

siRNA / miRNA transfection KIT

GenomONE®-Si

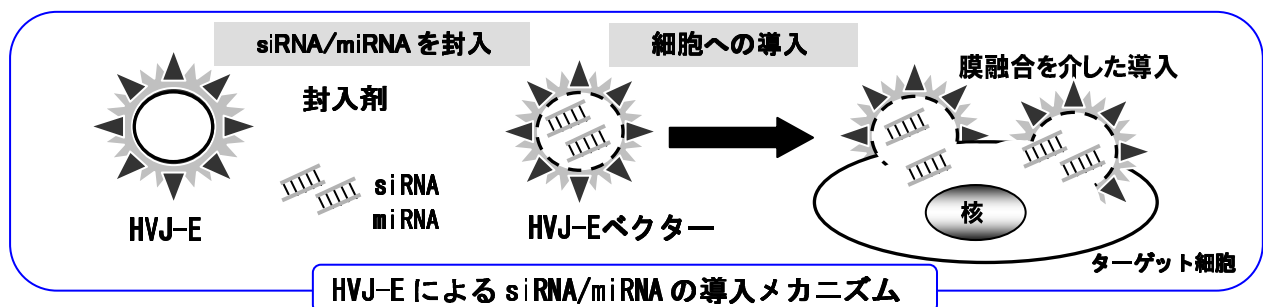
取扱説明書（第1版）

1. 概要	1
1-1: トランスフェクション原理・概要	1
1-2: 製品仕様	2
2. 細胞への siRNA/miRNA の導入	3
2-1: プロトコル(1) 初回検討用	3
2-2: プロトコル(2) 最適化検討用	4
3. 動物個体への siRNA の導入 (<i>in vivo</i>)	6
3-1: プロトコル(3) <i>in vivo</i> siRNA 導入用	6
使用上の注意	8

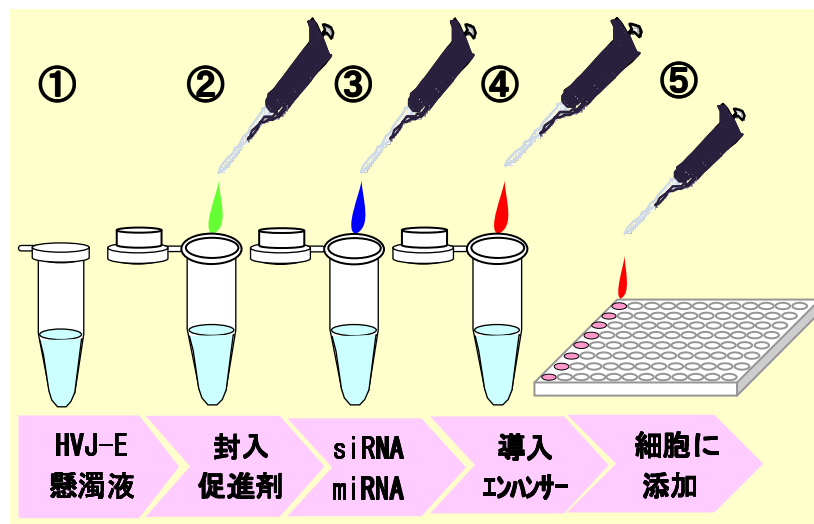
1. 概要

1-1: トランスフェクション原理・概要

HVJ Envelope (以下 HVJ-E) 内に siRNA、miRNA を封入して HVJ-E ベクターとし、融合 (F) タンパク質の膜融合活性を利用して標的細胞や組織に導入します。



基本のプロトコル(1)では、5ステップ(5~10分)でトランスフェクションが完了します。



この取扱説明書（以下「本書」と表記）では、GenomONE®シリーズを用いて siRNA/miRNA をトランスフェクションする際の標準的な方法を記載しています。ここに記載された方法である程度の導入効率を得ることが可能ですが、細胞種ごとに最適となる条件は異なりますので、注意事項等に記載のある項目について、適宜条件の最適化を行っていただくことをお勧めします。

1-2 : 製品仕様

製品名	製品コード	内容および容量			
		冷蔵 (4~8℃) 保存			
		凍結乾燥 HVJ-E 0.26mL 相当/本	試薬 D 0.5mL/本	試薬 E 4.0mL/本	緩衝液 6.5mL/本
GenomONE-Si	GS001	1	1	1	1
	GS004	4	1	1	1
	GS016	16	4	4	4
	GS040	40	10	10	10

