

Gebrauchsanweisung



Roti®-Fect

Reagenz zur liposomen-vermittelten Transfektion eukaryontischer Zellen

Produktbeschreibung

Roti®-Fect ist eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Kolipid. Es kondensiert DNA und RNA in kompakte Strukturen (Roti®-Fect/Nukleinsäure-Komplexe) und bewirkt deren hocheffiziente Aufnahme in Säugerzellen. Roti®-Fect zeigt keine Hemmung durch Serum, was ein großer Vorteil bei der Transfektion von sensitiven Zelllinien darstellt. Durch die niedrige Toxizität kann ein weiter Bereich von Zelllinien erfolgreich transfiziert werden.

Verglichen mit monokationischen Lipidformulierungen (z. B. DOTAP) besitzt Roti®-Fect eine höhere Effizienz bei geringerer erforderlicher Menge. Desweiteren kombiniert Roti®-Fect ausgezeichnete Reproduzierbarkeit mit hohem Wirkungsplateau, weshalb keine oder nur wenig Optimierungsarbeit notwendig ist, um hohe Transfektions-effizienzen zu erhalten.

Ein Milliliter Roti®-Fect reicht aus, um 50-200 Transfektionen auf Zellkulturschalen mit 35 mm Durchmesser durchzuführen. Roti®-Fect wird als gebrauchsfertige Lösung geliefert. Es kann bei 4 °C für länger als ein Jahr ohne Effizienzverlust gelagert werden. Es wurde auch gezeigt, dass es für mehrere Wochen bei 40 °C stabil ist.

Stabilität: Bei 4 °C mindestens 6 Monate haltbar.
Kulturmedien: Für serumhaltige und serumfreie Medien geeignet.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5
76185 Karlsruhe
Postfach 100121
76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0)721/5606-0
Telefax: +49 (0)721/5606-149
E-Mail: info@carlroth.de
Internet: www.carlroth.de

s.s. 09/2018

Lagertemperatur: 4 °C
Versand: bei Raumtemperatur
Nur für Forschungszwecke *in vitro*, nicht zur diagnostischen, therapeutischen oder anderer klinischen Anwendung an Mensch oder Tier geeignet.

Anwendungshinweis:
Nicht einfrieren, vor Gebrauch sanft schütteln.

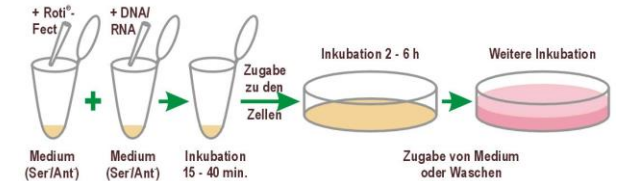
Qualitätskontrolle:
Die Qualität wird durch einen Standardtransfektionstest geprüft. Mittels Thioglycolatlösung wird eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze ausgeschlossen.
Bisher erfolgreich transfizierte Zelllinien:
143B, 293-T, A-293, A-431, AM-C6SC8, BHK, BV-2, C2C12, C6, CHO, CHO-DHFR, COS-1, COS-7, CRFK, Colo-205, DU-145, ECV-304, EMC, F98 (Gliom), GD25-β1, HBL 100, HCT-116, HCT-15, HEK293, HeLa, HeLa-S3, Hep-3B, Hep-G2, HOSE, HSG, HT-22, HT-29, HUVEC, JURKAT, LLC-PK1, LS174T, LoVo, MCF-7, MDCK, MeWo, MV3, NIH-3T3, NS20Y, OK, P815, PC3, PT-11, Rcho-1, SAOS, SH-SY5Y, SK-MEL-28, SKOV-3, SM10, SW-480, THP-1, tsA201, U87 (Gliom), Vero 76, und andere

