

GenomONE-Siを用いた、
siRNA/miRNA の導入プロトコル
の参考情報

石原産業株式会社

毒性が高い細胞での毒性軽減方法

【適用】

取扱説明書 3ページ目の基本プロトコルで細胞毒性が高い場合は、HVJ-E懸濁液に試薬Dを添加・混合した後に遠心、上清除去後に緩衝液で再懸濁を行う下記のプロトコルで改善できる場合があります。

▼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。保存法は取扱説明書2ページ目を参照。

▼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= ~0.14 μ g/ μ L)

▼使用上の注意

HVJ-E 懸濁液、siRNA/miRNA 溶液、試薬 D、試薬 E、緩衝液は氷冷したものをご使用ください。

▼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 μ L
②	試薬Dを添加・混合（タッピング）	試薬D： 0.5 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心	
④	上清除去後、緩衝液で再懸濁	緩衝液： 3.0 μ L
⑤	siRNAまたはmiRNA溶液を添加・混合（タッピング）	siRNA/miRNA溶液： 10 μ L
⑥	試薬Eを添加・混合（タッピング）	試薬E： 5 μ L
⑦	Step⑥で調製した懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37 $^{\circ}$ C・5%CO ₂ 下で培養 ^{*1}	HVJ-E ベクター懸濁液 (④+⑤+⑥)： 18 μ L

①~⑥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）。

Reagent Dの添加量は、HVJ-E懸濁液の1/5量としてください。

*1：遺伝子サイレンシング効果は適切な時間にモニタリング（例：実験系にもよりますがトランスフェクション後6~72時間）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	緩衝液 ④	siRNA/miRNA ⑤	試薬 E ⑥	HVJ-E ベクター懸濁液⑦ 添加量/well
6-well	2.5 μ L	0.5 μ L	3.0 μ L	10 μ L	5 μ L	18 μ L/well×1 well
24-well	2.5 μ L	0.5 μ L	3.0 μ L	10 μ L	5 μ L	4.5 μ L/well×4 wells
96-well	2.5 μ L	0.5 μ L	3.0 μ L	10 μ L	5 μ L	0.9 μ L/well×20 wells

【細胞数】

接着系細胞および浮遊系細胞のトランスフェクション時の細胞数は取扱説明書 3 ページ目を参照。

【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 懸濁液の添加量を増やす
- ・ 取扱説明書 4 ページ目の「基本プロトコル+遠心処理」で検討する

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、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
- ・ 取扱説明書4ページ目の「基本プロトコル+遠心処理」で検討する

GenomONE-SIの取扱説明書は、以下のWeb サイトから入手することが可能です。

<http://www.iskweb.co.jp/hvj-e/si/sitec2.pdf>