

Руководство по использованию реактивов серии GenJect (GenJector-U, GenJect-39 и GenJect-40) для трансфекции эукариотических клеток.

Содержимое набора

Эмульсия синтетических липидов серии GenJect. Поставляется в флакончиках 0.5 и 1 мл.

Хранение

Хранение при температуре +4°C. Допускается длительное хранение при комнатной температуре.

Описание

Реактивы серии GenJect предназначены для высокоэффективной трансфекции плазмидной ДНК, а также линейных коротких и длинноцепочечных молекул ДНК и РНК (siRNA, mRNA) в клетки эукариот (HeLa, HEK-293T, CHO, Neuro2A, SH-SY5Y, стволовые клетки, первичные клеточные культуры и др.) в присутствии сыворотки крови для гиперэкспрессии белков, специфической локализованной экспрессии белков, а также проведения нокдауна генов (GenJector-U и GenJect-40). Реактивы серии GenJect представляют собой эмульсию везикул, содержащих катионные липиды, в водно-спиртовой смеси. Набор 0,5 мл достаточен для трансфекции 140 – 250 мкг плазмидной ДНК/РНК (200-500 трансфекций на 35-мм чашках).

Данное руководство в электронном виде, дополнительную информацию, а также примеры трансфекции можно найти на сайте www.molecta.ru.

Транзиторная/стабильная трансфекция ДНК/РНК в эукариотические клетки с помощью реактивов серии GenJect

все объемы и количества указаны из расчета приготовления липид-нуклеиновых комплексов на 1 мл полной ростовой среды для трансфекции в формате 6-луночного планшета или 35 мм чашки Петри*

для других объемов все перерасчеты проводить пропорционально

см. Таблицу «Конверсия культуральных форматов»

*В целях экономии реактива серии GenJect и ДНК/РНК мы рекомендуем проводить трансфекцию в половине стандартного объема ростовой среды (например, для 35 мм чашек Петри или 6-луночных планшетов инкубацию с липид-нуклеиновыми комплексами ставить в 1 мл полной ростовой среды, тогда как дальнейшее культивирование клеток проводить в стандартном объеме среды - 2 мл).

Приведенные ниже условия являются ориентировочными. Количество ДНК/РНК, реагента серии GenJect, клеточная плотность, время трансфекции и условия формирования комплексов должны быть оптимизированы под конкретные условия эксперимента.

1. Нарастить клетки до необходимой плотности/конфлюентности (оптимально рассаживать клетки за 24 ч до трансфекции; рекомендуемая конфлюэнтность адгезивных клеток в день трансфекции >70%, плотность суспензионных клеток – $1 \div 6 \times 10^6/\text{мл}^1$).
2. Непосредственно перед трансфекцией заменить ростовую среду на свежую без антибиотиков или с минимальной их концентрацией². Суспензионные клетки для замены среды осаждают путем центрифугирования.
3. Смешать реагент серии GenJect с буфером для формирования комплексов (DMEM, TE, PBS или любой другой подходящий буфер³) из расчета 1, 2 и 3 мкл реагента на 50 мкл буфера. Реагент серии GenJect должен добавляться непосредственно в объем буфера – **в процессе внесения носик пипетки не должен касаться стенок пробирки или лунки планшета**. Сразу после внесения реагента перемешать полученную суспензию пипетированием. Инкубировать 10-15 мин **ПЕРЕД** внесением раствора ДНК. Развести 1 мкг ДНК в 50 мкл буфера для формирования комплексов. Перемешать пипетированием. По каплям добавить разведенный реагент серии GenJect к раствору ДНК. Пипетировать два раза для равномерного перемешивания. Инкубировать 15 мин при комнатной температуре.
4. По каплям добавить суспензию комплексов НуклеиноваяКислота/GenJect в каждую лунку/чашку Петри/колбу. Аккуратно перемешать планшет/чашку/колбу круговыми движениями (на 1 мл ростовой среды добавляется 100 мкл суспензии).
5. Инкубировать клетки при 37°C⁴ в CO₂-инкубаторе в течение 16 – 72 до проведения анализа на трансгенез⁵. Обычно не нужно удалять комплексы (менять среду) после трансфекции.

Тем не менее, при выраженной токсичности, среда с комплексами может быть заменена на свежую ростовую среду через 15 мин – 5 часов инкубации с клетками. Свежую ростовую среду для культивирования клеток добавлять в полном объеме.

Для получения стабильных трансфектантов, через 48 – 72 часа после трансфекции клетки рассаживают 1:5÷10 на селективной среде.

