



Promega

Technical Bulletin

siRNA 導入試薬

siGENE

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS EIF6100, EIF,6200 and EIF6500.



www.promega.com

siGENE

製品マニュアルは弊社のウェブサイトでもご購入頂けます (www.promega.co.jp/lit/siGENE/)。最新バージョンについてはウェブサイトをご覧ください。製品の技術的なお問い合わせは prometec@jp.promega.com までお寄せください。

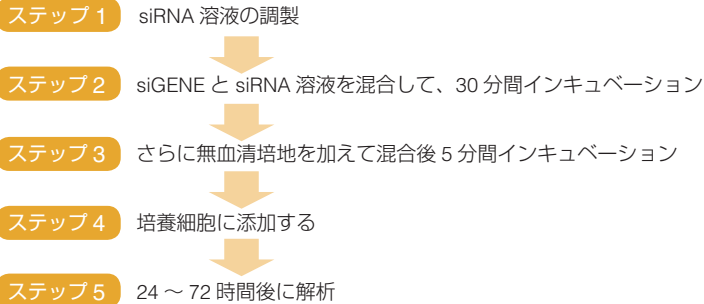
I. はじめに	1
II. 製品容量と保存	2
III. プロトコール	2
A. 細胞の準備	2
B. siRNA の細胞へのトランスフェクション	3
C. siRNA / プラスミド DNA の細胞への同時トランスフェクション	4
IV. 参考文献	5
V. 関連製品	5

I. はじめに

本製品は、様々な哺乳動物由来の培養細胞中へ siRNA を効果的に導入できるように最適化されたトランスフェクション試薬です。独自に開発したカチオン性ポリマーとプロトスポンジ効果により、低毒性で高い核酸導入効率が得られます (参考文献 1, 2)。

特長

- ・新しい細胞導入メカニズム
- ・正常細胞を含む多くの細胞に対し、低毒性かつ高いノックダウン効果
- ・操作が簡便
- ・血清存在下においても siRNA の導入が可能
- ・プラスミド DNA/siRNA の導入も可能



II. 製品容量と保存

容量

Product	Size	Cat. #
siGENE (凍結乾燥品)	0.33mg (1 x 0.33mg)	ETF6100
	0.66mg (2 x 0.33mg)	ETF6200
	1.98mg (6 x 0.33mg)	ETF6500

siGENE 1.98mg は 24 ウェルプレート 18 枚分 (450well 分 : 900 pmol 相当の siRNA)

保存方法

- ・未溶解の siGENE は、冷蔵保存 (4° C) して下さい (-20° C でも保存可能)。
- ・溶解後は、冷蔵 (4° C) で 3 ヶ月、-20°C で 6 ヶ月の保存が可能です。

III. プロトコール

A. 細胞の準備

以下のプロトコールは、24 ウェルプレート用です。ご利用のプレートに応じて試薬量は調節してください (表 1 参照)

接着細胞 : トランスフェクションする当日に 50 ~ 80% コンフルエントになるように、細胞を播種しておきます。培地 (血清を含む^{注1}) の量はトランスフェクション時には 500 μ l にします。

浮遊細胞 : トランスフェクション当日に、500 μ l の培地 (血清を含む^{注1}) に $0.5 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞 (細胞種に依存) になるように播種します。

B. siRNA の細胞へのトランスフェクション

1. siGENE に 750 μ l の滅菌水 (室温) を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合します。溶解後の試薬は、4 $^{\circ}$ C もしくは -20 $^{\circ}$ C で保存してください。
2. siRNA を Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Life Technologies) もしくは無血清培地で希釈し、終濃度 1.0 pmol/ μ l の siRNA 溶液を調製します^{注2}。
3. 調製した siRNA 溶液 20 μ l (20 pmol) に siGENE 10 μ l を加え、タッピングでよく混合し、室温で 30 分間インキュベートします。(siGENE/siRNA 複合体形成)。
4. 1 ウェルあたり 30 μ l の siGENE /siRNA 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを揺らして混合します。
5. 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下でインキュベートします^{注3}。
6. 24~72 時間後に標的遺伝子発現のノックダウン効果がみられます。

表 1. 様々な細胞培養フォーマットにおける siRNA トランスフェクションスケール

	Growth Area*	培地量 (ml)	siGENE (μ l)	siRNA 溶液 siRNA / total volume	1ウェルあたりの 添加量 (μ l)
96-well	0.32 cm ²	0.1	2	4 pmol / 4 μ l	6
48-well	0.82 cm ²	0.2	4	8 pmol / 8 μ l	12
24-well	1.88 cm ²	0.5	10	20 pmol / 20 μ l	30
12-well	3.83 cm ²	1.0	20	40 pmol / 40 μ l	60
6-well	9.4 cm ²	2.5	50	100 pmol / 100 μ l	150
35 mm	8.0 cm ²	2.0	40	80 pmol / 80 μ l	120
60 mm	21 cm ²	5.0	100	200 pmol / 200 μ l	300