【補助試薬の役割】

- 試薬 D (封入剤) : HVJ-E の膜の透過性を高めます。
- 試薬 E (導入エンハンサー) : siRNA/miRNA を封入した HVJ-E ベクターと細胞(または組織)との親和性を高め、導入効率を向上させます。

【使用回数】

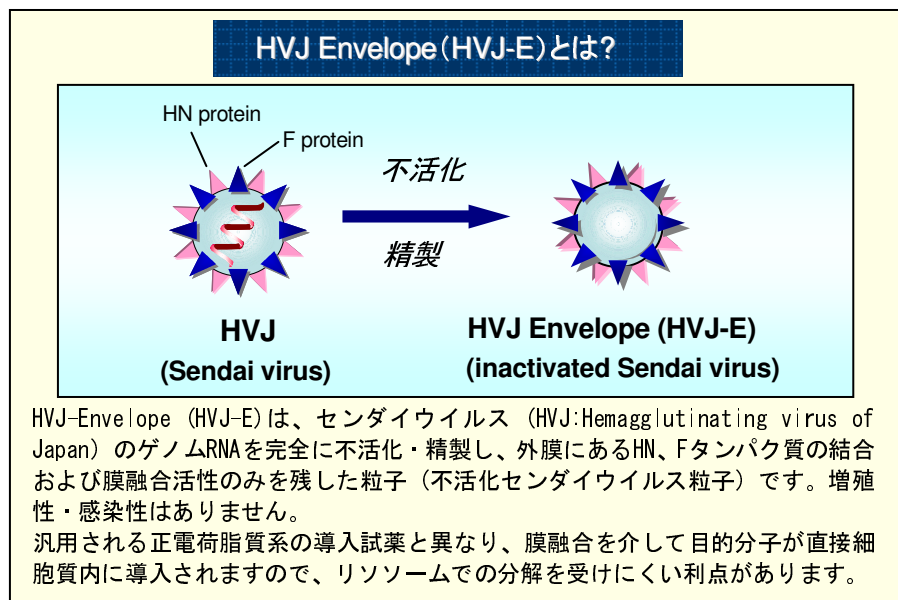
製品コード	HVJ-E (本)	使用回数 assays (wells)		
		6-well plate	24-well plate	96-well plate
GS001	1	100	400	2,000
GS004	4	400	1,600	8,000
GS016	16	1,600	6,400	32,000
GS040	40	4,000	16,000	80,000

【保存安定性】

- キットの品質保証期限 : HVJ-E のアルミ袋に記載
- 凍結乾燥 HVJ-E は加湿により活性が低下しますので、必ずアルミ袋に密封して冷蔵 (4-8℃) で保存してください。
- 緩衝液を用いて調製後の HVJ-E 懸濁液 : 冷蔵 (4~8℃) で 2 週間。
分注後 -80℃ で 3 ヶ月間、再融解後は冷蔵で 2 週間 (凍結融解は 1 回のみ可能です。)

【品質】

- HVJ-E は、ウイルスを原料としていますが、その増殖性、感染性を完全に不活化した精製品です。
- 無菌試験でバクテリア、カビ類の混入がないことを確認しています。
- 血清存在下においても、培養細胞に siRNA や miRNA を導入することが可能です。



2 細胞への siRNA/miRNA の導入

2-1. プロトコル(1) 初回検討用

【適用】 接着系、浮遊系何れの細胞も、初回はプロトコル(1)でご検討ください。

▼HVJ-E懸濁液の調製

凍結乾燥HVJ-Eに、氷冷した緩衝液0.26mLを添加し、泡立たないように穏やかにピペティングして均一な懸濁液としてください。懸濁後は活性の低下を防ぐため直ちに氷冷してください。保存法はP2を参照。

▼オリゴ型 siRNA/miRNA 溶液濃度：10 μM (2~50 μM) (21nt siRNA: 10 μM=10pmol/μL≈0.14 μg/μL)

▼プロトコル(1) 初回検討用基本プロトコル

Step	手順	試薬量 (6-well plate 1well分)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E懸濁液: 2.5 μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5 μL
③	siRNAまたはmiRNA溶液を添加・混合(タッピング)	siRNA/miRNA溶液: 10 μL
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5 μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液④をwell 中の細胞培養液に添加し、37°C・5%CO ₂ 下で培養 (必要に応じて0.5~4時間後に培地交換)	HVJ-Eベクター懸濁液: 18 μL

①~④の操作は、必ず氷上で行ってください(温度上昇によるHVJ-Eの活性低下を防ぐため)。

試薬Dの添加量は、HVJ-E懸濁液の1/5量としてください。

プレートサイズ別試薬量 (添加量/well)

