

Gebrauchsanweisung



Roti®-Fect RNAi Kit

Reagenz zur Transfektion von Säugerzellen mit siRNA und miRNA, für effizientes gene silencing

Produktbeschreibung

Neues, starkes Transfektionsreagenz zur liposomenvermittelten siRNA- und miRNA-Transfektion von allen Säugerzellen in Kultur. Liposomenformulierung und beiliegender Puffer wurden speziell entwickelt und maßgeschneidert auf die Kernparameter der RNAi: eine möglichst quantitative Endocytose und Freisetzung in das Cytosol ohne anschließenden Transport der Nukleinsäure in den Zellkern. Roti®-Fect RNAi erzielt auch mit geringen RNA-Mengen hervorragende Knockdown-Ergebnisse. Die Roti®-Fect Technologie garantiert Ihnen dabei eine Minimierung der toxischen Effekte während der Transfektion und kann somit auch bei sehr sensitiven Zelllinien oder primären Zellen angewandt werden. Die ausführliche Gebrauchsanweisung enthält ein standardisiertes Transfektionsprotokoll mit festem RNA/Liposomen-Verhältnis, das vom ersten Ansatz an gute Ergebnisse ergibt - eine aufwändige Optimierung der Transfektion entfällt. Die Auswertung kann oftmals bereits nach 48 Stunden erfolgen, so dass pro Woche zwei aufeinander aufbauende Ansätze möglich sind.

Ein Milliliter Roti®-Fect RNAi reicht aus, um 250 Transfektionen auf Zellkulturschalen mit 16 mm Durchmesser (24wells) durchzuführen. Roti®-Fect RNAi wird als gebrauchsfertige Lösung zusammen mit dem passenden RNAi-Transfektionspuffer geliefert. Es kann bei -20 °C für länger als ein Jahr ohne Effizienzverlust gelagert werden. Es wurde auch gezeigt, dass es für mehrere Monate bei +4 °C stabil ist. Aus Effizienzgründen empfehlen wir allerdings die Lagerung bei -20 °C.

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.t. 04/2017

Stabilität: Bei -20 °C mindestens 1 Jahr haltbar.

Kulturmedien: Empfohlen für die RNAi Transfektion mit komplettem Medium.

Lagertemperatur: -20 °C

Die Liposomenformulierung (Roti®-Fect RNAi Lipo) sollte vor jeder Transfektion einen Frost/Tau-Zyklus durchlaufen, der die Größenverteilung der Liposomen optimal herstellt. Die empfohlene Lagertemperatur von -20 °C automatisiert diesen Frost/Tau-Zyklus und bedeutet keine Steigerung der Haltbarkeit; die Anzahl der Zyklen ist für die Qualität des Reagenzes unerheblich, auch nach vielen Zyklen ist die Effizienz der Transfektion gewährleistet, wenn das Reagenz frisch aufgetaut wird. Eine längere Lagerung bei +4 °C oder der Versand bei Raumtemperatur beeinflussen die Produktqualität nicht. Der Roti®-Fect RNAi Puffer (10x) kann bei -20 °C oder bei +4 °C gelagert werden.

Versand: bei Raumtemperatur (nach Erhalt bitte einfrieren)

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

Anwendungshinweise:

- Die Liposomenformulierung (Roti®-Fect RNAi Lipo) sollte vor jeder Transfektion frisch aufgetaut werden.
- RNA ist empfindlich gegen ubiquität vorhandene RNAsen. Alle verwendeten Reagenzien und Gefäße müssen RNase frei sein.

Qualitätskontrolle:

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

Bisher erfolgreich transfizierte Zellen und Zelllinien:

Primäre Zellen: MCS, M1

Zelllinien: A549, 3T3-L1, B16F10, CHO-K1, H441, HT1080, HeLa, HeLa-KB, HepG2

Arbeitsanleitung

I) Vorbemerkungen

Zustand der Zellen

Die zu transfizierenden Zellen sollten in gesundem Zustand sein und sich in der Proliferationsphase befinden (70-90 % Konfluenz). Wir empfehlen, nur regelmäßig passagierte Zellen für Transfektionsexperimente zu benutzen. Mikrobielle Kontaminationen, wie z.B. durch Mykoplasmen oder Hefen, müssen ausgeschlossen sein, da sie falsch-negative Ergebnisse hervorrufen können.

