A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

GeneJect™

Odczynnik do transfekcji DNA, siRNA i miRNA.

numer katalogowy	wielkość
4100-01	100 µl
4100-05	500 µl
4100-15	1.5 ml

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.
Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Zalety 3

Opis 3

Składniki 3

Dodatkowy sprzęt i odczynniki 3

Komentarze 3

Transfekcja plazmidowym DNA 4

Dobre praktyki przy transfekcji plazmidowym DNA 4

Protokół transfekcji plazmidowym DNA 4

Tabela 1. Wytyczne dla transfekcji plazmidowym DNA w zależności od naczynia użytego do hodowli komórkowej. 5

Wytyczne optymalizacji dla plazmidowego DNA 5

Wskazówki dotyczące poprawy żywotności wrażliwych komórek 5

Transfekcja siRNA / miRNA 6

Dobre praktyki przy transfekcji siRNA / miRNA 6

Protokół transfekcji siRNA / miRNA 6

Tabela 2. Wytyczne dla transfekcji siRNA / miRNA w zależności od naczynia użytego do hodowli komórkowej. 7

Wytyczne optymalizacji dla siRNA / miRNA 7

Wskazówki dotyczące poprawy żywotności wrażliwych komórek 7

Zalety

- Nadaje się do transfekcji DNA, siRNA i miRNA
- Niski poziom toksyczności dla komórek
- Wydajna transfekcja wielu linii komórkowych i komórek pierwotnych

Opis

GeneJect™ jest uniwersalnym odczynnikiem do transfekcji zdolnym do wprowadzania do komórek zarówno cząsteczek plazmidowego DNA jak również krótkich oligonukleotydów takich jak siRNA czy też inhibitorów miRNA.

GeneJect™ wykazuje obniżoną toksyczność wobec komórek w porównaniu z lipofektyną, przy czym toksyczność wzrasta przy niskiej konfluencji.

Transfekcja z użyciem GeneJect™ zachodzi wydajnie dla powszechnie znanych linii komórkowych rozmaitego pochodzenia, w tym komórek HeLa, HEK293, PPC-1, HaCaT, A549, BEAS-2B, CCD19Lu, THP-1 i KOP. Pozwala również na wykonanie transfekcji na niskim poziomie w komórkach szczególnie trudnych do przyjęcia obcego materiału genetycznego np: komórek MDBK (Madin Darby Bovine Kidney cells).

GeneJect™ jest odczynnikiem wydajnie wspomagającym transfekcję w wielu rodzajach komórek pierwotnych takich jak ludzkie keratynocyty, fibroblasty, melanocyty oraz monocyty.

100 µl odczynnika GeneJect™ pozwala na wykonanie do 50 odrębnych transfekcji w formacie 12-dołkowej płytki do hodowli tkankowej.

Składniki

	4100-01	4100-05	4100-15	przechowywanie
GeneJect™ - odczynnik do transfekcji	100 µl	500 µl	1.5 ml	4 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Opti-MEM™, Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific, cat# 31985062) lub równoważny odpowiednik.

Komentarze

- Ponieważ transfekcja za pomocą odczynnika GeneJect™ zachodzi stosunkowo szybko, pożywkę hodowlaną zawierającą kompleksy transfekcyjne GeneJect™ / plazmidowe DNA,

siRNA, miRNA, można usunąć już po 6 godzinach lub następnego dnia i zastąpić standardową pożywką wzrostową.

- 50 - 70% konfluencji (stopnia pokrycie naczynia hodowlanego przez komórki) odpowiada przykładowo liczbie około $5x10^4$ pierwotnych ludzkich keratynocytów lub $5x10^5$ komórek HeLa na jedną studzienkę w 12-dołkowej płytce hodowlanej.
- Podobnie jak w przypadku innych odczynników do transfekcji, GeneJect™ może nieznacznie hamować proliferację komórek.
- GeneJect™ można przechowywać w temperaturze 4 °C przez co najmniej 6 miesięcy. Jeżeli istnieje potrzeba przechowywania przez 12 miesięcy, odczynnik należy podzielić na mniejsze porcje i zamrozić w temperaturze -20 °C. Należy unikać wielokrotnych cykli zamrażania i rozmrażania.

