuroblastoma	
IMR 32	Humano	Neuroblastoma	
MRC5	Humano	Epitelio pulmón fetal	
MCF7	Humano	Adenocarcinoma de pecho	
K562	Humano	Leucemia crónica	
SKOV-3	Humano	Adenocarcinoma de ovario	
HUV-EC(célula primaria)	Humano	Endotelio umbilical	
BOSC 23	Humano	Riñón transformado con adenovirus 5 DNA	97
BW5147	Ratón	Linfoma de células T	16
B16F10	Ratón	Melanoma	80
RBL2H3	Rata	Leucemia basófila	40



**Figura 1: Expresión de proteína GFP en 293 transformada con CANFAST.** En la línea celular 293 el CANFAST produce hasta un 99% de transfección con un plásmido portador de la proteína fluorescente GFP.

## FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Existen varios factores que pueden afectar la eficiencia de transfección. Estos pueden ser:

- La relación CANFAST / DNA óptima es específica para cada tipo de célula.
- Se requiere un DNA de alta calidad: libre de endotoxinas para células sensibles a endotoxinas y con una relación 260/280 de 1,8-2,0.
- Las células deben estar en óptimas condiciones de cultivo como son: presentar su morfología característica y estar en crecimiento exponencial.
- Los tampones para la dilución del CANFAST y del DNA deben ser libres de suero porque CANFAST podría unirse a proteínas del suero antes de formar los complejos CANFAST/DNA. Sin embargo, este reactivo no se afecta por la presencia de suero durante la transfección, por lo cual los complejos CANFAST/DNA pueden ser directamente añadidos al medio celular completo.
- Si la línea celular es muy sensible, los complejos de transfección pueden ser eliminados después de 3-4 horas de añadir los complejos sin que se vea afectada la eficiencia de transfección. A continuación se debe añadir medio con suero al cultivo.
- Para la transfección estable, se recomiendan las placas de 6 pocillos y las cajas de 35mm para desarrollar la transfección génica de acuerdo al protocolo descrito más adelante. Las células pueden ser seleccionadas a las 24-48 horas después de la transfección.

## PROCOLOS

### I. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA TRANSFECCIÓN ESTABLE O TRANSIENTE DE CÉLULAS ADHERENTES

#### (1) Sembrar las células

Para obtener una eficiencia de transformación óptima con CANFAST, la densidad celular debe ser de entre un 60-80% de confluencia el día de la transfección. Las células se siembran 18-24 horas antes de la transfección génica y el número de células que debe sembrarse dependerá del crecimiento de las mismas y del tiempo que requieran para adherirse. Sin embargo, en la mayoría de los casos, pueden obtenerse resultados similares si la transfección se desarrolla algunas horas después de haber sembrado las células, siempre y cuando las células se hayan adherido. No es necesario cambiarle el medio al cultivo celular para hacer la transfección porque CANFAST es resistente al suero y demás aditivos del medio de cultivo.

La tabla 2 muestra el número de células recomendadas para sembrar en diferentes placas y cajas de cultivos celulares.

Tabla 2. Números de células adherentes recomendados para ser sembrados en diferentes cajas/placas de cultivo celular para transfectar con CANFAST			
Tipo de placa/caja	Área de cultivo (mm <sup>2</sup> )	Número de células (24 h antes)*	Volumen final de medio en el cultivo (mL)
Placa 96 pocillos	50	1,5-5,0·10 <sup>4</sup>	0,1
Placa 48 pocillos	100	3,0·10 <sup>4</sup> -1,0·10 <sup>5</sup>	0,2
Placa 24 pocillos	200	6,0·10 <sup>4</sup> -2,0·10 <sup>5</sup>	0,5
Placa 12 pocillos	401	1,2-4·10 <sup>5</sup>	1
Placa 6 pocillos	962	2,5-8,0·10 <sup>5</sup>	2
Caja 35 mm	962	2,5-8,0·10 <sup>5</sup>	2
Caja 60 mm	2827	7,5·10 <sup>5</sup> -2,5·10 <sup>6</sup>	6
Caja 100 mm	7854	1,2-4·10 <sup>6</sup>	10