プレートサイズ	HVJ-E 懸濁液 ①	試薬D ②	siRNA/miRNA ③	試薬E ④	HVJ-E ベクター懸濁液⑤ 添加量/well
6-well	2.5 μL	0.5 μL	10 μL	5 μL	18 μL/well × 1 well
24-well	2.5 μL	0.5 μL	10 μL	5 μL	4.5 μL/well × 4 wells
96-well	2.5 μL	0.5 μL	10 μL	5 μL	0.9 μL/well × 20 wells

【接着系細胞の細胞数】

プレートサイズ	播種細胞数 *
6-well	0.4~2.0 × 10 ⁵ cells/2.0mL of medium/well
24-well	1.0~5.0 × 10 ⁴ cells/0.5mL of medium/well
96-well	0.2~1.0 × 10 ⁴ cells/0.1mL of medium/well

*トランスフェクションは上記条件で1日培養後、50~80% confluent の状態で実施

【浮遊系細胞の細胞数】 (初代培養免疫系細胞の場合は下記の10倍の細胞数を目安としてください)

プレートサイズ	播種細胞数
6-well	0.8~8.0 × 10 ⁵ cells/2.0mL of medium/well
24-well	0.2~2.0 × 10 ⁵ cells/0.5mL of medium/well
96-well	0.4~4.0 × 10 ⁴ cells/0.1mL of medium/well

【トラブルシューティング】

導入効率が低い場合は、以下の処理で効率を高めることが可能な場合があります。

- ・ siRNA/miRNA 溶液の濃度を上げる
- ・ HVJ-E 懸濁液①の添加量を増やす
- ・ プロトコル(2)で検討

細胞毒性が認められる場合は、以下の対応で毒性を軽減させることが可能な場合があります。

- ・ HVJ-E懸濁液①、試薬D、試薬Eを緩衝液で~4倍の範囲で希釈して使用する
- ・ プロトコル(2)で検討する

2-2. プロトコル(2) 最適化検討用 [プロトコル(1) + 遠心処理]

【適用】

浮遊系細胞への導入において、プロトコル(1)で細胞毒性が高いあるいは導入効率が低い場合は、siRNAまたはmiRNAを封入したHVJ-Eベクター懸濁液と細胞とを混合後に遠心処理を行うプロトコル(2)で改善できるケースがあります。

▼HVJ-E懸濁液の調製

凍結乾燥HVJ-EIに、氷冷した緩衝液0.26mLを添加し、泡立たないように穏やかにピペティングして均一な懸濁液としてください。懸濁後は活性の低下を防ぐため直ちに氷冷してください。保存法はP2を参照。

▼オリゴ型 siRNA/miRNA 溶液濃度：10 μ M (2~50 μ M) (21nt siRNA: 10 μ M=10pmol/ μ L \sim 0.14 μ g/ μ L)

▼プロトコル(2) 最適化検討用プロトコル

①~④は基本プロトコル(1)と同じ手順です

Step	手 順	試薬量 (6-well plate 1well 分)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E懸濁液: 2.5 μ L
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 0.5 μ L
③	siRNAまたはmiRNA溶液を添加・混合(タッピング)	siRNA/miRNA溶液: 10 μ L
④	試薬Eを添加・混合(タッピング)	試薬E: 5 μ L
⑤	HVJ-E ベクター懸濁液④と培地に懸濁した細胞とをマイクロテストチューブ内で混合	HVJ-E ベクター懸濁液: 18 μ L 細胞: 0.5mL
⑥	5,000g、4°Cで 10 分間遠心	
⑦	上清を除去し、培地 2.0mLに再懸濁後、培養プレートに播種して、37°C・5%CO ₂ 下で培養	再懸濁培地: 2.0mL プレートサイズに合わせて分注

