

METAFECTENE® SI⁺

Das Reagenz speziell für die Transfektion von Säugerkzellen mit siRNA und miRNA

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

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
METAFECTENE® SI ⁺	T100-0.2	SI ⁺ Transfection Reagent 1x0.2 ml 10 x SI ⁺ buffer 1x0.2 ml
METAFECTENE® SI ⁺	T100-1.0	SI ⁺ Transfection Reagent 1x1.0 ml 10 x SI ⁺ buffer 1x2.0 ml
METAFECTENE® SI ⁺	T100-2.0	SI ⁺ Transfection Reagent 2x1.0 ml 10 x SI ⁺ buffer 2x2.0 ml
METAFECTENE® SI ⁺	T100-5.0	SI ⁺ Transfection Reagent 5x1.0 ml 10 x SI ⁺ buffer 5x2.0 ml

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: SI⁺ Reagenz : 4°C, 10 x SI⁺ buffer: 4°C (**nicht einfrieren**)

Stabilität: Haltbar bis: siehe Label.

Liposomenformulierungen wie das METAFECTENE® SI⁺ 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 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 zur diagnostischen, therapeutischen oder anderer klinischen Anwendung an Mensch oder Tier.

Beschreibung

METAFECTENE® SI⁺ ist eine speziell für die Transfektion von Säugerkzellen mit siRNA und miRNA entwickelte Lipidformulierung.

Diese gezielte Entwicklung für die Transfektion mit siRNA und miRNA ermöglicht auch sehr kleine Reagenzmengen, um einen hervorragenden Knockdown zu erzielen, was sich in exzellenter Zellviabilität und geringen Off-target Effekten widerspiegelt. Zudem kann METAFECTENE® SI⁺ mit einem Fast-Forward Protokoll angewandt werden, das zwei aufeinander aufbauende Versuche in einer Woche ermöglicht (bei Standardprotokoll mit 48 h Inkubationsdauer) und dabei ausgezeichnet für die Automatisierung im Labor geeignet ist.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Qualitätskontrolle	3
1.3 Erläuterungen	3
Lagerung	3
Zustand der Zellen	3
Qualität des genetischen Materials	3
2. Transfektionsprotokoll	4
2.1 Beschreibung	4
2.2 Vorbereitungen	4
2.3 Ausplattieren der Zellen	4
2.4 Lipoplexherstellung	4
2.5 Transfektion	5
2.6 Auswertung	5
2.7 Transfer auf andere Formate	5
2.8 Explizite Transfektionsprotokolle	6
2.9 Ausführliche Optimierung	6
3. Sonstiges	7
3.1 Wichtige Informationen	7
3.2 Gewährleistung	7

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transfektion von Säugerzellen mit siRNA oder miRNA
Formulierung	Lipidkomposition in Wasser
Assays	Bis zu 4000 (96-Well) oder bis zu 650 (24-Well) mit 1 ml Reagenz
Sterilität	getestet
Lagerung	4°C

1.2 Qualitätskontrolle

Die Qualität wird durch einen Standardtransfektionstest geprüft. Mittels Thioglycolatlösung wird eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze ausgeschlossen.

1.3 Erläuterungen

Lagerung

METAFECTENE® SI⁺ 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 METAFECTENE® SI⁺ Transfection Reagent wieder optimiert werden.

Zustand der Zellen

Die zu transfizierenden Zellen sollten in gut proliferierendem und gesundem Zustand sein. Zellen, die vor dem Ausplattieren (zur Transfektion) total konfluent waren, können bei Weitem nicht so effizient transfiziert werden wie normal wachsende Zellen. Daher wird geraten, nur regelmäßig passagierte Zellen für Transfektionsexperimente zu benutzen. Mikrobielle Kontaminationen, wie z.B. durch Mykoplasmen müssen ausgeschlossen werden, da sie Transfektionsergebnisse auf dramatische Weise negativ beeinflussen können.

Qualität des genetischen Materials

Die RNA sollte zum Erreichen bester Knockdown-Ergebnisse von größtmöglicher Reinheit sein.

RNA ist empfindlich gegen ubiquitär vorhandene RNasen. Treffen Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen!

2. Transfektionsprotokoll

2.1 Beschreibung

In den Kapiteln 2.2 – 2.6 wird ein Transfektionsprotokoll beschrieben, in dem Zellen in zwei Wells im 48-Well-Format (je 1 cm² Wachstumsfläche) mit zwei unterschiedlichen Mengen eines RNA-Lipid-Komplexes (Lipoplex) behandelt werden. Eine Tabelle mit Angaben für andere Well-Formate befindet sich in Kapitel 2.7.

