

K2[®] Transfection System

DNA & RNA Transfektionskit für Säugerzellen

Bestellinformationen, SDB, Publikationen und Anwendungsbeispiele unter www.biont.com

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
K2 [®] Transfection System	T060-0.2	K2 [®] Transfection Reagent 1x0.2 ml K2 [®] Multiplier 1x1 ml
K2 [®] Transfection System	T060-0.75	K2 [®] Transfection Reagent 1x0.75 ml K2 [®] Multiplier 1x3.25 ml
K2 [®] Transfection System	T060-1.0	K2 [®] Transfection Reagent 1x1.5 ml K2 [®] Multiplier 1x6.5 ml
K2 [®] Transfection System	T060-2.0	K2 [®] Transfection Reagent 2x1.5 ml K2 [®] Multiplier 2x6.5 ml
K2 [®] Transfection System	T060-5.0	K2 [®] Transfection Reagent 5x1.5 ml K2 [®] Multiplier 5x6.5 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: K2[®] Reagenz bei 4°C, K2[®] Multiplier bei 4°C (**nicht einfrieren**)

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label.

Liposomenformulierungen wie das K2[®] Transfection **Reagent** verändern bei sehr langer Lagerung bei 4°C ihre Größenverteilung. Dies verringert die Transfektionseffizienz in geringem Maße. Durch einen Einfrier-/Auftauprozess kann dieser Effekt rückgängig gemacht werden. Wir empfehlen daher das Reagenz (nicht den K2[®] Multiplier) vor der ersten Anwendung und anschließend alle 4 Wochen einem Einfrier-/Auftauprozess zu unterziehen, um optimale Resultate zu erzielen.

Gebrauch: Nur für Forschungszwecke *in vitro*, nicht geeignet zur diagnostischen, therapeutischen oder anderen klinischen Anwendung an Mensch oder Tier.

Beschreibung

Eukaryotische Zellen können durch das angeborene Immunsystem zellfremde Substanzen wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, bakterielle oder virale Nukleinsäuren und Proteine detektieren und gegen das Eindringen von potenziellen Pathogenen Abwehrmaßnahmen ergreifen. Darüber hinaus wird die Anwesenheit eventuell zellschädigender Substanzen den benachbarten Zellen über Botenstoffe mitgeteilt. Auch die Transfektion unterliegt grundsätzlich diesen zellspezifischen Abwehrmechanismen, die zu einer erheblichen Reduzierung der Transfektionseffizienz führen können.

Das K2[®] Transfection System besteht aus dem K2[®] Transfection Reagent auf Basis leistungsfähiger kationischer Lipide und dem K2[®] Multiplier, der die Fähigkeit der Zellen fremde Nukleinsäuren detektieren zu können einschränkt und so die Transfektionseffizienz steigern kann.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikationen	3
1.2 Lagerung	3
1.3 Zustand der Zellen	3
1.4 Konfluenz der Zellen	3
1.5 Qualität der Nukleinsäuren	4
1.6 Adsorptionsprozesse	4
2. Arbeitsanleitungen	5
2.1 Arbeitsschema	5
2.2 Transfektion von Zellen mit DNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format -	6
2.3 Optimierungsprotokoll für die DNA Transfektion im 48-Well-Format	7
2.4 Transfektion von Zellen mit mRNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format -	9
2.5 Optimierungsprotokoll für die mRNA Transfektion im 48-Well-Format	9
2.6 Transfektion von Zellen mit mi/siRNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format -	11
2.7 Up- und Downscale	12
3. Erläuterungen	14
3.1 Bedeutende Optimierungsparameter	14
Auszusäende Zellmengen	14
Verhältnis von Nukleinsäure zum Transfektionsreagenz	14
Quantität des Transfektionskomplexes	14
Serumeffekte	14
3.2 Troubleshooting	15
4. Sonstiges	15
4.1 Wichtige Informationen	15
4.2 Gewährleistung	15

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikationen

Anwendung	Transfektion von Säugerzellen mit DNA und RNA
Assays	500 - 1850 (48-Well) mit 1,5ml K2 [®] Transfection Reagent
Sterilität*	getestet
Zellkultur**	getestet
Lagerung	4°C

* Thioglykolattest

** Standardtransfektionstest

1.2 Lagerung

Das K2[®] Transfection System wird **ungekühlt geliefert und alle Einzelkomponenten sollten nach Erhalt im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden**. Eine Lagerung über mehrere Tage bei Raumtemperatur stellt kein Problem dar, solange die Komponenten danach wieder bei 4°C aufbewahrt werden. Einfrier- und Auftauprozesse schaden den Komponenten nicht. Im Gegenteil, es kann dadurch eine mit der Zeit sich leicht verändernde Größenverteilung der Liposomen im K2[®] Transfection Reagent wieder optimiert werden.

