

HVJ Envelope siRNA/miRNA transfection kit

GenomONE-Si

High-throughput screening (HTS)のデータ集



石原産業株式会社

〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

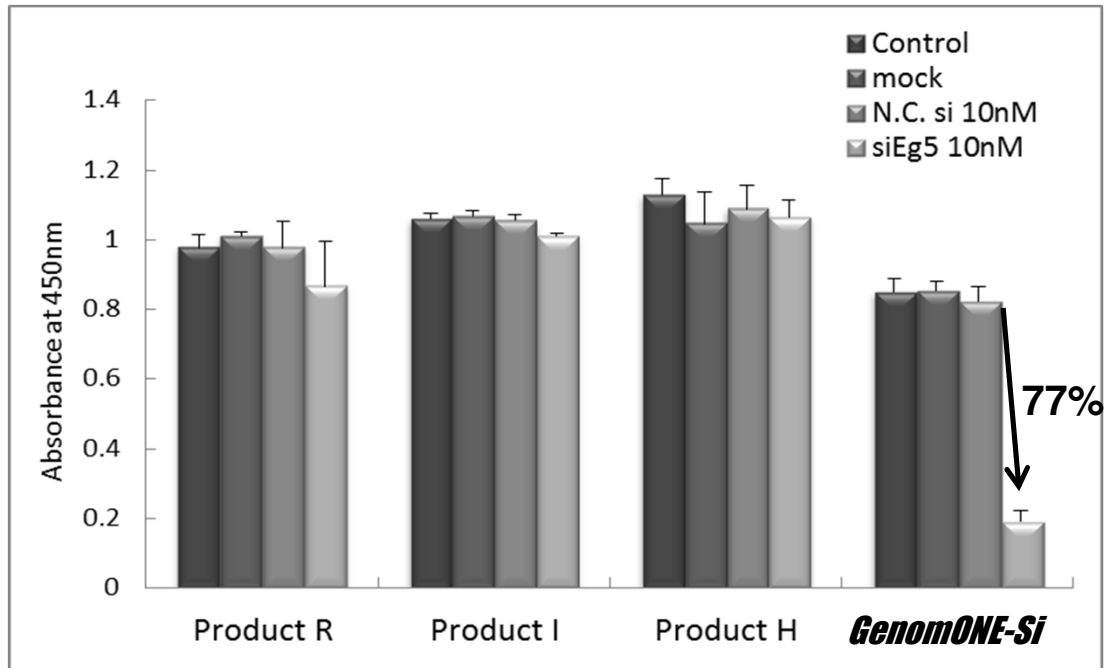
フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

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

U-937

siRNA transfection (HTS-RT法)



U-937へのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA (10nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A_{450})

実験材料・方法

- 【Cell】 : U-937(Human leukemic monocytic lymphoma cell line, ATCC : CRL-1593.2)
 【Culture condition】 : 5×10^3 cells/well/100 μ L, RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum
 【96-well plate】 : IWAKI 1860-096 (Non-Treated)
 【siRNA】 : Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)
 Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-RT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 5 μ L
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 1 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 200 μ L
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (0.23 μ M, 培養液中の終濃度 10nM)	siRNA溶液 : 5 μ L
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5 μ L
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5 μ L
⑧	予め調製しておいた細胞懸濁液を各ウェルに添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	細胞 : 100 μ L

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-SiのHTS-RT法を用いてU-937にEg5 siRNAを導入したところ、77%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、**GenomONE-Si**の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