* Corning[®] culture dishes のデータによります。

siGENE と siRNA 溶液との最適混合比率・添加量は、細胞種および実験条件により異なることがあります。混合比率、添加量の検討もお勧めします^{注6}。

C. siRNA / プラスミド DNA の細胞への同時トランスフェクション

1. siGENE に 750 μ l の滅菌水 (室温) を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合します。溶解後の試薬は、4 $^{\circ}$ C もしくは -20 $^{\circ}$ C で保存してください。
2. 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーに、0.2 μ l のプラスミド DNA、10 pmol の siRNA を添加し、11.8 μ l となるよう調製します^{注4}。
3. 調整した 11.8 μ l の DNA、siRNA-Tris 溶液に siGENE 8.7 μ l を加え、タッピングでよく混合し、室温で 25 分間インキュベートします (siGENE /siRNA / プラスミド DNA 複合体形成)。
4. さらに 14.5 μ l の Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Life Technologies)、または無血清培地を添加し、よく混合し、室温で 5 分間静置します^{注5}。
5. 1 ウェルあたり 35 μ l の siGENE /siRNA / プラスミド DNA 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを手揺らして混合します。
6. 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下でインキュベートします^{注3}。
7. 24~72 時間後に標的遺伝子発現のノックダウン効果がみられます。

表 2. 様々な細胞培養フォーマットにおける siRNA/DNA トランスフェクションスケール

	Growth Area*	培地量 (ml)	siGENE (μ l)	siRNA/DNA-Tris 溶液		Opti-MEM [®] (μ l)	1 ウェルあたりの添加量 (μ l)
				siRNA/DNA/total volume			
96-well	0.32 cm ²	0.1	1.7	2pmol/0.04 μ g/2.4 μ l	2.9	7	
			2.7	4pmol/0.04 μ g/4.1 μ l	4.8	11.6	
48-well	0.82 cm ²	0.2	3.5	4pmol/0.08 μ g/4.7 μ l	5.8	14	
			5.5	8pmol/0.08 μ g/8.2 μ l	9.6	23.3	
24-well	1.88 cm ²	0.5	8.7	10pmol/0.2 μ g/11.8 μ l	14.5	35	
			13.7	20pmol/0.2 μ g/20.4 μ l	24	58.1	
12-well	3.83 cm ²	1	17.5	20pmol/0.4 μ g/23.5 μ l	29	70	
			27.5	40pmol/0.4 μ g/40.8 μ l	48	116.3	
6-well	9.4 cm ²	2.5	43.7	50pmol/1 μ g/58.8 μ l	72.5	175	
			68.7	100pmol/1 μ g/102 μ l	120	290.7	
35 mm	8 cm ²	2	35	40pmol/0.8 μ g/47 μ l	58	140	
			55	80pmol/0.8 μ g/81.6 μ l	96	232.6	
60 mm	21 cm ²	5	87.5	100pmol/2 μ g/117.5 μ l	145	350	
			137.5	200pmol/2 μ g/204 μ l	240	581.5	

* Corning[®] culture dishes のデータによります。

siGENE と siRNA 溶液との最適混合比率・添加量は、細胞種および実験条件により異なることがあります。混合比率、添加量の検討もお勧めします^{注6}。

注 1: 血清を含む培地と無血清培地を使った場合の導入効果に大きな違いは認められません。

注 2: siRNA を TE もしくは滅菌水で溶解して使用することも可能です。

注 3: 細胞毒性が見られる場合は、複合体溶液を添加して 4~6 時間後に新しい増殖培地に交換してください。

注 4: DNA を溶解する溶液として 20mM Tris-HCl(pH7.4) 以外に TE (Tris/EDTA) も利用可能です。

注 5: OPTI-MEM[®] 培地の代わりに PBS を使用すると毒性が強く認められるケースがあります。

注 6: 細胞によって最適な混合比が異なります。表 1 および表 2 にあるような、いくつかの混合比を検討して頂き、最適な混合比を決定してください。

IV. 参考文献

1. T.Takahashi, K.Kono, T.Itoh, N.Emi, T.Takagishi: Synthesis of novel cationic lipids and their transfection activity. *Bioconjugate Chem.*, **14**, 764-773 (2003).
2. T.Takahashi, A.Harada, N.Emi, K.Kondo: Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance. *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1160-1165 (2005).

V. 関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)
トランスフェクション試薬			
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311	55,000
	5X1ml	E2312	220,000
FuGENE® 6 Transfection Reagent	1ml	E2691	55,000
	5X1ml	E2692	220,000

Opti-MEM is a registered trademark of Life Technologies Corporation.



プロメガ株式会社

東京都中央区日本橋大伝馬町 14-15
TEL: 03-3669-7981 FAX: 03-3669-7982



www.promega.com