1.3 Zustand der Zellen

Gut proliferierende und gesunde Zellen sind am besten transfizierbar. Daher sind regelmäßig passagierte Zellen eine wesentliche Voraussetzung für erfolgreiche Transfektionsexperimente. Mikrobielle Kontaminationen, insbesondere Mykoplasmen können Transfektionsergebnisse stark negativ beeinflussen.

1.4 Konfluenz der Zellen

Jede Zell-Linie zeigt einen spezifischen optimalen Mengenbereich bezüglich der Nukleinsäuren, optimale DNA – Lipid –Mengenverhältnisse, optimale mRNA – Lipid -Mengenverhältnisse und eine optimale K2[®] Multiplier Konzentration bezogen auf die eingesetzte Zellzahl.

Dabei kann sich die optimale K2[®] Multiplier Konzentration für die DNA Transfektion von der der mRNA Transfektion unterscheiden.

Für die Transfektion mit DNA muss zusätzlich die Proliferationsphase der Zellen berücksichtigt werden. Üblich erhält man beste Ergebnisse bei einer Bedeckung der Wachstumsfläche von 90–100%. In dieser Wachstumsphase proliferieren die Zellen am stärksten und gewährleisten so durch die Auflösung und Neubildung der Kernmembran bei der Zellteilung die zur Expression notwendige Aufnahme der DNA in den Zellkern.

Die Konfluenz adhärenter Zellen sollte nicht allein durch optische Einsichtnahme der Wachstumsfläche per Mikroskop bestimmt werden, sondern idealerweise durch Zellzählung und Vergleich einer Wachstumskurve, die für den jeweilige Zelltyp unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen zu erstellen ist.

Optimale DNA Transfektionsergebnisse erreicht man nur bei Zugabe der Lipoplexe während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen. Die Zellteilungsrate ist wesentlich für die Transportrate der DNA in den Zellkern. Für die Transfektion mit mRNA ist die Wachstumsphase von geringerer Bedeutung

1.5 Qualität der Nukleinsäuren

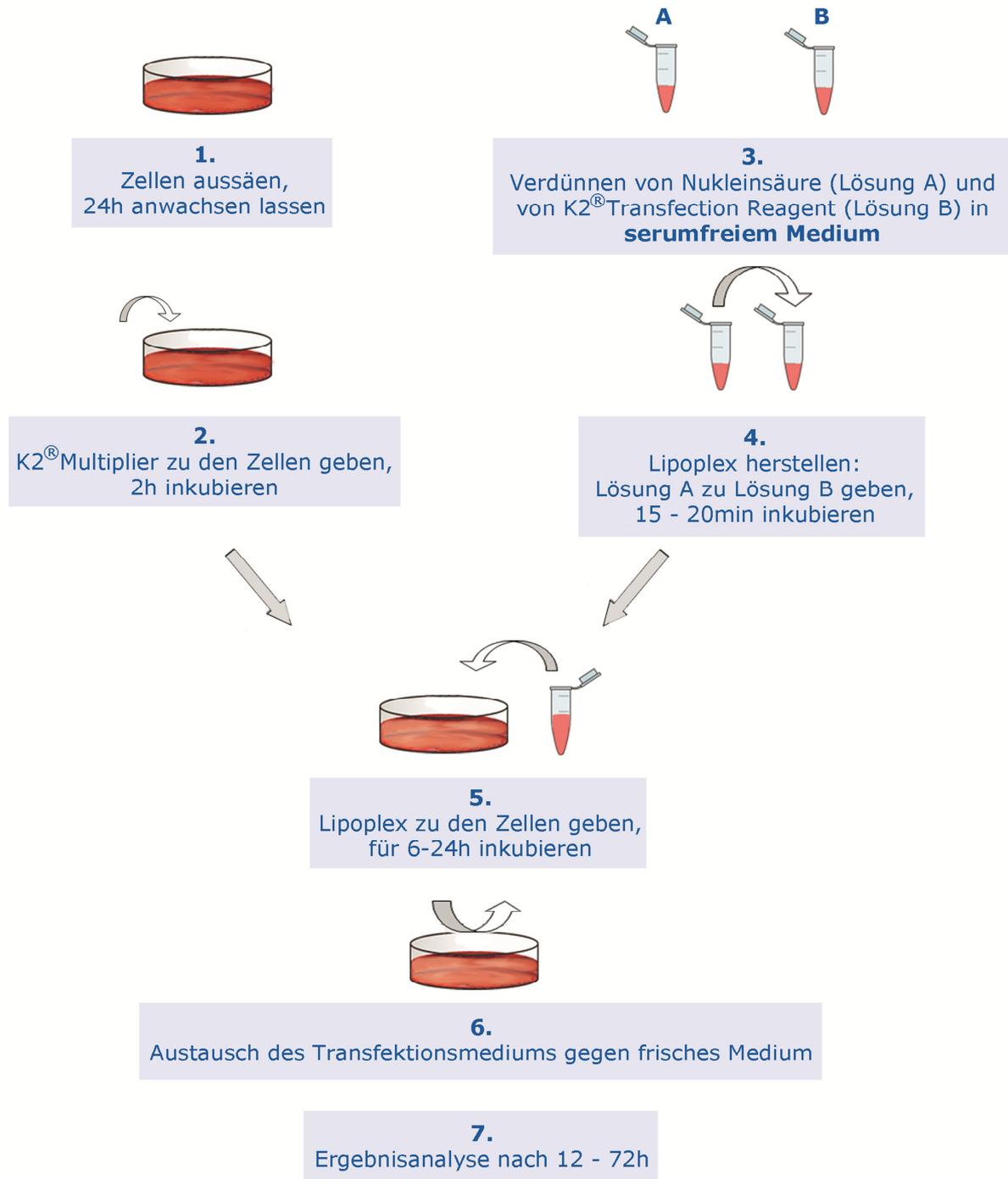
Die Nukleinsäuren sollten zum Erreichen bester Transfektionsergebnisse von höchstmöglicher Reinheit sein. Insbesondere Verunreinigungen bakterieller Herkunft, wie Endotoxine, beeinträchtigen die Transfektionseffizienz erheblich.