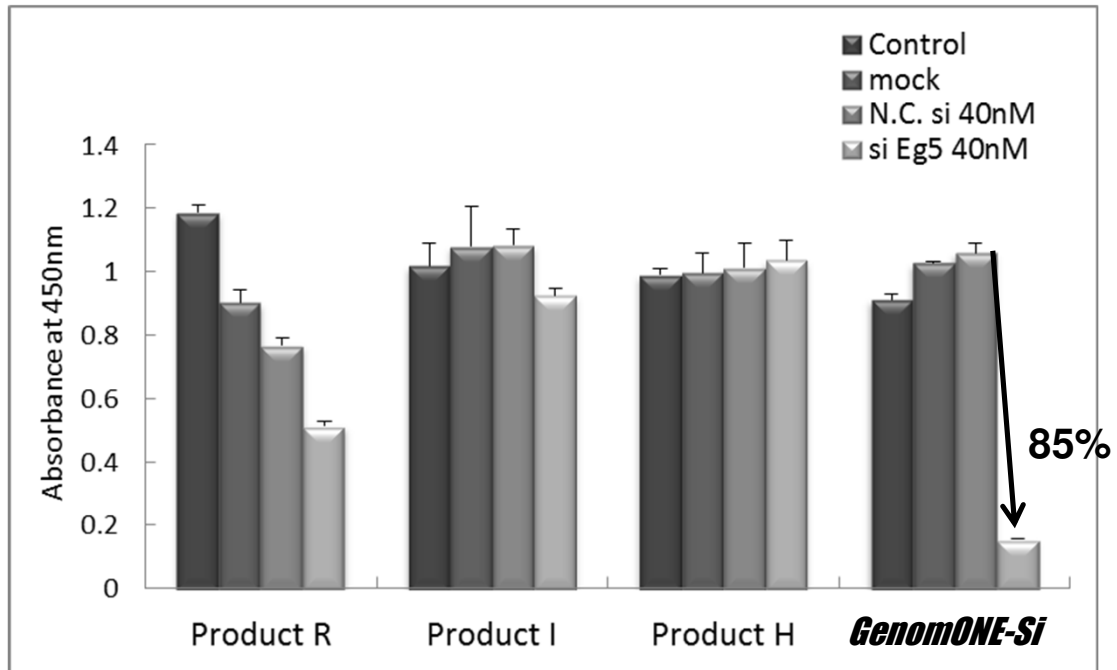
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-001

THP-1

siRNA transfection (HTS-RT法)



THP-1へのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA (40nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A_{450})

実験材料・方法

【Cell】 : THP-1(Human acute monocytic leukemia cell line, ATCC : TIB-202)

【Culture condition】 : 2.5×10^4 cells/well/100 μ L, RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum

【96-well plate】 : IWAKI 1860-096 (Non-Treated)

【siRNA】 : Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-RT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 5 μ L
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 1 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 200 μ L
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (0.92 μ M, 培養液中の終濃度 40nM)	siRNA溶液 : 5 μ L
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5 μ L
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5 μ L
⑧	予め調製しておいた細胞懸濁液を各ウェルに添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	細胞 : 100 μ L

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-SiのHTS-RT法を用いてTHP-1にEg5 siRNAを導入したところ、85%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、**GenomONE-Si**の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

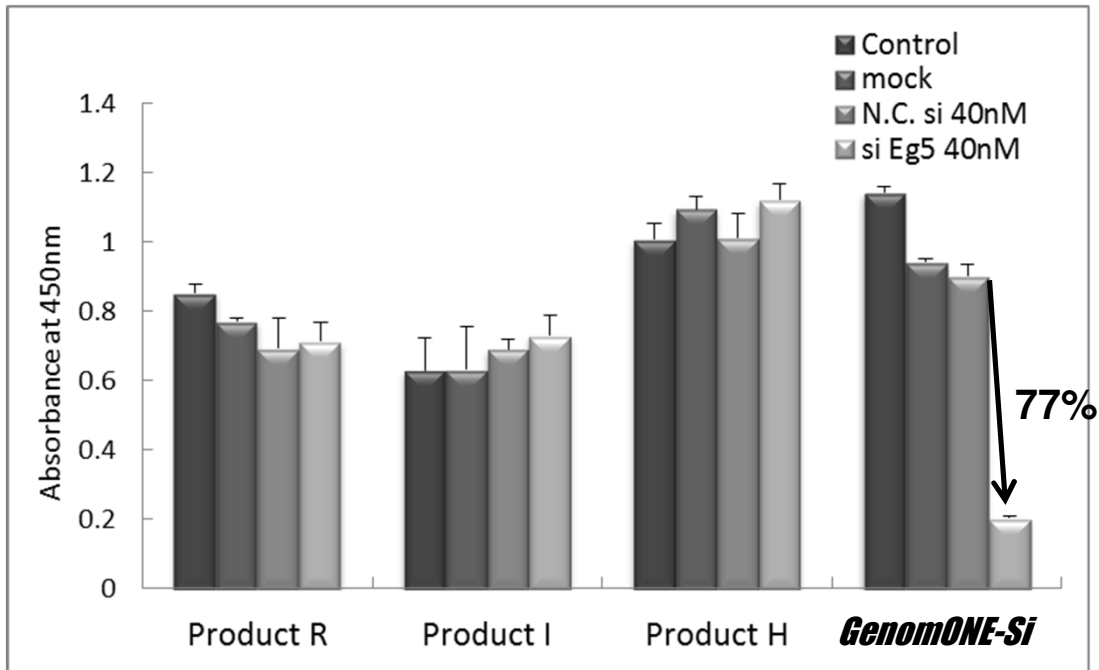
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-002