Arbeitsanleitung

Transfektion von adhärenenten Zellen

- Plattieren Sie 1-3 x 10⁵ Zellen in geeignetem vollständigen Wachstumsmedium in einer 35 mm Kulturschale (6-well) aus.
- Inkubieren Sie die Zellen für 18-24 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator bis sie ca. 50-90 % konfluent sind (die erforderliche Zeit hängt vom Zelltyp ab).
- Bringen Sie die Stocklösungen von Nukleinsäure und Transfektionsreagenz auf Raumtemperatur und vortexen Sie sie sanft.
- Stellen Sie folgende Lösungen in Reaktionsgefäßen her, die aus Glas, Polypropylen oder Polystyrol bestehen:
A: 1-3 µg DNA/RNA in 100 µl Medium, das kein Serum und keine Antibiotika enthält (wir schlagen 2 µg für das erste Experiment vor).
B: 2.5-25 µl Roti®-Fect in 100 µl Medium, das kein Serum und keine Antibiotika enthält (wir schlagen 10 µl für das erste Experiment vor). Mischen Sie die Lösungen jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
Bitte beachten: Die Lösungen müssen frisch angesetzt und sofort verwendet werden. Standzeiten reduzieren die Transfektionseffizienz.
- a.) Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und lassen Sie (bei Raumtemperatur) stehen, damit sich die Nukleinsäure/Lipid-Komplexe bilden können. Dies dauert 15-40 Minuten.
b.) Während der Komplexbildung waschen Sie die Zellen einmal mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) und befüllen Sie die Kulturschale mit 1,5 ml serumhaltigem Medium ohne Antibiotika.
- Geben Sie den Nukleinsäure/Lipid-Komplex zu den Zellen, mischen Sie vorsichtig und inkubieren Sie für 2-6 Stunden bei 37 °C in einem CO₂ Inkubator (wir schlagen 6 Stunden für das erste Experiment vor).

- Bei sehr empfindlichen Zellen sollte nun das Transfektionsmedium entfernt und durch ein vollständiges Kulturmedium ersetzt werden.
- Inkubieren Sie die Zellen mit oder ohne Transfektionskomplex für weitere 15-20 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator.
- Ersetzen Sie das Transfektionsmedium durch frisches, vollständiges Medium.
- Führen Sie einen Test auf Reporterogenaktivität 24-72 Stunden (je nach Zelltyp und Promotoraktivität) nach dem Beginn der Transfektion durch (wir schlagen 24 Stunden für das erste Experiment vor).



Transfektion von Suspensionszellen

- Waschen Sie die Zellen einmal mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung).
- Plattieren Sie 2-3 x 10⁶ Zellen in 1,5 ml geeignetem Wachstumsmedium ohne Antibiotika in einer 35 mm Kulturschale (6-well) aus.
- Bringen Sie die Stocklösungen von Nukleinsäure und Transfektionsreagenz auf Raumtemperatur und vortexen Sie sie sanft.
- Stellen Sie folgende Lösungen in Reaktionsgefäßen her, die aus Glas, Polypropylen oder Polystyrol bestehen:
A: 1-3 µg DNA/RNA in 100 µl Medium, das kein Serum und keine Antibiotika enthält (wir schlagen 2 µg für das erste Experiment vor).
B: 2.5-25 µl Roti®-Fect in 100 µl Medium, das kein Serum und keine Antibiotika enthält (wir schlagen 10 µl für das erste Experiment vor). Mischen Sie die Lösungen jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
Bitte beachten: Die Lösungen müssen frisch angesetzt und sofort verwendet werden. Standzeiten reduzieren die Transfektionseffizienz.
- Vereinigen Sie beide Lösungen, mischen Sie durch vorsichtiges Auf und Abpipettieren und lassen Sie (bei Raumtemperatur) stehen, damit sich die DNA/Lipid-Komplexe bilden können. Dies dauert 15-40 Minuten.
- Geben Sie die den Nukleinsäure/Lipid-Komplex zur Zellsuspension, mischen Sie vorsichtig und inkubieren Sie für 2-6 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (wir schlagen 6 Stunden für das erste Experiment vor).
- Geben Sie 4 ml vollständiges Medium zu. Bei sehr empfindlichen Zellen sollte das Transfektionsmedium entfernt und durch 5 ml vollständiges Kulturmedium ersetzt werden.
- Inkubieren Sie die Zellen mit oder ohne Transfektionskomplex für weitere 18 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator.

- Ersetzen Sie das Transfektionsmedium durch frisches vollständiges Medium.
- Führen Sie einen Test auf Reporteraktivität 24-72 Stunden (je nach Zelltyp und Promotoraktivität) nach dem Beginn der Transfektion durch (wir schlagen 24 Stunden für das erste Experiment vor).