1.6 Adsorptionsprozesse

Die Nukleinsäuren sowie das K2[®] Transfection Reagent sollten nicht länger als 5 min in verdünnter Form vor deren Gebrauch zur Komplexbildung in den Gefäßen belassen werden. Durch eine Adsorption der Nukleinsäuren und der Lipide am Behältermaterial kann es zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz kommen. Aus dem gleichen Grund sollte der Lipoplex unmittelbar nach der angegebenen Inkubationszeit auf die Zellen gegeben werden. Die Adsorptionsprozesse erschweren auch Down- und Upscaleprozesse aufgrund unterschiedlicher Verhältnisse der Plastikoberflächen zu den Medienvolumina in den verschiedenen großen Kulturgefäßen.

2. Arbeitsanleitungen

2.1 Arbeitsschema



2.2 Transfektion von Zellen mit DNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format –

1. Plattieren Sie $0.75 - 1.25 \times 10^5$ adhärente Zellen (Startpunkt 1.0×10^5) oder 2.0×10^5 Suspensionszellen in ein einzelnes Well einer 48-Well-Kulturschale in 0.25 ml geeignetem, vollständigem Wachstumsmedium aus.*
2. Inkubieren Sie die Zellen für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator. Bei adhärenen Zellen sollte dann die Wachstumsfläche zu 90–100% bedeckt sein.



Für Erstapplikationen raten wir zur Anwendung des in Kapitel 2.3 beschriebenen Optimierungsprotokolls.

Muss mit geringeren Zelldichten gearbeitet werden, sollte die DNA-Menge und K2[®] Multiplier Menge reduziert werden, da es ansonsten zu toxischen Effekten kommen kann.

3. Bringen Sie die Stocklösungen des K2[®] Transfection Systems und der DNA auf Raumtemperatur und stellen Sie durch sanftes Schütteln sicher, dass die Lösungen homogen sind.
4. Pipettieren Sie 2 h vor der Lipoplexzugabe 2.5 µl K2[®] Multiplier in das Well mit den zu transfizierenden Zellen.
5. Stellen Sie folgende Lösungen in Gefäßen bevorzugt aus Polypropylen her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen.
Lösung **A**: 0.3 µg DNA auf 15 µl **serumfreies** Medium
Lösung **B**: 1.2 µl K2[®] Transfection Reagent auf 15 µl **serumfreies** Medium
6. Mischen Sie die jeweiligen Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Bei klassischen Suspensionszellen, die keine extrazelluläre Matrix besitzen, wie homöopoetische Zellen oder davon abgeleitete Zelllinien, kann für eine erfolgreiche Transfektion die bis zu 10-fache Menge an DNA und K2[®] Transfection Reagent notwendig sein.

7. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren und inkubieren Sie die Mischung bei Raumtemperatur für 15–20 min.
8. Geben Sie den DNA-Lipid-Komplex unmittelbar nach der Inkubationszeit zu den Zellen, mischen Sie vorsichtig durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie in einem CO₂-Inkubator bei 37°C.
9. Entfernen Sie die Transfektionsmischung nach 6–24 h und ersetzen Sie sie durch frisches, vollständiges Wachstumsmedium.
10. Führen Sie einen Test auf Reportergenaktivität durch. Normalerweise erhält man die höchste Expression 24–48 h nach der Lipoplexzugabe.

* Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus ab und eine Mengenoptimierung - idealerweise über die Erstellung einer Wachstumskurve - ist notwendig (siehe 3.1 Bedeutende Optimierungsparameter – Auszusäende Zellmengen).