Jurkat

siRNA transfection (HTS-RT法)



JurkatへのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA (40nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A₄₅₀)

実験材料・方法

- 【Cell】 : Jurkat clone E6-1(Human T cell leukemia cell line, ATCC : TIB-152)
 【Culture condition】 : 2.5×10⁴cells/well/100μL, RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum
 【96-well plate】 : IWAKI 1860-096 (Non-Treated)
 【siRNA】 : Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)
 Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-RT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 5μL
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 1μL
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 200μL
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (0.92μM, 培養液中の終濃度 40nM)	siRNA溶液 : 5μL
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5μL
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5μL
⑧	予め調製しておいた細胞懸濁液を各ウェルに添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	細胞 : 100μL

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-SiのHTS-RT法を用いてJurkatにEg5 siRNAを導入したところ、77%のノックダウン効果が得られた。一方、他の導入試薬を用いた場合は、十分な効果が得られず、**GenomONE-Si**の優位性が示された。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

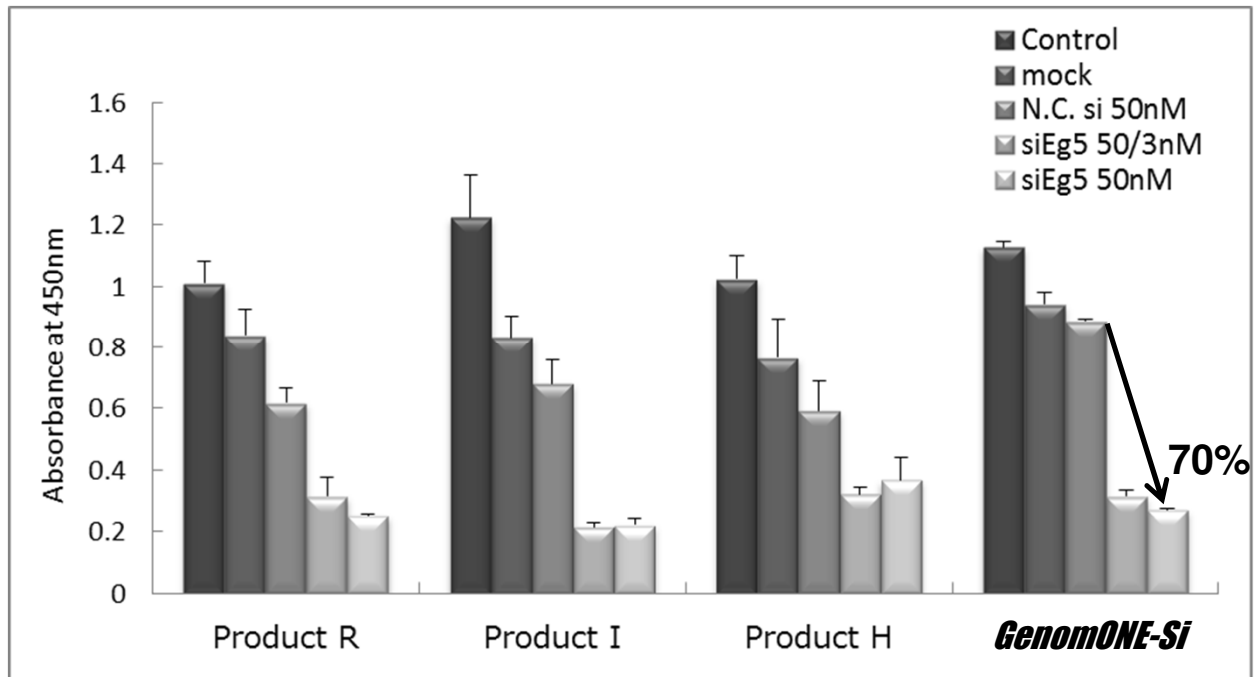
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-003

HeLa

siRNA transfection (HTS-RT法)



HeLaへのEg5 siRNAの導入

Eg5 siRNA (50/3, 50nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A_{450})

実験材料・方法

【Cell】 : HeLa (Human cervical carcinoma cell line, ATCC : CCL-2)

【Culture condition】 : 4×10^3 cells/well/100 μ L, DMEM with 10% fetal calf serum

【96-well plate】 : IWAKI 3860-096 (Tissue culture Treated)

【siRNA】 : Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-RT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 5 μ L
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 1 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 200 μ L
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (1.15/3, 1.15 μ M, 培養液中の終濃度 50/3, 50nM)	siRNA溶液 : 5 μ L
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5 μ L
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5 μ L
⑧	予め調製しておいた細胞懸濁液を各ウェルに添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	細胞 : 100 μ L