Transfekcja plazmidowym DNA

Dobre praktyki przy transfekcji plazmidowym DNA

- Przechowuj odczynnik GeneJect™ i plazmidowe DNA w odpowiedniej temperaturze (4 °C)
- Upewnij się, że transfekowane komórki były pasażowane co najmniej dwukrotnie i nie więcej niż 20-krotnie przed transfekcją
- NIe stosuj komórek przerośniętych (o konfluencji powyżej 80 %)
- Regularnie monitoruj komórki pod kątem wystąpienia zakażenia Mycoplazmą
- Staraj się stosować gen reporterowy w celu dobrej kontroli i optymalizacji wydajności transfekcji.
- Jakość pożywek może mieć decydujący wpływ na wydajność transfekcji. Do transfekcji stosuj jedynie sprawdzone odczynniki.

Protokół transfekcji plazmidowym DNA

Protokół dotyczy transfekcji komórek w 12-studzienkowych płytkach do hodowli tkankowych o powierzchni 4 cm^2. W przypadku transfekcji na płytkach do hodowli tkankowych o powierzchni innej niż 4 cm^2, należy dostosować ilości zgodnie z **Tabela 1**.

Dzień 1

1. Wysiej komórki w 12-studzienkowej płytce do hodowli tkankowej w takiej ilości, by po dobie osiągnęły konfluencję **50-70 %**. Hodowlę prowadź w 1000 µl standardowej pożywki na studzienkę.

Dzień 2

1. Do **100 µl** pożywki **Opti-MEM™** dodaj **400 ng plazmidowego DNA**. Wymieszaj przez worteksowanie.
2. Do mieszaniny dodaj **2 µl GeneJect™.** Wymieszaj przez worteksowanie.

3. Inkubuj przez **30 minut** w **temperaturze pokojowej**.
4. Dodaj **900 µl standardowej pożywki do hodowli**. Wymieszaj przez worteksowanie.
5. Usuń starą pożywkę z komórek.
6. Do komórek dodaj pożywkę zawierającą kompleksy transfekcyjne GeneJect™ i plazmidowego DNA.
7. Inkubuj przez **24 – 72 godziny** w temperaturze odpowiedniej dla danego typu komórek.

Dni 3 - 5

1. Sprawdź ekspresję interesującego Cię genu.

Tabela 1. Wytyczne dla transfekcji plazmidowym DNA w zależności od naczynia użytego do hodowli komórkowej.

Ilości są zoptymalizowane dla ludzkich pierwotnych keratynocytów. Zwiększenie ilości plazmidowego DNA proporcjonalnie do ilości GeneJect™ może zwiększyć wydajność transfekcji w niektórych liniach komórkowych.
Przedstawione w tabeli ilości są sugerowanymi wartościami wyjściowymi, od których należy rozpoczynać doświadczenia optymalizacji warunków transfekcji. Zależą one nie tylko od rodzaju transfekowanych komórek ale również od stosowanego plazmidowego DNA i jego rozmiaru. Więcej informacji dotyczących optymalizacji transfekcji znajduje się w dziale **Wytyczne optymalizacji dla plazmidowego DNA**.

płytka	Plazmidowe DNA (ng)	GeneJect™ (µl)	Opti-MEM™ (µl)	Standardowa pożywka (µl)
24-studzienki	200	1	50	400
12-studzienek	400	2	100	900
6-studzienek	800	4	200	1800
⌀ 10 cm	4000	10	1000	9000

Wytyczne optymalizacji dla plazmidowego DNA

- Wypróbuj różne ilości plazmidowego DNA w zakresie od 0.5x do 1.5x, w porównaniu do wartości podanych w **Tabeli 1.**
- Wypróbuj różne ilości GeneJect™ w zakresie od 1x do 3x, w porównaniu do wartości podanych w **Tabeli 1.**

Wskazówki dotyczące poprawy żywotności wrażliwych komórek

- Wymień pożywkę po 4 godzinach

- Zmniejsz o połowę ilość DNA
- Porównaj efekty transfekcji w czasie (np. po 24 godzinach względem 48 godzin)
- Sprawdź czy ekspresja badanego genu nie wpływa na żywotność komórek