2.3 Optimierungsprotokoll für die DNA Transfektion im 48-Well-Format

Verwenden Sie ein geeignetes Reportergenplasmid wie z. B. pCMV-βGal, pCMV-Luc, pEGFP etc. Idealerweise liegt Ihnen eine Wachstumskurve zur Ermittlung der optimalen auszusäenden Zellzahl vor. Zum Zeitpunkt der Lipoplexzugabe muss die höchste Proliferationsrate der Zellen erreicht sein.

1. Plattieren Sie $0.75 - 1.25 \times 10^5$ Zellen (Startpunkt 1.0×10^5) pro Well in einer 48-Well-Kulturschale in 0.25 ml geeignetem vollständigen Wachstumsmedium aus. Für Suspensionszellen verwenden Sie als Startpunkt 2.0×10^5 Zellen.*
2. Inkubieren Sie die Zellen für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator. Bei adhärenenten Zellen sollte die Wachstumsfläche dann zu 90–100% bedeckt sein.

Muss mit geringeren Zelldichten gearbeitet werden, sollte die DNA-Menge und K2® Multiplier Menge reduziert werden, da es ansonsten zu toxischen Effekten kommen kann.

3. Bringen Sie das K2® Transfection Reagent, den K2® Multiplier und die DNA-Lösung auf Raumtemperatur und gewährleisten Sie durch sanftes Schütteln die Homogenität der Lösungen.
4. Geben Sie den K2® Multiplier 2 h vor der eigentlichen Lipoplexzugabe zu den Zellen. Dabei werden jeweils 2.5 µl K2® Multiplier in die Reihen C und D, 5 µl in die Reihen E und F gegeben. Die Reihen A und B bleiben unbehandelt.
5. Stellen Sie folgende Lösungen in Gefäßen bevorzugt aus Polypropylen her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und DNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen:

Lösung A :	20 µg DNA auf 1000µl serumfreies Medium
Lösung B(1:2) :	9 µl K2® Transfection Reagent auf 225 µl serumfreies Medium
Lösung B(1:3) :	13.5 µl K2® Transfection Reagent auf 225 µl serumfreies Medium
Lösung B(1:4) :	18 µl K2® Transfection Reagent auf 225 µl serumfreies Medium
Lösung B(1:5) :	22.5 µl K2® Transfection Reagent auf 225 µl serumfreies Medium

6. Mischen Sie die jeweiligen Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
7. Pipettieren Sie jeweils 225 µl von **A** zu den jeweiligen **B**-Lösungen, mischen Sie die Lösungen durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren und inkubieren Sie die Mischungen bei Raumtemperatur für 15–20 min.
8. Geben Sie die DNA-Lipid-Komplexe unmittelbar nach der Inkubationszeit zu den Zellen:

20 µl, 30 µl, 40 µl und 50 µl von **A B(1:2)** auf A1-A4, C1-C4 und E1-E4
20 µl, 30 µl, 40 µl und 50 µl von **A B(1:3)** auf A5-A8, C5-C8 und E5-E8
20 µl, 30 µl, 40 µl und 50 µl von **A B(1:4)** auf B1-B4, D1-D4 und F1-F4
20 µl, 30 µl, 40 µl und 50 µl von **A B(1:5)** auf B5-B8, D5-D8 und F5-F8

Mischen Sie vorsichtig durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie in einem CO₂-Inkubator bei 37°C.

* Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus ab und eine Mengenoptimierung - idealerweise über die Erstellung einer Wachstumskurve - ist notwendig (siehe 3.1 Bedeutende Optimierungsparameter – Auszusäende Zellmengen).

Es befinden sich nun folgende Kombinationen auf der 48-Well-Platte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	0.2 μg 1:2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.3 1:2	0.4 1:2	0.5 1:2	0.2 1:3	0.3 1:3	0.4 1:3	0.5 1:3	0 μl K2® Multiplier pro Well
B	0.2 1:4	0.3 1:4	0.4 1:4	0.5 1:4	0.2 1:5	0.3 1:5	0.4 1:5	0.5 1:5	
C	0.2 1:2	0.3 1:2	0.4 1:2	0.5 1:2	0.2 1:3	0.3 1:3	0.4 1:3	0.5 1:3	2.5 μl K2® Multiplier pro Well
D	0.2 1:4	0.3 1:4	0.4 1:4	0.5 1:4	0.2 1:5	0.3 1:5	0.4 1:5	0.5 1:5	
E	0.2 1:2	0.3 1:2	0.4 1:2	0.5 1:2	0.2 1:3	0.3 1:3	0.4 1:3	0.5 1:3	5 μl K2® Multiplier pro Well
F	0.2 1:4	0.3 1:4	0.4 1:4	0.5 1:4	0.2 1:5	0.3 1:5	0.4 1:5	0.5 1:5	

DNA-Menge in [μg],

DNA/K2® Transfection Reagent -Verhältnis in [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]

K2® Multiplier Volumen in [μl]

9. Entfernen Sie die Transfektionsmischung nach 6–24 h und ersetzen Sie sie durch frisches vollständiges Wachstumsmedium.
10. Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität durch. Normalerweise erhält man die höchste Expression 24–48 h nach der Lipoplexzugabe.