Qualität des genetischen Materials

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

Reinheit der verwendeten Reagenzien und Gefäße

RNA ist empfindlich gegen ubiquität vorhandene RNAsen. Alle verwendeten Reagenzien und Gefäße müssen RNase frei sein

II) Protokoll

A) Vorbereitungen

1. Berechnen Sie die benötigte Menge 1x RNAi-Puffer aus der Anzahl der transfizierten Wells mal der in der Tabelle (S. 2) angegebenen Puffermenge. Verdünnen Sie 1/ 10 Vol. Roti®-Fect RNAi Puffer (10x) mit 9/10 Vol. endotoxin- und RNase-freiem Wasser. Mischen durch vortexen.

Der 1x Puffer kann auch in größeren Mengen erstellt und aliquotiert eingefroren werden.

2. Vor der Transfektion werden der 1x RNAi Puffer, Roti®-Fect RNAi Liposomen und die RNA-Lösung auf Raumtemperatur gebracht und jeweils kurz gevortext.

3. Stellen Sie in komplettem Kulturmedium 250 µl Zellsuspension her mit einer Konzentration von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml.

B) Herstellung des RNA/Lipo-Komplexes

Diese Anleitung bezieht sich auf ein Well mit 1 cm² Wachstumsfläche (48Well). Siehe unten zur Tabelle mit Werten für andere Wellgrößen. Die angegebene Menge RNA/Lipo-Komplex wurde optimiert und kann für die meisten Ansätze verwendet werden. Zur Optimierung siehe unter III).

1. Pipettieren Sie 30 µl Roti®-Fect RNAi Puffer (1x) in ein Well. Es entsteht ein Puffertropfen.

2. Pipettieren Sie nacheinander in diesen Tropfen: 2 µl Roti®-Fect RNAi Lipo und 30 pmol RNA. Mischen Sie durch einmaliges, sanftes Auf- und Abpipettieren.

3. Inkubieren Sie für 15 min bei Raumtemperatur.

C) Transfektion

Pipettieren Sie 250 µl der vorbereiteten Zellsuspension in das Well zum RNA-Lipo-Komplex-Tropfen. Inkubieren Sie ohne weiteres Mischen bei den für die verwendeten Zellen/Zelllinie üblichen Bedingungen für 24-72 Stunden.

D) Auswertung

Werten Sie nach 24-72 Stunden den Ansatz durch den üblichen Assay (z.B. Real-time PCR, Reporteragenassay) aus. Der höchste Knockdown wird meist 48 h nach Transfektion erhalten. Der optimale Zeitpunkt für die Auswertung ergibt sich durch die Eigenschaften der Zelllinie, die Expressionsrate des auszuschaltenden Proteins und der Halbwertszeit des Proteins in der exprimierenden Zelle.



III) Optimierung

A) Veränderung der Komplexmenge

Bei Bedarf kann die RNA/Lipo-Komplexmenge halbiert (z.B. bei sehr empfindlichen Zellen) oder verdoppelt werden (z.B. für eine weitere Steigerung der Knockdown-Rate). Hierzu werden die Angaben beider Volumina – Roti®-Fect RNAi Lipo und RNA – entsprechend erhöht oder verringert. Die Mengen von RNAi Puffer (1x) und Zellsuspension werden nicht geändert.

B) Veränderung der Zellzahl

Wird die Zellzahl pro Well erhöht/erniedrigt, so ist die zuzugebende Komplexmenge proportional zu erhöhen/verringern.

Das Verhältnis von Liposomenformulierung zu RNA muss stets konstant gehalten werden:
1 µl Roti®-Fect RNAi Lipo für je 15 pmol RNA

IV) Reagenzmengen für unterschiedliche Formate

Kulturschale Ø (mm)	6 (96well)	11 (48well)	16 (24well)	22 (12well)	35 (6well)
Fläche pro well (cm ²)	0,3	1	1,9	3,9	9,6
Zellsuspension (µl)	100	250	500	1000	2000
RNA Menge (pmol)	15	30	60	120	180
Roti®-Fect RNAi Lipo-Menge (µl)	1	2	4	8	12
Roti®-Fect RNAi Puffer (1x) Menge (µl)	15	30	60	120	180