\* El número de células a sembrar es orientativo

(2) Preparación de la mezcla de transfección

- Preparar la solución de DNA según las placas de cultivo a emplear (ver la tabla 3).
- Preparar la solución de CANFAST según las placas de cultivo a emplear (ver la tabla 3).
- Preparar la mezcla de transfección: Añadir por goteo la solución de CANFAST a la solución de DNA que debe estar agitándose suavemente a la vez con un vortex.
- Incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente la mezcla de transfección.
- Añadir la mezcla CANFAST/DNA a cada pocillo mientras se agita suavemente la placa de cultivo.
- Incubar las células a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. La eficiencia de transfección del gen reportado puede ser analizada a las 24-48 horas después de añadir la mezcla de transfección a las células.

En la siguiente tabla se indican las cantidades recomendadas de DNA y de CANFAST para cada tipo de material de cultivo.

Tabla 3. Cantidad de CANFAST y de DNA recomendados en diferentes placas/cajas de cultivos celulares					
Caja/placa	Solución DNA		Solución CANFAST		V(mezcla transfección) (μL)
	DNA (μg)	V(soln. DNA) (μL)	CANFAST (μL)	V(soln.CANFAST) (μL)	
Placa 96 pocillos	0,15	7,5	0,2-0,5	7,5	15
Placa 48 pocillos	0,3	15	0,5-0,9	15	30
Placa 24 pocillos	0,6	30	1-2	30	60
Placa 12 pocillos	1	50	1-3	50	100
Placa 6 pocillos	2	100	3-7	100	200
Caja 35 mm	2	100	3-7	100	200
Caja 60 mm	6	300	9-18	300	600
Caja 100 mm	16	800	24-48	800	1600

Para ejemplificar los pasos anteriores, consideremos la preparación de las soluciones de DNA y de CANFAST para obtener la mezcla de transfección de células cultivadas en placa de 24 pocillos:

- Preparar la solución de DNA: Diluir 0,6μg DNA plasmídico en 30μl DMEM (Biowhittaker™ Cat.No. BE 12-C14F) libre de suero y antibióticos. Mezclar suavemente.
- Preparar la solución de CANFAST: Diluir 1-2μl CANFAST en 30μl DMEM libre de suero y antibióticos. Mezclar suavemente.

En la dilución del DNA y del reactivo de transfección también pueden ser usados el medio de cultivo Opti-MEM® (Invitrogen), el medio de cultivo propio de las células que se van a transformar sin aditivos, el buffer PBS o 150mM NaCl.

- Preparar la mezcla de transfección: Añadir por goteo los 30μl solución de CANFAST a los 30μl solución de DNA que deben estar agitándose suavemente por vortex mientras se mezclan. El volumen final de la mezcla de transfección será de 60μl.

El orden para mezclar las dos soluciones es muy importante para los resultados de transformación génica. No invertir el orden.

- Incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente la mezcla de transfección.
- Añadir los 60μl mezcla de transfección a cada pocillo agitando suavemente la placa de cultivo.
- Incubar las células a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. La eficiencia de transfección del gen reportado puede ser analizada a las 24-48 horas después de añadir la mezcla de transfección a las células.

## II. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA TRANSFECCIÓN ESTABLE O TRANSIENTE DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

### (1) Sembrar las células

En este caso la transfección puede hacerse una hora después de haber sembrado las células. El número de células que debemos sembrar en cada tipo de material de cultivo depende del crecimiento celular y de las condiciones específicas que requiera el cultivo. Se propone una tabla orientativa sobre el número de células que puede sembrarse para cada caso.