2.4 Transfektion von Zellen mit mRNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format –

1. Plattieren Sie 0.5×10^5 adhärenente Zellen oder 1.5×10^5 Suspensionszellen in ein einzelnes Well einer 48-Well-Kulturschale in 0.25 ml geeignetem, vollständigen Wachstumsmedium aus.
2. Inkubieren Sie die Zellen für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator.
3. Bringen Sie die Stocklösungen des K2[®] Transfection Systems und der mRNA auf Raumtemperatur und stellen Sie durch sanftes Schütteln sicher, dass die Lösungen homogen sind.
4. Pipettieren Sie 2 h vor der Lipoplexzugabe 1.5 µl K2[®] Multiplier in das Well mit den zu transfizierenden Zellen.
5. Stellen Sie folgende Lösungen in Gefäßen bevorzugt aus Polypropylen her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit die Reagenz- und mRNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen.



Für Erstapplikationen raten wir zur Anwendung des in Kapitel 2.5 beschriebenen Optimierungsprotokolls.

Lösung A: 0.4 µg mRNA auf 15 µl **serumfreies** Medium

Lösung B: 0.8 µl K2[®] Transfection Reagent auf 15 µl **serumfreies** Medium

6. Mischen Sie die jeweiligen Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
7. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren und inkubieren Sie die Mischung bei Raumtemperatur für 15–20 min.
8. Geben Sie den mRNA-Lipid-Komplex unmittelbar nach der Inkubationszeit zu den Zellen, mischen Sie vorsichtig durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie in einem CO₂-Inkubator bei 37°C.
9. Entfernen Sie die Transfektionsmischung nach 6–24 h und ersetzen Sie sie durch frisches, vollständiges Wachstumsmedium.
10. Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität durch. Normalerweise erhält man die höchste Expression 12–72 h nach der Lipoplexzugabe.

2.5 Optimierungsprotokoll für die mRNA Transfektion im 48-Well-Format

Verwenden Sie eine geeignete mRNA, die für ein Reportergen wie z. B. βGal, Luc, GFP etc. codiert.

1. Plattieren Sie 0.5×10^5 adhärenente Zellen pro Well in einer 48-Well-Kulturschale in 0.25 ml geeignetem vollständigen Wachstumsmedium aus. Für Suspensionszellen verwenden Sie als Startpunkt 1.5×10^5 Zellen.
2. Inkubieren Sie die Zellen für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator.
3. Bringen Sie das K2[®] Transfection Reagent, den K2[®] Multiplier und die RNA-Lösung auf Raumtemperatur und gewährleisten Sie durch sanftes Schütteln die Homogenität der Lösungen.
4. Geben Sie den K2[®] Multiplier 2 h vor der eigentlichen Lipoplexzugabe zu den Zellen. Dabei werden jeweils 1.5 µl K2[®] Multiplier in die Reihen B und E und 3.0 µl in die Reihen C und F gegeben.
5. Stellen Sie folgende Lösungen in Gefäßen bevorzugt aus Polypropylen her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit Reagenz- und RNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen:

- Lösung **A**: 30 µg mRNA auf 700µl **serumfreies** Medium
 Lösung **B(1:2)**: 30 µl K2® Transfection Reagent auf 330 µl **serumfreies** Medium
 Lösung **B(1:3)**: 44 µl K2® Transfection Reagent auf 330 µl **serumfreies** Medium

- Mischen Sie die jeweiligen Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
- Pipettieren Sie jeweils 350 µl von **A** zu den jeweiligen **B**-Lösungen, mischen Sie die Lösungen durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren und inkubieren Sie die Mischungen bei Raumtemperatur für 15–20 min.
- Geben Sie die mRNA-Lipid-Komplexe unmittelbar nach der Inkubationszeit zu den Zellen:

10 µl, 15 µl, 20µl, 25µl, 30µl, 35µl, 40 µl und 45 µl von **A B(1:2)** auf A1-C8
 10 µl, 15 µl, 20µl, 25µl, 30µl, 35µl, 40 µl und 45 µl von **A B(1:3)** auf D1-F8

Mischen Sie vorsichtig durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie in einem CO₂-Inkubator bei 37°C.