①~⑤の操作は、必ず氷上で行ってください(温度上昇によるHVJ-Eの活性低下を防ぐため)。

試薬Dの添加量は、HVJ-E懸濁液の1/5量としてください。

⑥の遠心は、細胞へのダメージが無い範囲で条件(回転数、温度、時間)を設定してください。

【浮遊系細胞のプレートサイズ別分注量、細胞数および assay 数】

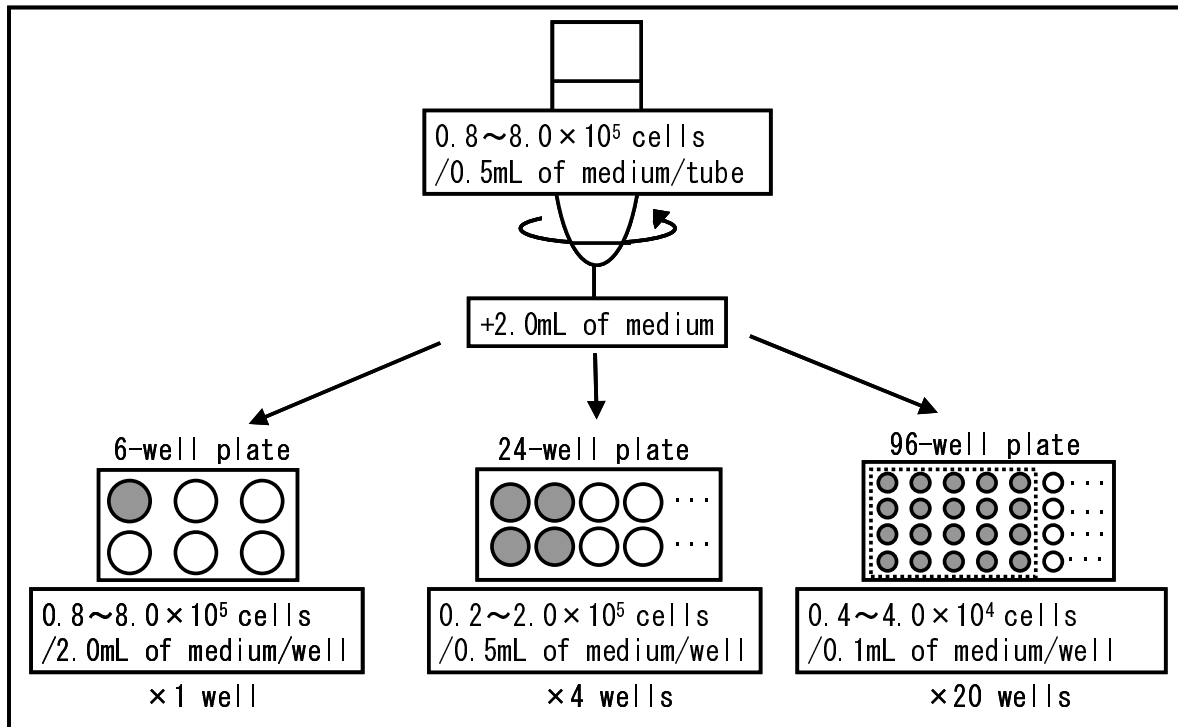
プレート サイズ	遠心処理時⑤ 細胞数/チューブ	再懸濁培地⑦ /チューブ	プレート播種時⑦		assay 数 (wells)
			分注量/well	細胞数/well*1	
6-well	0.8~8.0 $\times 10^5$ cells /0.5mL of medium	2.0mL	2.0mL	0.8~8.0 $\times 10^5$ cells	1
24-well			0.5mL	0.2~2.0 $\times 10^5$ cells	4
96-well			0.1mL	0.4~4.0 $\times 10^4$ cells	20

*1: 細胞数/well はプロトコル(1)と同じです。

【接着系細胞(剥離させて浮遊状態の細胞)のプレートサイズ別分注量、細胞数および assay 数】

プレート サイズ	遠心処理時⑤ 細胞数/チューブ	再懸濁培地⑦ /チューブ	プレート播種時⑦		assay 数 (wells)
			分注量/well	細胞数/well*2	
6-well	0.8~4.0 $\times 10^5$ cells /0.5mL of medium	2.0mL	2.0mL	0.8~4.0 $\times 10^5$ cells	1
24-well			0.5mL	0.2~1.0 $\times 10^5$ cells	4
96-well			0.1mL	0.4~2.0 $\times 10^4$ cells	20

*2: 細胞数/well はプロトコル(1)の2倍です。



浮遊系細胞へのトランスフェクションの考え方

【トラブルシューティング】

導入効率が低い場合は、以下の処理で効率を高めることが可能な場合があります。

- ・ siRNA/miRNA 溶液の濃度を上げる
- ・ HVJ-E 懸濁液①の添加量を増やす

細胞毒性が認められる場合は、以下の対応で毒性を軽減させることが可能な場合があります

- ・ HVJ-E懸濁液①、試薬D、試薬Eを緩衝液またはPBSで~4倍の範囲で希釈する

3. 動物個体へのトランスフェクション (*in vivo*)