Es handelt sich um ein Fast-Forward-Protokoll, bei dem die Zellen kurz vor der Zugabe des Lipoplexes ausgesät werden. Für empfindliche Zellen empfehlen wir nach dem Aussäen der Zellen über Nacht zu inkubieren.

Nach Auswertung dieses Experiments wird als Ergebnis die für diese Zellen optimale Lipoplexmenge erhalten. Bei jedem weiteren Experiment, bei dem die gleichen Zellen und die gleiche RNA verwendet werden, wird dann nur noch mit der geeigneten Lipoplexmenge transfiziert. Mengenangaben für diese expliziten Transfektionsprotokolle sind in Kapitel 2.8 dargestellt.

In seltenen Fällen, z.B. bei schwierig zu transfizierenden oder sehr sensitiven Zellen, kann eine Optimierung des RNA:Lipid-Verhältnisses vorteilhaft sein (Kapitel 2.9).

2.2 Vorbereitungen

Zunächst wird 1× SI⁺ buffer aus dem mitgelieferten 10× SI⁺ buffer hergestellt. Dazu wird 1 Aliquot 10× SI⁺ buffer mit 9 Aliquots sterilem Wasser, das sich zur Zellkultur eignet, unter sterilen Bedingungen gemischt.

Vor der Transfektion werden der 1× SI⁺ buffer und METAFECTENE® SI⁺ Transfection Reagent auf Raumtemperatur gebracht und jeweils kurz gevortext. Die RNA-Lösung (mit einer Konzentration von mindestens 20 µM = 20 pmol/µl) wird auf Raumtemperatur gebracht und sanft gemischt.

2.3 Ausplattieren der Zellen

Eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 2.0×10^5 Zellen/ml (1.5 – 2.5×10^5 Zellen/ml) mit komplettem Kulturmedium ist erforderlich.

Zwei Wells einer 48-Well Platte (*Well 1* und *Well 2*) werden mit je 250 µl Zellsuspension gefüllt.

Danach werden die Zellen bis zur Zugabe des Lipoplexes bei ihren üblichen Kulturbedingungen inkubiert (z.B. 37°C in CO₂-haltiger Atmosphäre). Für empfindliche Zellen empfehlen wir eine Inkubation über Nacht.

2.4 Lipoplexherstellung

45 µl 1× SI⁺ buffer werden in ein Reaktionsgefäß (vorzugsweise aus Polypropylen) vorgelegt.

2.4 µl METAFECTENE® SI⁺ Transfection Reagent werden in den 1× SI⁺ buffer pipettiert. Es wird durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren gemischt.

90 pmol RNA werden dazu pipettiert und es wird einmalig sanft gemischt.

Sanft mischen!

Scherkräfte schädigen den Lipoplex, wodurch die Transfektionseffizienz verringert wird.

Anschließend wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.5 Transfektion

Nun wird die Lipoplexlösung auf die beiden mit Zellsuspension gefüllten Wells verteilt:

15 µl des Lipoplexes in *Well 1* und 30 µl in *Well 2*. Es sind nun etwa 30 pmol RNA in *Well 1* und etwa 60 pmol in *Well 2* enthalten.

Anschließend wird bei den für die verwendete Zelllinie üblichen Bedingungen inkubiert.

2.6 Auswertung

Etwa 24–72 h nach Zugabe des Lipoplexes wird die Auswertung durchgeführt (z.B. Real-time PCR oder Reporterassay). Der höchste Knockdown wird häufig 48 h nach der Lipoplexzugabe erhalten. Der optimale Zeitpunkt für die Auswertung wird durch die Eigenschaften der Zelllinie, die Expressionsrate des auszuschaltenden Proteins, sowie ggf. der Halbwertszeit des Proteins in der exprimierenden Zelle bestimmt.

Anhand der Ergebnisse wird die für die verwendeten Zellen optimale Lipoplexmenge (1 oder 2) ausgewählt.