Transfekcja siRNA / miRNA

Dobre praktyki przy transfekcji siRNA / miRNA

- Przechowuj GeneJect™ i RNA w odpowiedniej temperaturze. 4 °C dla GeneJect™ i -20 °C dla RNA
- Upewnij się, że transfekowane komórki były pasażowane co najmniej dwukrotnie i nie więcej niż 20-krotnie przed transfekcją
- Nie stosuj komórek przerośniętych (o konfluencji powyżej 80 %)
- Regularnie monitoruj komórki pod kątem wystąpienia zakażenia Mycoplazmą
- Zawsze stosuj pozytywną kontrolę (np. kluczowego genu GAPDH lub HPRT lub znakowane fluorescencyjnie siRNA).
- Zawsze stosuj negatywną kontrolę (np. częściowo niekomplementarne siRNA lub sekwencje typu non-targeting czyli bez swojego odpowiednika w genomie badanego organizmu)
- Sprawdzaj czasy półtrwania dla docelowego mRNA i produktu białkowego. Wykonuj pomiary efektu wyciszania genu w zależności od czasu po 24, 48, 72 i 96 godzinach od transfekcji.
- Jakość pożywek może mieć decydujący wpływ na wydajność transfekcji. Do transfekcji stosuj jedynie sprawdzone odczynniki.

Protokół transfekcji siRNA / miRNA

Protokół dotyczy transfekcji komórek w 12-studzienkowych płytkach do hodowli tkankowych o powierzchni 4 cm^2. W przypadku transfekcji na płytkach do hodowli tkankowych o powierzchni innej niż 4 cm^2, należy dostosować ilości zgodnie z **Tabela 2.**

Dzień 1

1. Wysiej komórki w 12-studzienkowej płytce do hodowli tkankowej w takiej ilości, by po dobie osiągnęły konfluencję **50-70 %**. Hodowlę prowadź w 1000 µl standardowej pożywki na studzienkę.

Dzień 2

1. Do **100 µl** pożywki **Opti-MEM™** dodaj **30 pmol siRNA / miRNA**. Wymieszaj przez worteksowanie.
2. Do mieszaniny dodaj **2 µl GeneJect™.** Wymieszaj przez worteksowanie.
3. Inkubuj przez **30 minut** w **temperaturze pokojowej**.

4. Dodaj **900 µl standardowej pożywki do hodowli**. Wymieszaj przez worteksowanie.
5. Usuń starą pożywkę z komórek.
6. Do komórek dodaj pożywkę zawierającą kompleksy transfekcyjne GeneJect™ i siRNA / miRNA.
7. Inkubuj przez **24 – 72 godzin** w temperaturze odpowiedniej dla danego typu komórek.

Dni 3 - 5

1. Sprawdź ekspresję interesującego Cię genu.

Tabela 2. Wytyczne dla transfekcji siRNA / miRNA w zależności od naczynia użytego do hodowli komórkowej.

Ilości są zoptymalizowane dla ludzkich pierwotnych keratynocytów. Zwiększenie ilości plazmidowego DNA proporcjonalnie do ilości GeneJect™ może zwiększyć wydajność transfekcji w niektórych liniach komórkowych.
Przedstawione w tabeli ilości są sugerowanymi wartościami wyjściowymi, od których należy rozpoczynać doświadczenia optymalizacji warunków transfekcji. Zależą one nie tylko od rodzaju transfekowanych komórek ale również od stosowanego RNA. Więcej informacji dotyczących optymalizacji transfekcji znajduje się w dziale **Wytyczne optymalizacji dla siRNA / miRNA.**

plate	siRNA / miRNA (pmol)	GeneJect™ (µl)	Opti-MEM™ (µl)	Normal growth media (µl)
24-well	15	1	50	400
12-well	30	2	100	900
6-well	60	4	200	1800
⌀ 10 cm	300	10	1000	9000

Wytyczne optymalizacji dla siRNA / miRNA

- Przetestuj różne stężenia siRNA / miRNA w zakresie od 10 do 50 nM stężeń roboczych.
- Zwiększenie stosunku GeneJect™ do siRNA / miRNA może dodatkowo poprawić wydajność transfekcji. Wypróbuj stosunek GeneJect™ do siRNA / miRNA od początkowego 1 µl / 15 pmol do 1,5 µl / 15 pmol.
- Wykonaj transfekcje dla komórek o konfluencji wynoszącej 50%

Wskazówki dotyczące poprawy żywotności wrażliwych komórek

- Wymień pożywkę po 4 godzinach
- Porównaj efekty transfekcji w czasie (np. po 24 godzinach względem 48 godzin)
- Sprawdź, czy wyciszanie genu docelowego nie wpływa na żywotność komórek

A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, al. Zwycięstwa 96/98, 81-451 Gdynia, Poland
phone +48 58 6982194, fax +48 58 6228578
info@aabiot.com, www.aabiot.com