#Примечания:

¹ – Накануне трансфекции суспензионные клетки рассеивают 1:2÷3. В день трансфекции клетки собирают путем центрифугирования, заменяют среду и рассаживают из расчета 1÷6 x 10⁶/мл полной ростовой среды.

² – Наличие антибиотиков в культуральной среде может снижать эффективность трансфекции. Рекомендуется использовать среду без антибиотиков или с минимальным их содержанием (например, 0,1 – 1x раствор пеницилина/стрептомицина).

³ – Для формирования комплексов могут быть использованы различные буферы, включая солевые буферы типа PBS или TE, а также любые ростовые среды без добавления сыворотки, такие как DMEM, DMEM/F12. Состав буфера для формирования комплексов определяет характеристики получаемых комплексов. Разные буферы могут быть более эффективны для разных задач и разных клеточных линий.

⁴ – В ряде случаев для повышения эффективности трансфекции рекомендуется инкубировать клетки при пониженной температуре (32°C) в CO²-инкубаторе.

⁵ – Для увеличения длительности продукции рекомбинантных белков при транзитной трансфекции клеток возможно повторное её проведение в тех же условиях каждые 48 часов.

Оптимизация трансфекции

Увеличение уровня трансфекции может быть достигнуто путем варьирования количества реагента серии GenJect и ДНК/РНК, подбором оптимального буфера для формирования комплексов, времени инкубации клеток с комплексами, определением оптимальной фазы роста клеток и культуральной среды для проведения трансфекции.

В отсутствие видимой токсичности наиболее эффективным способом повышения уровня трансфекции является увеличение концентрации реагента серии GenJect (тестировать повышение в 2, 3 и 4 раза) с параллельным тестированием изменения нагрузки ДНК/РНК (тестировать понижение и повышение в 2 раза).

Оптимальная концентрация реагентов серии GenJect обычно находится в пределах от 0,5 до 4 мкл на 1 мл ростовой среды. Оптимальное количество ДНК/РНК находится в пределах от 0,25 до 2 мкг на 1 мл полной ростовой среды. Для эффективного формирования липид-нуклеиновых комплексов диапазон соотношений (мкл GenJect) / (мкг нуклеиновой кислоты) должен быть от 6/1 до 1/1. Оптимальное соотношение, в большинстве случаев, составляет 2/1.

Эффективность трансфекции также зависит от буфера для формирования комплексов и для проведения трансфекции. Мы рекомендуем проводить формирование комплексов в бессывороточной среде (например, DMEM) или в солевых буферах, таких как PBS или TE.

Повысить эффективности трансфекции можно подбором оптимального времени ее проведения после рассеивания клеток (например, через 18, 24 и 48 ч), определением наиболее эффективной культуральной плотности/конфлюентности (варьировать плотность суспензионных культур от 1 до 10×10^6 в 1 мл культуральной среды и конфлюентность адгезивных культур от 40% до 100%), а также выбором оптимальной культуральной среды.

Время инкубации клеток с комплексами может варьировать от ~12 ч (инкубация в течение ночи) в отсутствие токсичности для клеток до 15 мин при высокой токсичности (среднее время инкубации с клетками при выраженной токсичности составляет 4 ч). Увеличение времени инкубации комплексов с клетками повышает уровень трансфекции, в то же время повышая токсичность и вероятность гибели клеток.

Локализованная специфическая трансфекция

Локализованная специфическая трансфекция требует меньшей нагрузки ДНК на аналогичное количество клеток и может потребоваться большее количество реактива серии GenJect из расчета на 1 мкг ДНК: например, от 0,1 до 0,25 мкг ДНК и 0,5 - 1,5 мкл реактива. В остальном, протокол повторяет трансфекцию с целью гиперэкспрессии белка.

Трансфекция РНК

Реактивы GenJector-U и GenJect-40 могут быть использованы для эффективной трансфекции РНК по протоколу, полностью аналогичному трансфекции ДНК. Дополнительно можно варьировать объем буфера для формирования комплексов.