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-Si のHTS-RT法を用いてHeLaにEg5 siRNAを導入したところ、50/3nMで65%、50nMで70%のノックダウン効果が得られ、他の導入試薬を用いた場合と遜色ない効果が得られた。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

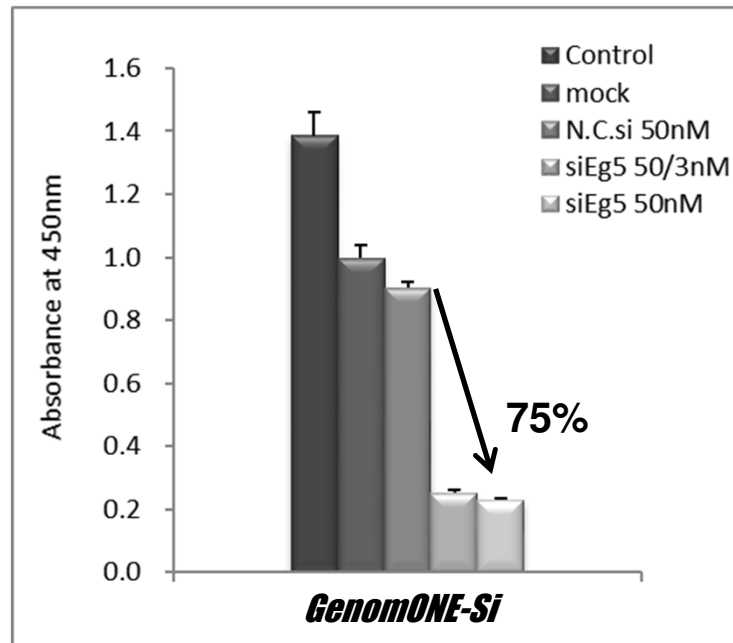
〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-004

HeLa

siRNA transfection (HTS-FT法)



HeLaへのEg5 siRNAの導入

細胞播種 → 1 day → Eg5 siRNA (50/3, 50nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A_{450})

実験材料・方法

【Cell】 : HeLa (Human cervical carcinoma cell line, ATCC : CCL-2)

【Culture condition】 : 2×10^3 cells/well/100 μ L, DMEM with 10% fetal calf serum

【96-well plate】 : IWAKI 3860-096 (Tissue culture Treated)(細胞培養用)

IWAKI 1860-096 (Non-Treated)(HVJ-Eベクター調製用)

【siRNA】 : Silencer KIF11(Eg5) siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-FT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 10 μ L
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 2 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 400 μ L
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (1.15/3, 1.15 μ M, 培養液中の終濃度 50/3, 50nM)	siRNA溶液 : 5 μ L
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5 μ L
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5 μ L
⑧	予め細胞を播種しておいたプレートの各ウェルにHVJ-Eベクター懸濁液を添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	HVJ-Eベクター : 15 μ L

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-Si のHTS-RT法を用いてHeLaにEg5 siRNAを導入したところ、50/3nMで72%、50nMで75%のノックダウン効果が得られた。

Eg5(KIF 11)はキネシン様モータータンパク質として、細胞分裂する際の紡錘体微小管を形成するために必須であり、その機能が阻害されると細胞分裂の停止とアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

