

Traditional トランスフェクションプロトコル (96 ウェルプレート用)

必要なもの

抗生物質不含の無血清培地 (トランスフェクションする細胞の培養に使用できるもの)

細胞の準備 (トランスフェクション前日)

接着細胞の場合、トランスフェクション当日に25-50%コンフルエントになるように播種します。

このときの培地は血清を含む増殖培地を使用します。

一般に96 ウェルプレートでは、100 μ Lの培地中に5,000~30,000 cells/ウェルが適当です。

※細胞によって最適な細胞密度、播種数は異なります。上記は検討開始時の目安です。

FuGENE® SI Transfection Reagentの準備 (当日)

1. 使用前にFuGENE® SI Transfection Reagent を室温に戻します。
2. 転倒混和またはボルテックスにより混和します。

FuGENE® SI Transfection Reagent/RNA混合液の準備 (当日)

※96 ウェルプレート 25 ウェル分、FuGENE SI : siRNA=0.3 μ L : 1 pmol の場合

1. 滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、あらかじめ室温にした抗生物質不含の無血清培地 117.5 μ L を加えます。
2. 7.5 μ L の FuGENE® SI Transfection Reagent を培地に直接加え、高速のボルテックスですばやく混合します。
※注意：FuGENE® SI Transfection Reagent の原液を、プラスチック側面に触れないようにしてください。
3. 新しい滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、あらかじめ室温にした抗生物質不含の無血清培地 122.5 μ L を加えます。
4. 2.5 μ L の RNA (10 μ M, 25 pmol) を加え、ボルテックスで混和します。
5. 新しい滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、ステップ 2 で希釈した 125 μ L の FuGENE® SI Transfection Reagent とステップ 4 で希釈した RNA 溶液 125 μ L を添加、ボルテックスで混和します。室温で 5-15 分間インキュベートします。

細胞へのトランスフェクション

1. FuGENE® SI Transfection Reagent/RNA 混合液のうち、10 μ L を、各ウェル (100 μ L の細胞培養培地あたり) に加えます。ピペットをプラスチック側面や培地液面に触れないよう液滴を落とすように添加してください。ピペティングまたはプレートシェーカーで混合します。
2. 細胞をインキュベータに戻して 24-72 時間インキュベートします。標的遺伝子に適した方法によりノックダウン効率を測定します。

表 1. プレートサイズ別混合比

プレート サイズ	培養面積 (cm ²)*1	面積比	培地量 (mL)	細胞数 (cells/well)	FuGENE/siRNA 混合液量 (μ L/well)	siRNA 量 (pmol/well)	FuGENE SI® 液量(μ L)
96-well	0.32	1X	0.1	5,000~30,000	10	1	0.3
24-well	1.88	5X	0.5	25,000~150,000	50	5	1.5
12-well	3.83	10X	1	50,000~300,000	100	10	3.0
6-well	9.4	30X	2.5	125,000~750,000	250	25	7.5
35 mm	8	25X	2.5	125,000~750,000	250	25	7.5
60 mm	21	65X	5	250,000~1,500,000	500	50	15
100 mm	55	170X	10	750,000~4,500,000	1,000	150	45

*1: This information was calculated for Corning® culture dishes.

詳細なプロトコルは製品マニュアル# TM711 をご覧ください。

製品マニュアル#TM711 : <https://www.promega.jp/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/fugene-si-transfection-reagent-protocol-tm711.pdf>



Reverse トランスフェクションプロトコル (96 ウェルプレート用)

必要なもの

抗生物質不含の無血清培地 (トランスフェクションする細胞の培養に使用できるもの)

細胞の準備 (トランスフェクション当日)

接着細胞の場合、25-50%コンフルエントになるような細胞数を準備します。一般に Traditional プロトコルの2倍の細胞数 (10,000~60,000 cells/100 μ L/ウェル) が適当です。細胞を回収し、血清を含む増殖培地に懸濁します。

※細胞によって最適な細胞密度、播種数は異なります。上記は検討開始時の目安です。

FuGENE® SI Transfection Reagentの準備 (当日)

1. 使用前にFuGENE® SI Transfection Reagent を室温に戻します。
2. 転倒混和またはボルテックスにより混和します。

FuGENE® SI Transfection Reagent/RNA混合液の準備 (当日)

※96 ウェルプレート 25 ウェル分、FuGENE SI : siRNA=0.3 μ L : 1 pmol の場合

1. 滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、あらかじめ室温にした抗生物質不含の無血清培地 117.5 μ L を加えます。
2. 7.5 μ L の FuGENE® SI Transfection Reagent を培地に直接加え、高速のボルテックスですばやく混合します。
※注意：FuGENE® SI Transfection Reagent の原液を、プラスチック側面に触れないようにしてください。
3. 新しい滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、あらかじめ室温にした抗生物質不含の無血清培地 122.5 μ L を加えます。
4. 2.5 μ L の RNA (10 μ M, 25 pmol) を加え、ボルテックスで混和します。
5. 新しい滅菌チューブまたは U 字/V 字ボトムプレートに、ステップ 2 で希釈した 125 μ L の FuGENE® SI Transfection Reagent とステップ 4 で希釈した RNA 溶液 125 μ L を添加、ボルテックスで混和します。室温で 5-15 分間インキュベートします。

細胞へのトランスフェクション

1. FuGENE® SI Transfection Reagent/RNA 混合液のうち、10 μ L を各ウェルに加えます。
2. 10,000~60,000 cells/100 μ L に調製した細胞を 100 μ L ずつプレートに播種します。ピペッティングまたはプレートシェーカーで混合します。
3. 細胞をインキュベータに戻して 24-72 時間インキュベートします。標的遺伝子に適した方法によりノックダウン効率を測定します。

表 1. プレートサイズ別混合比

プレート サイズ	培養面積 (cm ²)*1	面積比	培地量 (mL)	細胞数 (cells/well)	FuGENE/siRNA 混合液量 (μ L/well)	siRNA 量 (pmol/well)	FuGENE SI® 液量(μ L)
96-well	0.32	1X	0.1	10,000~60,000	10	1	0.3
24-well	1.88	5X	0.5	50,000~300,000	50	5	1.5
12-well	3.83	10X	1	100,000~600,000	100	10	3.0
6-well	9.4	30X	2.5	250,000~1,500,000	250	25	7.5
35 mm	8	25X	2.5	250,000~1,500,000	250	25	7.5
60 mm	21	65X	5	500,000~3,000,000	500	50	15
100 mm	55	170X	10	1,500,000~9,000,000	1,000	150	45

*1: This information was calculated for Corning® culture dishes.

詳細なプロトコルは製品マニュアル# TM711 をご覧ください。

製品マニュアル#TM711 : <https://www.promega.jp/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/fugene-si-transfection-reagent-protocol-tm711.pdf>