Конверсия форматов культивирования клеток

	Ростовая площадь, см ²	Объем полной ростовой среды для культивирования, мл	Количество клеток на лунку при рассеивании x 10 ⁴				Объем полной ростовой среды для трансфекции, мл	Объем буфера с комплексами (примерно в сумме), мкл	Кол-во реагента GenJect на лунку, мкл	Объем буфера для разведения GenJect, мкл	Кол-во ДНК/РНК на лунку, мкг*	Объем буфера для разведения ДНК/РНК, мкл
			HeLa	NIH 3T3	HEK 293T	CHO-K1						
96-лун	0.32	0.2	1	0.8	2	1.3	0.1	10	0.2	5	0.1	5
24-лун	1.9	0.5	6	5	12	8	0.25	25	0.5	12.5	0.25	12.5
12-лун	3.5	1	11	8	22	14	0.5	50	1	25	0.5	25
6-лун	9.6	2	30	23	60	38	1	100	2	50	1	50
60-мм	21.5	5	67	52	134	85	2.5	250	5	125	2.5	125
100-мм	56.7	10	177	136	354	224	5	500	10	250	5	250
25-см ²	25	5	78	60	156	99	2.5	250	5	125	2.5	125
75-см ²	75	12	234	180	469	297	6	600	12	300	6	300

коэффициент пересчета

1

/2

/20

коэффициент пересчета

1

/50

/2

/100

/2

*для трансфекции NIH 3T3 клеток умножить количество нуклеиновой кислоты и реагента на 5.

Расчет реагента серии GenJect приведен исходя из концентрации реагента 2 мкл на 1 мл полной ростовой среды. Данная концентрация является оптимальной в большинстве экспериментов.

Примеры трансфекции

Овер-экспрессия

Экспрессируемые белки	Плазмиды	На 1 мл ростовой среды		Клеточная линия	Время трансфекции (инкубации комплексов с клетками), ч	Буфер для формирования комплексов НК/GenJect	Протестированный формат трансфекции
		ДНК, мкг	GenJect, мкл				
GFP		1	2	HEK293T	4 – 12	DMEM	96-лун. планшет
		1,2	1,2 – 2,4	CHO	12		
		1 – 1,2	1 – 2	Neuro2a	12 – 24		
		1 – 1,2	1 – 2	SH-SY5Y	12 – 24		
RFP		1,2	1,2	HEK293T	4 – 12	DMEM	96-лун. планшет
TurboGFP	pTurboGFP (Evrogen, Russia)	1	2	HEK293T	4 – 12	DMEM	96-лун. планшет
$\alpha 7$ nAXP + NACHO + Case12	<ul style="list-style-type: none"> • human $\alpha 7$ nAChR-pCEP4 (rat $\alpha 7$ nAChR-pcDNA 3.1/Hygro(+)) • TMEM35-pCMV6-XL5 (OriGene, USA) • pCase12-cyto vector (Evrogen, Russia) 	<i>Всего 1 - 1,2:</i>		Neuro2a	12 – 24	DMEM	Планшеты: 96-лун., 24-лун., 6-лун 35 мм ч.Петри
		- 0,7	2,4				
$\alpha 7$ nAXP + Ric3 + Case12	<ul style="list-style-type: none"> • human $\alpha 7$ nAChR-pCEP4 (rat $\alpha 7$ nAChR-pcDNA 3.1/Hygro(+)) • Ric3-pCMV6-XL5 (OriGene, USA) • pCase12-cyto vector (Evrogen, Russia) 	<i>Всего 1 - 1,2:</i>		Neuro2a	12 – 24	DMEM	Планшеты: 96-лун., 24-лун., 6-лун 35 мм ч.Петри
		- 0,7	2,4				
		- 0,2 ÷ 0,3	2	HEK293T	4 – 12		
		- 0,1 ÷ 0,2	2	HEK293T	4 – 12		

Экспрессируемые белки	Плазмиды	На 1 мл ростовой среды		Клеточная линия	Время трансфекции (инкубации комплексов с клетками), ч	Буфер для формирования комплексов НК/GenJect	Протестированный формат трансфекции
		ДНК, мкг	GenJect, мкл				
мышечный nAChR ($\alpha 1\beta 1\delta\epsilon/\gamma$ nAChR) + Case12	<ul style="list-style-type: none"> • mouse $\alpha 1$ nAChR-coding pRBG4 • mouse $\beta 1$ nAChR-coding pRBG4 • mouse δ nAChR-coding pRBG4 • mouse ϵ/γ nAChR-coding pRBG4 • pCase12-cyto vector (Evrogen, Russia) 	<i>Всего 1 - 1,5:</i> - 0,2 ÷ 0,3 - 0,2 ÷ 0,3 - 0,2 ÷ 0,3 - 0,2 ÷ 0,3 - 0,2 ÷ 0,3	2,4 – 3 <hr/> 2	Neuro2a HEK293T	12 – 24 4 – 12	DMEM	Планшеты: 96-лун., 24-лун., 6-лун 35 мм ч.Петри

nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

NACHO, Ric3 – шапероны

Case12 – цитоплазматический генетически-кодируемый флуоресцентный сенсор ионов Ca^{2+}