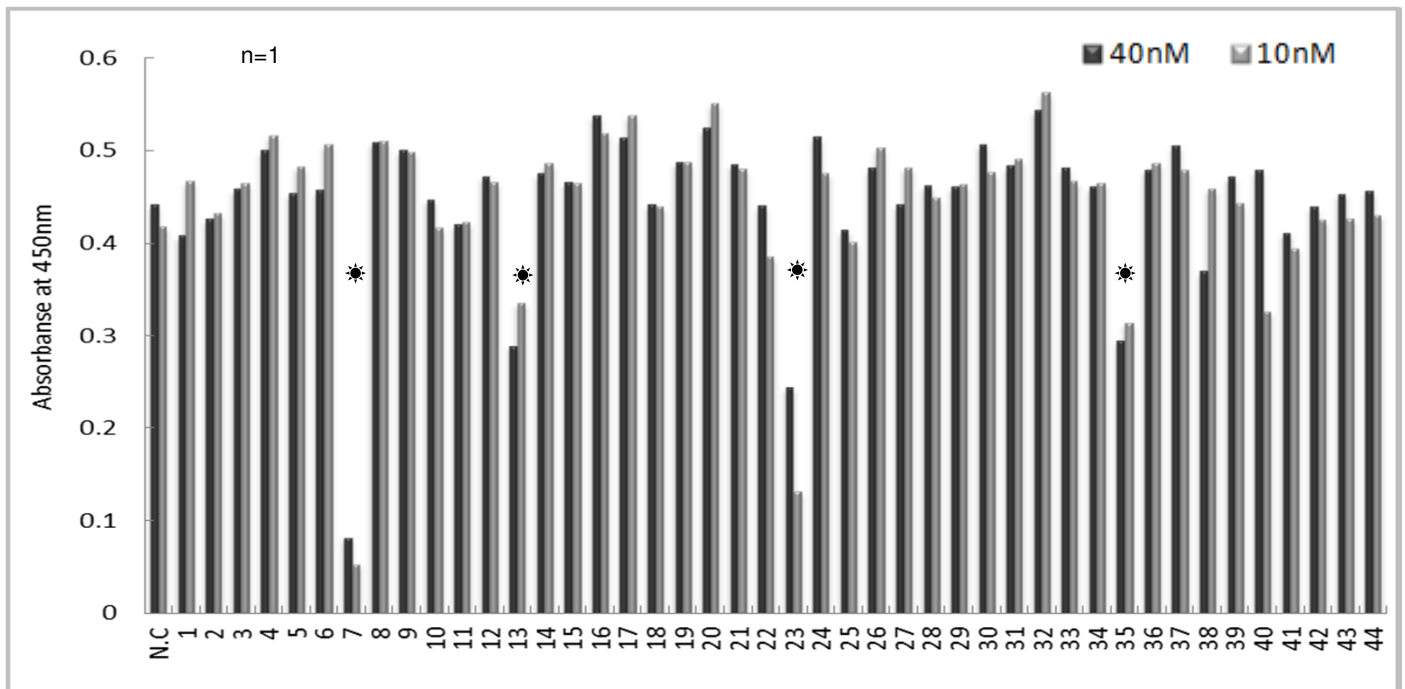
E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp

〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-005

siRNA library transfection (HTS-RT法)



U-937への siRNA library の導入

siRNA Library (10, 40nM) transfection → 2 days → WST-8 (細胞数測定, A_{450})

実験材料・方法

- 【Cell】 : U-937(Human leukemic monocytic lymphoma cell line, ATCC : CRL-1593.2)
 【Culture condition】 : 5×10^3 cells/well/100 μ L, RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum
 【96-well plate】 : IWAKI 1860-096 (Non-Treated)
 【siRNA】 : siRNA Library, Cell cycle-regulated genes(Dharmacon)
 Negative control #1 siRNA(Thermo Fisher Scientific Code No.AM4639)

Step	手順 (HTS-RT法)	試薬量 (96-well plate)
①	HVJ-E懸濁液をマイクロテストチューブに採取	HVJ-E : 30 μ L
②	Reagent Dを添加・混合 (タッピング)	Reagent D : 6 μ L
③	10,000g(10,000~12,000rpm)・4℃で5分間遠心し、上清除去	
④	沈殿をBufferで再懸濁 (ピペッティング)	Buffer : 1200 μ L
⑤	siRNA溶液を96-wellプレート各ウェルに添加 (0.23, 0.92 μ M, 培養液中の終濃度 10, 40nM)	siRNA溶液 : 5 μ L
⑥	Step④で調製した懸濁液を各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	懸濁液(④) : 5 μ L
⑦	Bufferで20倍希釈したReagent Eを各ウェルに添加・混合 (ピペッティング)	1/20 Reagent E : 5 μ L
⑧	予め調製しておいた細胞懸濁液を各ウェルに添加し、37℃・5%CO ₂ 下で培養	細胞 : 100 μ L

①~④の操作は、氷上で実施

GenomONE-Si のHTS-RT法を用いてU-937に細胞周期調節に関わるsiRNAライブラリーのsiRNAを導入したところ、4種類のPositiveな活性を示すsiRNAがヒットした。

実験にはヒトの細胞周期関連遺伝子のsiRNAライブラリーを使用した。細胞分裂の際に必要な機能が障害されると細胞分裂の停止やアポトーシスが誘導される。その現象を利用してsiRNAの導入効果をWST-8法 (生細胞数測定法) にて定量的に評価。



石原産業株式会社

フリーダイヤル 0120-409-816 FAX : 06-6444-7183

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

〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

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

No.GS-HTS-006

GenomONE-Si (HVJ Envelope siRNA/miRNA transfection kit)

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. Freeze-dried 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。