Es befinden sich nun folgende Kombinationen auf der 48-Well-Platte:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.2 µg 0 µl	0.3 0	0.4 0	0.5 0	0.6 0	0.7 0	0.8 0	0.9 0
B	0.2 1.5	0.3 1.5	0.4 1.5	0.5 1.5	0.6 1.5	0.7 1.5	0.8 1.5	0.9 1.5
C	0.2 3.0	0.3 3.0	0.4 3.0	0.5 3.0	0.6 3.0	0.7 3.0	0.8 3.0	0.9 3.0
D	0.2 0	0.3 0	0.4 0	0.5 0	0.6 0	0.7 0	0.8 0	0.9 0
E	0.2 1.5	0.3 1.5	0.4 1.5	0.5 1.5	0.6 1.5	0.7 1.5	0.8 1.5	0.9 1.5
F	0.2 3.0	0.3 3.0	0.4 3.0	0.5 3.0	0.6 3.0	0.7 3.0	0.8 3.0	0.9 3.0

mRNA:K2® Transfection Reagent - Verhältnis

1:2 [µg/µl]

mRNA:K2® Transfection Reagent - Verhältnis

1:3 [µg/µl]

mRNA-Menge in [µg],
 K2® Multiplier Volumen in [µl]
 mRNA/ K2® Transfection Reagent -Verhältnis in [µg/µl]

- Entfernen Sie die Transfektionsmischung nach 6–24 h und ersetzen Sie sie durch frisches vollständiges Wachstumsmedium.
- Führen Sie einen Test auf Reporteragenaktivität durch. Normalerweise erhält man die höchste Expression 12–72 h nach der Lipoplexzugabe.

2.6 Transfektion von Zellen mit mi/siRNA – ein Standardprotokoll für das 48-Well-Format –

1. Plattieren Sie 0.5×10^5 adhärenente Zellen oder 1.5×10^5 Suspensionszellen in ein einzelnes Well einer 48-Well-Kulturschale in 0.25 ml geeignetem, vollständigen Wachstumsmedium aus.
2. Inkubieren Sie die Zellen für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator.
3. Bringen Sie die Stocklösungen des K2[®] Transfection Systems und der RNA auf Raumtemperatur und stellen Sie durch sanftes Schütteln sicher, dass die Lösungen homogen sind.
4. Stellen Sie folgende Lösungen in Gefäßen bevorzugt aus Polypropylen her. **Legen Sie immer das Medium vor**, damit die Reagenz- und RNA-Lösung nicht direkt mit dem Gefäßmaterial in Kontakt kommen:

Lösung **A**: 0.4 µg mi/siRNA (= ca. 30 pmol) auf 15 µl **serumfreies** Medium

Lösung **B**: 0.8 µl K2[®] Transfection Reagent auf 15 µl **serumfreies** Medium

5. Mischen Sie die jeweiligen Lösungen durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren und inkubieren Sie die Mischung bei Raumtemperatur für 15–20 min.
7. Geben Sie den RNA-Lipid-Komplex unmittelbar nach der Inkubationszeit zu den Zellen, mischen Sie vorsichtig durch Schwenken des Zellkulturgefäßes und inkubieren Sie in einem CO₂-Inkubator bei 37°C.
8. Entfernen Sie die Transfektionsmischung nach 6–24 h und ersetzen Sie sie durch frisches, vollständiges Wachstumsmedium.
9. Führen Sie einen Test auf Reporteragenaktivität durch. Normalerweise erhält man beste Ergebnisse 12–72 h nach der Lipoplexzugabe.

Eine Optimierung kann über die Lipoplexmenge (halbe oder doppelte Menge) und das RNA-Reagenz-Verhältnis erfolgen (z.B. 0.4 µg : 1.2 µl statt 0.4 µg : 0.8 µl).

2.7 Up- und Downscale

Ausgehend von den Standard- oder idealerweise von den optimierten Parametern kann über die allgemeine Flächenproportionalität ein Up- und Downscale erfolgen:

- Die auszusäende Zellmenge pro Well ergibt sich aus der optimierten Zellzahl/cm².*
- Die Konzentration des K2[®] Multiplier (µl K2[®] Multiplier pro µl Kulturvolumen) ist für alle Kulturgefäßformate identisch und ergibt sich aus dem optimierten Wert.
- Einzig die Nukleinsäuremenge erfordert aufgrund der unterschiedlichen Adsorptionsraten an der Gefäßwand und der unterschiedlichen Verhältnisse von Oberfläche zu Volumen eine jeweils gesonderte Anpassung. Verwenden Sie die jeweils angegebenen Multiplikatoren.
- Das Nukleinsäure-Lipid-Verhältnis entspricht für alle Formate dem als optimal gefundenen Wert.
- Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen den vorgeschlagenen Startmengen.

DNA-Transfektion

In Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte.