2.7 Transfer auf andere Formate

Format	Fläche	Zell- suspension	1× SI ⁺ buffer	M. SI ⁺ Transf. Reagent	RNA	Lipoplexvolumen	
						<i>Well 1</i>	<i>Well 2</i>
96 Well	0.3 cm ²	2× 100 µl	22.5 µl	0.72 µl	27 pmol	7.5 µl	15 µl
48 Well	1.0 cm ²	2× 250 µl	45 µl	2.4 µl	90 pmol	15 µl	30 µl
24 Well	1.9 cm ²	2× 500 µl	90 µl	4.6 µl	170 pmol	30 µl	60 µl
12 Well	3.6 cm ²	2× 900 µl	180 µl	8.6 µl	320 pmol	60 µl	120 µl
6 Well	9.0 cm ²	2× 2.2 ml	450 µl	21.6 µl	810 pmol	150 µl	300 µl
60 mm Schale	22 cm ²	2× 5.5 ml	1350 µl	53 µl	2.0 nmol	450 µl	900 µl
100 mm Schale	60 cm ²	2× 15 ml	4.0 ml	144 µl	5.4 nmol	1.35 ml	2.7 ml

2.8 Explizite Transfektionsprotokolle

Wenn bekannt ist, welche Lipoplexmenge (1 oder 2) für die zu transfizierenden Zellen optimal ist, kann anhand der folgenden Tabelle vorgegangen verwendet werden.

Die Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion **eines** Wells des jeweiligen Formats. Das Vorgehen zur Bildung des Lipoplexes entspricht dem Prozedere, das in Kapitel 2.4 beschrieben wurde.

Format	Lipoplexmenge 1 (Well 1)			Lipoplexmenge 2 (Well 2)		
	1 × SI ⁺ buffer	M. SI ⁺ Transf. Reagent	RNA	1 × SI ⁺ buffer	M. SI ⁺ Transf. Reagent	RNA
96 Well	7.5 µl	0.24 µl	9 pmol	15 µl	0.48 µl	18 pmol
48 Well	15 µl	0.8 µl	30 pmol	30 µl	1.6 µl	60 pmol
24 Well	30 µl	1.5 µl	57 pmol	60 µl	3.0 µl	114 pmol
12 Well	60 µl	2.9 µl	108 pmol	120 µl	5.8 µl	216 pmol
6 Well	150 µl	7.2 µl	270 pmol	300 µl	14.4 µl	540 pmol
60 mm Schale	450 µl	17.6 µl	660 pmol	900 µl	35.2 µl	1.3 nmol
100 mm Schale	1.35 ml	48 µl	1.8 nmol	2.7 ml	96 µl	3.6 nmol

2.9 Ausführliche Optimierung

In der Regel ist keine Anpassung des RNA:Lipid-Verhältnisses bei der Transfektion mit METAFECTENE® SI⁺ nötig. Allerdings kann eine Veränderung dieses Transfektionsparameters bei schwer zu transfizierenden oder sehr sensiblen Zellen vorteilhaft sein.

Die nachfolgende Tabelle gibt alle sinnvollen Kombinationen aus Reagenzvolumen und RNA-Mengen für die verschiedenen Wellformate an. Die Standardvolumina wurden unterstrichen.

Format	Lipoplexmenge 1					Lipoplexmenge 2				
	1 × SI buffer	M. SI ⁺ Transf. Reagent [µl]			RNA	1 × SI buffer	M. SI ⁺ Transf. Reagent [µl]			RNA
96 Well	7.5 µl	0.12	<u>0.24</u>	0.36	9 pmol	15 µl	0.24	<u>0.48</u>	0.72	18 pmol
48 Well	15 µl	0.40	<u>0.80</u>	1.2	30 pmol	30 µl	0.8	<u>1.6</u>	2.4	60 pmol
24 Well	30 µl	0.76	<u>1.5</u>	2.3	57 pmol	60 µl	1.5	<u>3.0</u>	4.6	114 pmol
12 Well	60 µl	1.45	<u>2.9</u>	4.3	108 pmol	120 µl	2.9	<u>5.8</u>	8.6	216 pmol
6 Well	150 µl	3.6	<u>7.2</u>	10.8	270 pmol	300 µl	7.2	<u>14.4</u>	21.6	540 pmol
60 mm Schale	450 µl	8.8	<u>17.6</u>	26.4	660 pmol	900 µl	17.6	<u>35.2</u>	52.8	1.3 nmol
100 mm Schale	1.35 ml	24	<u>48</u>	72	1.8 nmol	2.7 ml	48	<u>96</u>	144	3.6 nmol

3. Sonstiges

3.1 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.

METAFECTENE® ist eine eingetragene Handelsmarke der Biontex Laboratories GmbH.

3.2 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.

*Biontex 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: contact@biontex.com
Internet: www.biontex.com*