Optimierung

Jede Kombination von Zelllinie und DNA/RNA besitzt einen Satz an optimalen Parametern in Hinblick auf die Transfektionseffizienz. Ein Vorteil von Roti[®]-Fect ist das breite Wirkungsspektrum, so dass normalerweise keine oder nur wenig Optimierung notwendig ist, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten. **In der Regel reicht es, das beste Verhältnis von Roti[®]-Fect und DNA/RNA zu ermitteln.** Dies stellt den wichtigsten Optimierungsparameter dar.

Übersicht der Parameter, die das Transfektionsergebnis beeinflussen:

- Verhältnis von Roti[®]-Fect zu DNA/RNA
- Menge des eingesetzten Transfektionskomplexes
- Konfluenz der Zellen
- Serumkonzentration
- Inkubationszeit mit dem Transfektions-Komplex
- Zeitraum zwischen Transfektion und Test auf Reporteraktivität

Optimierungsstrategie

Die Parameter können nicht unabhängig voneinander Schritt für Schritt optimiert werden. Das optimale Verhältnis Roti[®]-Fect zu DNA/RNA und die optimale Menge an Transfektionskomplex, welche die wichtigsten Parameter darstellen, hängen von der zu transfizierenden Zellzahl und von der Serumkonzentration ab. Es ist vorteilhaft, die Anzahl der ausplattierten Zellen, das Zeitintervall bis zur Transfektion (also die Anzahl der zu transfizierenden Zellen) und die übrigen Bedingungen konstant bei den vorgeschlagenen Werten zu halten. Die DNA/RNA Menge und die Menge an Roti[®]-Fect können dann innerhalb der angegebenen Grenzen variiert werden. Auf diese Art und Weise erhalten Sie reproduzierbare Ergebnisse.

Beispiel:

Plattieren Sie eine festgesetzte Anzahl von Zellen auf drei 6 Well-Platten aus. Folgen Sie der Arbeitsanleitung und verwenden Sie für jede Platte eine unterschiedliche DNA/RNA Menge (z.B. 1, 1,5 und 2 µg DNA/RNA). Innerhalb einer Platte variieren Sie die Roti[®]-Fect Menge innerhalb der angegebenen Grenzen (z.B. 2, 4, 6, 8, 10, 12 µl Roti[®]-Fect). Die Serumkonzentration während der Inkubation mit dem Nukleinsäure/Lipid-Komplex sollte der entsprechen, unter der die Zellen normalerweise kultiviert werden. Ermitteln Sie die optimalen Mengen an DNA/RNA und Roti[®]-Fect durch Reporteraktivitätstests. Wenn weitere Optimierungen erwünscht sind, ändern Sie einzelne Parameter wie z.B. Zellzahl oder Serumkonzentration und wiederholen Sie die Bestimmung der optimalen Mengen an DNA/RNA und Roti[®]-Fect. Nachdem die optimale Zellzahl,

Serumkonzentration, Menge an DNA/RNA und Roti[®]-Fect bestimmt sind, können Sie die Inkubationszeit mit dem Nukleinsäure/Lipid-Komplex und den Zeitraum zwischen Transfektion und Test auf Reporteraktivität variieren.

Reagenzmengen für unterschiedliche Formate

Für die ersten Experimente schlagen wir die in Klammern angegebenen Mengen vor.

Kulturschale Ø (mm)	11 (48 well)	16 (24 well)	22 (12 well)	35 (6 well)	60	100
Fläche pro well (cm ²)	1	1,9	3,9	9,6	28,3	78,5
Ausplattierte Zellzahl (x 10 ⁴)	0,2-0,4	0,3-0,6	0,8-1,3	1-3	5-10	15-25
Medium ohne Antibiotika (ml) (Schritt 5b bzw. 2)	0,16	0,25	0,5	1,5	3	9
DNA/RNA Menge (µg)	0,1-0,5 (0,3)	0,2-1 (0,5)	0,5-2 (1)	1-4 (2)	2-10 (5)	5-20 (10)
Roti [®] -Fect Menge (µl)	0,3-5 (1,5)	0,5-8 (2,5)	1-15 (5)	2,5-25 (10)	4-75 (25)	10-200 (50)
Verdünnungsvol. (µl) für DNA/ RNA und Roti [®] -Fect (Schritt 4)	20	30	50	100	300	600
Vol. des Transfektionsmediums (ml) (Schritt 6)	0,2	0,31	0,6	1,7	3,6	10,2