Kulturplatte	96-Well-Platte	48-Well-Platte	24-Well-Platte	12-Well-Platte	6-Well-Platte	60mm Platte
Wachstumsfläche [cm²]	0.31	1.0	1.9	3.7	9.0	22.0
Ausgesäte Zahl adhärenter Zellen [$\times 10^5$]	0.2-0.4 (0.3)	0.75-1.25 (1.0)	1.5-2.5 (1.9)	3-5 (3.7)	7-11 (9.0)	15-30 (22.0)
Ausgesäte Zahl Suspensionszellen [$\times 10^5$]	0.3-1.3 (0.9)	1.0-4.0 (2.0)	2.0-8.0 (5.7)	4.0-15.0 (11.1)	9.0-36 (27)	22-88 (66)
Kulturvolumen	100µl	250µl	500µl	1ml	2ml	5ml
K2[®] Multiplier Volumen [µl]	0-2.0 (1.0)	0-5 (2.5)	0-10 (5)	0-20 (10)	0-40 (20)	0-50 (50)
Spezifischer Multiplikator	0.5	1.0	1.66	3.33	8.0	20.0
DNA-Menge [µg]	0.1-0.25 (0.15)	0.2 -0.5 (0.3)	0.3-0.8 (0.5)	0.7-1.7 (1)	1.6-4.0 (2.4)	4-10 (6)
K2[®] Transfection Reagent - Menge [µl]	0.2-1.25 (0.6)	0.4-2.5 (1.2)	0.6-4.0 (2.0)	1.4-8.5 (4.0)	3.2-20 (9.6)	8-50 (24)
Serumfreies Medium zur Verdünnung der DNA [µl]	5	15	30	50	130	300
Serumfreies Medium zur Verdünnung des K2[®] Transfection Reagent [µl]	5	15	30	50	130	300

* Auszusäende Zellmengen hängen vom Zelltypus ab und eine Mengenoptimierung - idealerweise über die Erstellung einer Wachstumskurve - ist notwendig (siehe 3.1 Bedeutende Optimierungsparameter – Auszusäende Zellmengen).

mRNA-Transfection

In Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte.

Kulturplatte	96-Well-Platte	48-Well-Platte	24-Well-Platte	12-Well-Platte	6-Well-Platte	60mm Platte
Wachstumsfläche [cm ²]	0.31	1.0	1.9	3.7	9.0	22.0
Ausgesäte Zahl adhärenter Zellen [$\times 10^5$]	0.15	0.5	1.0	1.9	4.5	11
Ausgesäte Zahl Suspensionszellen [$\times 10^5$]	0.5	1.5	2.9	5.6	13.5	33
Kulturvolumen	100µl	250µl	500µl	1ml	2ml	5ml
K2 [®] Multiplier Volumen [µl]	0-1 (0.5)	0-3 (1.5)	0-6.0 (3)	0-12 (6)	0-24 (12)	0-60 (30)
Spezifischer Multiplikator mRNA-Menge [µg]	0.5 0.1-0.5 (0.2)	1.0 0.2-0.9 (0.4)	1.66 0.3-1.5 (0.7)	3.33 0.7-3.0 (1.3)	8.0 1.6-7.0 (3.2)	20.0 4-18 (8)
K2 [®] Transfection Reagent - Menge [µl]	0.2-1.5 (0.4)	0.4-2.7 (0.8)	0.6-4.5 (1.4)	1.4-9.0 (2.6)	3.2-21 (6.4)	8-54 (16)
Serumfreies Medium zur Verdünnung der RNA [µl]	5	15	30	50	130	300
Serumfreies Medium zur Verdünnung des K2 [®] Transfection Reagent [µl]	5	15	30	50	130	300

mi/siRNA-Transfection

In Rundklammern stehen die vorgeschlagenen Startwerte.

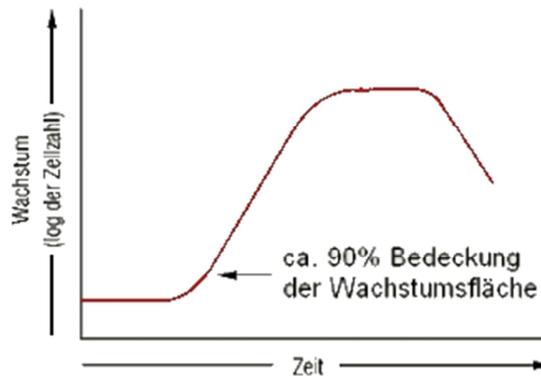
Kulturplatte	96-Well-Platte	48-Well-Platte	24-Well-Platte	12-Well-Platte	6-Well-Platte	60mm Platte
Wachstumsfläche [cm ²]	0.31	1.0	1.9	3.7	9.0	22.0
Ausgesäte Zahl adhärenter Zellen [$\times 10^5$]	0.15	0.5	1.0	1.9	4.5	11
Ausgesäte Zahl Suspensionszellen [$\times 10^5$]	0.5	1.5	2.9	5.6	13.5	33
Kulturvolumen	100µl	250µl	500µl	1ml	2ml	5ml
K2 [®] Multiplier Volumen [µl]	0	0	0	0	0	0
Spezifischer Multiplikator mi/siRNA-Menge [µg] (0.1 µg = ca. 7.5 pmol)	0.5 0.1-0.5 (0.2)	1.0 0.2-0.9 (0.4)	1.66 0.3-1.5 (0.7)	3.33 0.7-3.0 (1.3)	8.0 1.6-7.0 (3.2)	20.0 (4-18) (8)
K2 [®] Transfection Reagent - Menge [µl]	0.2-1.5 (0.4)	0.4-2.7 (0.8)	0.6-4.5 (1.4)	1.4-9.0 (2.6)	3.2-21 (6.4)	8-54 (16)
Serumfreies Medium zur Verdünnung der RNA [µl]	5	15	30	50	130	300
Serumfreies Medium zur Verdünnung des K2 [®] Transfection Reagent [µl]	5	15	30	50	130	300