Trouble Shooting

Mögl. Ursache	Kommentar
Niedrige Transfektionseffizienz	
Schlechte Qualität der RNA	Die RNA sollte für optimale Knockdown-Ergebnisse einen möglichst 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 sollte in Vollmedium durchgeführt werden (5 % - 0 %)
Knockdown-Zeit zu kurz	Eine Verlängerung der Knockdown-Zeit bis auf 72 Stunden ist möglich.
Zellen zu alt	Transfizieren sie nur frisch ausgesäte und regelmäßig passagierte Zellen.

Menge an RNA und Roti®-Fect RNAi nicht optimal	Verwenden Sie ausschließlich das Verhältnis von 1 µl Roti®-Fect RNAi Lipo zu 15 pmol RNA.
Exzessiver Zelltod	
Menge an RNA/Lipo-Komplex zu hoch	Komplexmenge reduzieren
Inkubationszeit mit RNA/Lipo-Komplex zu lang	Inkubationszeit auf 24 Stunden verkürzen
Zellen gestresst	Vermeiden Sie Temperaturschwankungen und zu lange Zeiträume beim Erstellen der Zellsuspension. Führen Sie die Transfektion in Vollmedium 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 und zu falsch-negativen Ergebnissen (also dem Fehlen von Knockdowns) führen.
Zellen zu oft passagiert	Die Morphologie und damit die Transfektionsergebnisse können sich bei hoher Passagenzahl der Zellen verändern. Häufig sinken dabei die Transfektions- und die Knockdowneffizienz.

RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Regulationsmechanismus für die Genexpression, der durch kurzkettige, zur mRNA eines Zielproteins komplementäre RNA mit ca. 21-28 Nukleotiden gesteuert wird und in allen eukaryontischen Zellen zu finden ist.

Man unterscheidet hierbei siRNA und miRNA an Hand der verwendeten RNA-Varianten: bei siRNA besteht die transfizierte RNA aus synthetischer, doppelsträngiger RNA, während die miRNA aus einem Strang endogener RNA gebildet wird, deren Haarnadelstruktur durch Endoribonuklease-Spaltung (Dicer) aufgetrennt wurde.

Im Cytosol werden diese kleinen RNA-Stränge von einem Ribonukleoproteinkomplex (RISC-Komplex = RNA Induced Silencing Complex) gebunden, der den RNA-Doppelstrang trennt und den Leitstrang präsentiert. Bindet ein komplementärer mRNA-Strang, so wird dieser vom RISC-Komplex abgebaut oder stillgelegt und damit die Expression des Zielproteins verhindert – es kommt zu einer Herunterregulierung des zugehörigen Gens (Knockdown).

Reagenzien für die Transfektion von siRNA und miRNA unterscheiden sich von herkömmlichen Transfektionsreagenzien für die DNA-Transfektion dadurch, dass sie das genetische Material nicht in den Zellkern transportieren müssen. Bei der Entwicklung von METAFECTENE® SI lag das Hauptaugenmerk deshalb auf einer möglichst quantitativ

ablaufenden Endocytose des Lipoplexes und der schnellen und vollständigen Freisetzung der RNA in das Cytosol.

Empfohlene Reagenzien:

Wasser, steril, pyrogenfrei (1 Liter) – Best.-Nr. 3255.1
 Wasser, DNase/RNase-frei (50 x 1 ml) – Best.-Nr. T143.4
 DEPC (25 ml) – Best.-Nr. K028.1
 Roti®-Fect RNAi Puffer (10x) (0,4 ml) – Best.-Nr. 2913.1
 Roti®-Fect RNAi Puffer (10x) (2 ml) – Best.-Nr. 2913.2

Das Set enthält:

0,2 bzw. 1 ml Roti®-Fect RNAi Liposomenformulierung (Best.-Nr. 2911, nicht separat zu kaufen) und 0,4 bzw. 2 ml Roti®-Fect RNAi Puffer (Best.-Nr. 2913). Der Roti®-Fect RNAi Puffer kann separat nachgekauft werden.

Roti®-Fect RNAi Kit	0,2 ml	3129.1
	1,0 ml	3129.2