Trouble Shooting

Mögl. Ursache	Kommentar
Niedrige Transfektionseffizienz	
Schlechte Qualität der DNA/RNA	Die DNA sollte für optimale Transfektionsergebnisse einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen
Die Zellen befinden sich nicht in der Wachstumsphase oder sind nicht gesund	Zellen, die zu lange konfluent waren, lassen sich schwerer transfizieren als schnell wachsende Zellen. Es wird daher empfohlen, regelmäßig passagierte Zellen für Transfektionsexperimente einzusetzen.
Konfluenz der Zellen zu hoch	Ist die Konfluenz der Zellen während der Transfektion zu hoch, kann es zu einer Verringerung der Aufnahmefähigkeit der Zellen kommen.
Serumkonzentration falsch	Die Transfektion kann unter Serumreduzierten Bedingungen durchgeführt werden (5 % - 0 %)
Nukleinsäure zu lang in serum-freiem Medium vor Transfektion	Endotoxine verringern erheblich die Transfektionseffizienz. Nukleinsäure sollte vor Gebrauch max. 5 min. in serumfreiem Medium aufbewahrt werden.
Transfektionszeit zu kurz	Eine Verlängerung der Transfektionszeit bis auf insges. 2 Tage ist bei unempfindlichen Zellen möglich.
Zellen zu alt	Eine Transfektion von frisch ausgesäten Zellen kann eine höhere Transfektionseffizienz ergeben.
Anwesenheit von Antibiotika während	Literaturdaten und eigene Beobachtungen weisen darauf hin, dass bei Anwesenheit von Antibiotika

der Komplexbildung oder Inkubationszeit	Transfektionseffizienzen stark reduziert werden können.
Menge an DNA/RNA und Roti [®] -Fect suboptimal	Obwohl Roti [®] -Fect ein breites Wirkungsspektrum besitzt, empfehlen wir eine Optimierung des Transfektionsprotokolls für jede Kombination von Zelltyp und Plasmid.
Exzessiver Zelltod	
Serumkonzentration zu niedrig oder Inkubationszeit in serumreduziertem Medium zu lang	Die Serumkonzentration sollte an die Standardkulturbedingungen angeglichen werden.
Menge an Nukleinsäure Roti [®] -Fect-Komplex zu hoch	Abhilfe durch Reduktion
Inkubationszeit mit der Nukleinsäure Roti [®] -Fect-Komplex zu lang	Abhilfe durch Verkürzung
Zellen gestresst	Vermeiden Sie Temperaturschwankungen und zu lange Zeiträume, in denen die Zellen ohne Serum auskommen müssen. Führen Sie die Transfektion in Anwesenheit von Serum durch.
Geringe Reproduzierbarkeit	
Unterschiedliche Konfluenz der Zellen	Stellen Sie die gleiche Zellzahl bei den Experimenten sicher (plattieren Sie die gleiche Zellzahl aus und inkubieren Sie gleich lange Zeiträume bis zur Transfektion).
Mikrobiologische Kontamination	Mikrobiologische Kontamination z.B. Mykoplasmen oder Pilze können Transfektionsergebnisse drastisch verändern.
Zellen zu oft passagiert	Die Morphologie und damit die Transfektionsergebnisse können sich bei hoher Passagenzahl der Zellen verändern. Häufig sinkt dabei die Transfektionseffizienz.
Serumqualität	Unterschiedliche Serumqualitäten können zu unterschiedlichen Transfektionsergebnissen führen. Stellen Sie gleichbleibende Qualität für alle Experimente sicher.

Literatur:

- Hennemann et al. (2003) *J Biol Chem* 278:28799-28811
- Ufartes et al., (2005) *BIOspektrum* 4:464-465
- Vassen et al. (2005) *Nucl Acids Res* 33:987-998

Roti[®]-Fect	0,2 ml	P001.1
	0,5 ml	P001.2
	1,0 ml	P001.3
	5 x 1,0 ml	P001.4