3. Erläuterungen

3.1 Bedeutende Optimierungsparameter

Auszusäende Zellmengen

Zum Zeitpunkt der DNA - Transfektion muss die höchste erreichbare Proliferationsrate der jeweiligen Zellart gegeben sein. Die auszusäende Zellmenge muss dahin gehend angepasst werden. Idealerweise geschieht dies mit der Ermittlung einer Wachstumskurve.



Typische Wachstumskurve von adhärenenten Zellen.

Zum Zeitpunkt der höchsten Proliferation (= Optimaler Zeitpunkt für die Transfektion) ist die Wachstumsfläche zu 90% bedeckt.

Muss bei geringeren Zelldichten gearbeitet werden, sollte die DNA-Menge und die K2[®] Multiplier Menge entsprechend erniedrigt werden, da ansonsten toxische Effekte auftreten können. Außerdem ist durch die geringere Proliferation mit einer Verminderung der Transfektionseffizienz zu rechnen.

Für die Transfektion von RNA spielt die Proliferationsrate eine untergeordnete Rolle.

Verhältnis von Nukleinsäure zum Transfektionsreagenz

Eine wichtige Einflussgröße ist das Verhältnis von Nukleinsäure zum Transfektionsreagenz. Das optimale Nukleinsäure – K2[®] Transfection Reagent -Verhältnis muss für jede Zellart und Anwendung optimiert werden.

Quantität des Transfektionskomplexes

Jede Zellart besitzt charakteristische Verträglichkeitswerte bezüglich der Lipoplexmenge. Dementsprechend ist für jede Zellart eine Optimierung der Lipoplexmenge bezogen auf die zum Zeitpunkt der Lipoplexgabe vorhandene Zellzahl notwendig.

Speziell bei klassischen Suspensionszellen ohne extrazelluläre Matrix (homöopoetische Zellen oder davon abgeleitete Zelllinien) empfiehlt es sich, die DNA und K2[®]Transfection Reagent Menge um das 5-10-fache anzuheben. Die extrazelluläre Matrix wird von den Lipoplexen als Eintrittspforte für die Endozytose genutzt. Ist keine extrazelluläre Matrix vorhanden oder nur schwach ausgeprägt kann dies durch die Erhöhung der Lipoplexmenge ausgeglichen werden.

Serumeffekte

Bislang sind bei Anwendung des K2[®] Transfection Systems keine negativen Serumeffekte bekannt. In allen Fällen ist aber zu beachten, dass zur **Komplexbildung** unbedingt die Anwesenheit von Serum vermieden werden muss, da es inhibierend wirkt. Ist die Lipoplexbildung abgeschlossen, spielt der Kontakt mit Serum keine Rolle mehr.

3.2 Troubleshooting

Lesen Sie hierzu unsere FAQs zu Transfektion im Web unter <http://www.biontex.com>.

4. Sonstiges

4.1 Wichtige Informationen

Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Forschung und für *in vitro* Anwendungen entwickelt und wird nur für diese Zwecke verkauft. Es darf nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke an Mensch oder Tier angewendet werden.

K2[®] ist eine eingetragene Handelsmarke der Biontex Laboratories GmbH.

4.2 Gewährleistung

Biontex gewährleistet nur dann für die beschriebenen Eigenschaften dieses Produktes bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum, wenn es gemäß der in diesem Manual angegebenen Informationen gelagert und angewendet wurde. Sollten Sie trotzdem mit diesem Produkt nicht zufrieden sein, kontaktieren Sie bitte Biontex Laboratories GmbH.

*Biont*ex Laboratories GmbH
Landsberger Straße 234
im MGH
80687 München/Laim
Germany

Tel.: +49 (0)89 3247995-0
Fax: +49 (0)89 3247995-2
E-Mail: [.com](mailto:contact@biont.com
Internet: <a href=)