Tipo de placa/caja	Área de cultivo (mm <sup>2</sup> )	Número de células (el día de la transfección)*	Volumen final de medio en el cultivo (ml)
Placa 96 pocillos	50	0,5-2,5·10 <sup>4</sup>	0,1
Placa 48 pocillos	100	1,0-5·10 <sup>4</sup>	0,2
Placa 24 pocillos	200	2,0·10 <sup>4</sup> -1,0·10 <sup>5</sup>	0,5
Placa 12 pocillos	401	4,0·10 <sup>4</sup> -2,0·10 <sup>5</sup>	1
Placa 6 pocillos	962	1,0-5,0·10 <sup>5</sup>	2
Caja 35 mm	962	1,0-5,0·10 <sup>5</sup>	2
Caja 60 mm	2827	3,0·10 <sup>5</sup> -1,5·10 <sup>6</sup>	6
Caja 100 mm	7854	8,5·10 <sup>5</sup> -4,0·10 <sup>6</sup>	10

\* Si la transfección se va a realizar el día siguiente, sembrar las células de forma tal que el día de la transfección el número de células sea el indicado.

### (2) Preparación de la mezcla de transfección

Se prepararán las soluciones de DNA y de CANFAST y la mezcla de transfección igual que como se preparan para el caso de células adherentes, anteriormente explicado. Se analizará la eficiencia de transfección 24-48 horas después de haber realizado la transfección.

## III. PROTOCOLO ESPECÍFICO RECOMENDADO PARA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CHO-K1 (DSMZ No. ACC110, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de); ATCC No. CCL-61, [www.atcc.org](http://www.atcc.org); ECACC No. 85051005, [www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk))

La línea celular CHO puede ser transfectada con CANFAST exitosamente consiguiéndose más de un 85% de transformación (ver la figura 2). El protocolo recomendado para la transfección con CANFAST es el siguiente:

- El día de antes de la transfección sembrar en placa de 6 pocillos 150.000 células por pocillo con 2ml medio de cultivo completo e incubar el cultivo 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- El día de la transfección no es necesario cambiarle el medio a las células. Comprobar al microscopio invertido la morfología de las células. No emplear células cuya morfología no sea la típica para las células CHO ya que los resultados pueden ser diferentes a los esperados. **Preparar las soluciones de DNA y de CANFAST:**
  - En un vial de 1,5ml añadir 2µg DNA plasmídico a transfectar y añadir medio Ham's F12 (Biowhittaker Cat.No.BE12-615F) sin aditivos hasta un volumen final de 100µl. Agitar golpeando suavemente con los dedos el fondo del vial. Si fuera a hacer cotransformación deberá optimizar en su caso la relación de plásmidos que debe utilizar.
  - en otro vial de 1,5ml añadir 7µl CANFAST y 93µl medio Ham's F12 sin aditivos. Agitar golpeando suavemente con los dedos el fondo del vial.
- Preparar la mezcla de transfección** añadiendo por goteo los 100µl solución de CANFAST (preparados en b.2) sobre los 100µl solución de DNA (preparados en b.1) agitando suavemente por vortex durante la mezcla. *El orden para mezclar las dos soluciones es muy importante para los resultados de transformación génica. No invertir el orden.*
- Incubar** la mezcla de transfección 20 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir los 200µl mezcla de transfección** al pocillo por goteo moviendo la placa suavemente.
- Incubar la placa 48 horas** a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y analizar después la eficiencia de transfección.

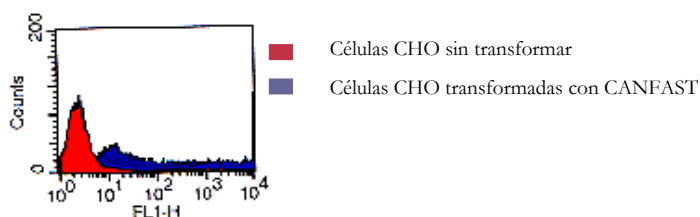


Figura 2: Expresión de proteína GFP en CHO transformada con CANFAST. En la línea CHO CANFAST produce hasta un 85% de transfección con un plásmido portador de la proteína fluorescente GFP.