動物個体への適用の一例として、ここではマウスの臓器、組織、血管内に投与する場合の例を記載しています。対象となる動物の種類や標的臓器・部位などにより、投与方法や投与量などの条件は多岐に考えられますので個別の事例についてはご検討いただくか、弊社担当までご相談ください。

3-1. プロトコル(3) *in vivo* siRNA 導入用

▼HVJ-E懸濁液の調製

凍結乾燥HVJ-Eに、氷冷した緩衝液0.26mLを添加し、泡立たないように穏やかにピペティングして均一な懸濁液としてください。懸濁後は活性の低下を防ぐため直ちに氷冷してください。保存法はP2を参照。

▼オリゴ型 siRNA/miRNA 溶液濃度：1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (21nt siRNA: 10 μM = 10pmol/ μL = ~0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

プロトコル(3) 動物個体への siRNA 導入プロトコル

Step	手順	試薬量
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E懸濁液: 40 μL
②	試薬Dを添加・混合(タッピング)	試薬D: 8 μL
③	10,000g (10,000~12,000rpm)、4°Cで10分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をsiRNAまたはmiRNA溶液にて懸濁(ピペティング20~30回)	siRNA/miRNA溶液: 10 μL
⑤	HVJ-Eベクター懸濁液を動物に投与 (必要に応じ生理食塩水などで希釈)	投与量: 目的に応じて調整

①~④の操作は、必ず氷上で行ってください(温度上昇によるHVJ-Eの活性低下を防ぐため)。

試薬Dの添加量は、HVJ-E懸濁液の1/5量としてください。

【ワンポイントアドバイス】

- ・HVJ-E懸濁液①の使用量は、マウスの場合40~80 μL 、ラットでは200~400 μL を目安にお考えください。HVJ-E懸濁液①の使用量に応じて、以降の各種試薬量も比例計算して調整してください。
- ・投与量は、投与対象部位、投与ルート等の実験系に応じ、HVJ-Eベクター懸濁液⑤に適宜緩衝液または生理食塩水等を加えて調整してください。
- ・動物への投与では、基本的に試薬Eを使用(添加)しないことを推奨いたします。導入物質を投与部位近傍の組織に留めたい場合には、HVJ-Eベクター懸濁液⑤に試薬Eを添加することで調整を行うことも可能です。
- ・HVJ-Eは生体内、特に血液中で血球細胞への吸着が起こる可能性がありますので、できるだけ血液との接触が少ない投与ルートを選択するか、投与前に灌流処理することを推奨いたします。

<MEMO>

使用上の注意

1. 本製品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト・動物への医療・臨床目的および生体内外診断の目的には使用できません。
2. 本製品は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ議定書担保法）」の規制を受けずにご使用いただけますが、組換え DNA 実験の実施に際しては、当該法律および各研究機関内の安全性委員会の定める「組換え DNA 実験指針」を遵守し、実験目的に応じた適切な設備を有する実験室をご使用ください。
3. 本製品を用いた実験は、細胞培養および遺伝子工学に関する基本的な知識と手技を習得した実験者により実施してください。
4. 本キットに含まれる HVJ Envelope (HVJ-E) は、HVJ（センダイウイルス）を不活性化しており増殖性・感染性を完全になくしてありますが、膜の融合活性は保持していますので、万一の人体への吸入や付着を防ぐため安全キャビネット内で操作し、実験者は手袋、マスク等の防護具をご使用ください。
5. 実験後の空容器の廃棄に際しても取扱に注意し、適切に処置してください。
6. キット付属の他の試薬類については、毒物や劇物に属するものではありませんが、取扱に際しては手袋・マスク等の防護具をご使用ください。
7. 凍結乾燥 HVJ-E は、無菌試験でバクテリア、カビ類の混入がないことを確認していますが、全ての微生物の存在を否定するものではありませんので、ご使用に際してはご注意ください。
8. 本製品の使用によって生じた如何なる事故、損害に対しても、弊社では責任を負いかねますので、予めご了承の上ご使用ください。
9. 弊社の文書による事前許諾なしに本製品の商業目的でのご使用、製品の改変等による再販売はできません。

取扱説明書の記載内容は変更される場合があります。最新版は下記ホームページよりダウンロードできます。

<http://www.iskweb.co.jp/hvj-e>

製造・販売

ISK 石原産業株式会社

ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.

〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

【お問い合わせ先】

☎フリーダイヤル **0120-409-816**

TEL : 06-6444-7182 FAX : 06-6444-7183

E-Mail : HVJ-E@iskweb.co.jp

URL : <http://www.iskweb.co.jp/hvj-e>