**IV. PROTOCOLO ESPECÍFICO RECOMENDADO PARA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293** (DSMZ No. ACC305, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de); ATCC No. CRL-1573, [www.atcc.org](http://www.atcc.org); ECACC No. 85120602, [www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk))

La línea celular 293 puede ser transfectada con CANFAST exitosamente consiguiéndose hasta un 99% de transformación (ver la figura 1). El protocolo que recomendamos para estas células es el siguiente:

- a) Sembrar el día de antes de la transfección en placa de 6 pocillos 300.000 células por pocillo con 2ml medio de cultivo completo e incubar el cultivo 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir que las células se adhieran.
- b) En el día de la transfección no retirarle el medio a las células. Comprobar al microscopio invertido la morfología de las células. No emplear células cuya morfología no sea la típica para las células 293 ya que los resultados pueden ser diferentes a los esperados. **Preparar las soluciones de DNA y de CANFAST:**
  - b.1- En un vial de 1,5ml añadir 2µg DNA plasmídico a transfectar y añadir medio DMEM sin aditivos hasta un volumen final de 100µl. Agitar golpeando suavemente con los dedos el fondo del vial. Si fuera a hacer cotransformación deberá optimizar en su caso la relación de plásmidos que debe utilizar.
  - b.2- En otro vial de 1,5ml añadir 7µl CANFAST y añadir 93µl medio DMEM sin aditivos. Agitar golpeando suavemente con los dedos el fondo del vial.
- c) **Preparar la mezcla de transfección** añadiendo por goteo los 100µl solución de CANFAST (preparados en b.2) sobre los 100µl solución de DNA (preparados en b.1) agitando suavemente por vortex durante la mezcla.  
*El orden para mezclar las dos soluciones es muy importante para los resultados de transformación génica. No invertir el orden.*
- d) **Incubar** la mezcla de transfección 20 minutos a temperatura ambiente.
- e) **Añadir los 200µl mezcla de transfección** al pocillo por goteo moviendo la placa suavemente.
- f) **Incubar la placa 48-72 horas** a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y analizar después la eficiencia de transfección.

Para la transformación de las células CHO y 293 es aconsejable que los plásmidos sean libres de endotoxinas para obtener mejores porcentajes de transfección. Recomendamos el *kit de purificación de DNA plásmido ultrapuro de MBL* (Cat.No.MBL054-056), o el *Kit de purificación de DNA plásmido libre de endotoxinas de MBL* (Cat.No.MBL057-058).

**POSIBLES PROBLEMAS Y SOLUCIONES RECOMENDADAS**

Tabla 5. Posibles problemas de transfección y soluciones recomendadas	
Problemas	Soluciones
<b>Baja eficiencia de transfección</b>	1. Usar una cantidad óptima de DNA.
	2. Usar DNA de alta calidad: - Relación 260/280 entre 1,8-2,0 - Libre de endotoxinas
	3. La densidad y la morfología de las células tiene que ser óptima.
	4. Optimizar la relación CANFAST/DNA.
	5. Utilizar algún control positivo de la transfección: plásmido con gen fluorescente (GFP u otro), luciferasa o cualquier otro sistema reportero.
<b>Toxicidad celular</b>	1. Cerciorarse de la ausencia de micoplasmas en el cultivo ya que el estado de las células influye en la citotoxicidad. Recomendamos el <i>kit de determinación de micoplasma de MBL</i> (Cat.No.MBL151)
	2. Aumentar la densidad celular, ya que si la densidad celular no es la óptima, aumenta la citotoxicidad.
	3. Disminuir la cantidad de plásmido, manteniendo constante la relación CANFAST/DNA.
	4. Reducir el tiempo de incubación si trabaja con líneas celulares especialmente sensibles.
	5. Comprobar si el plásmido codifica para una proteína tóxica para las células.
	6. Usar plásmidos libres de endotoxinas.