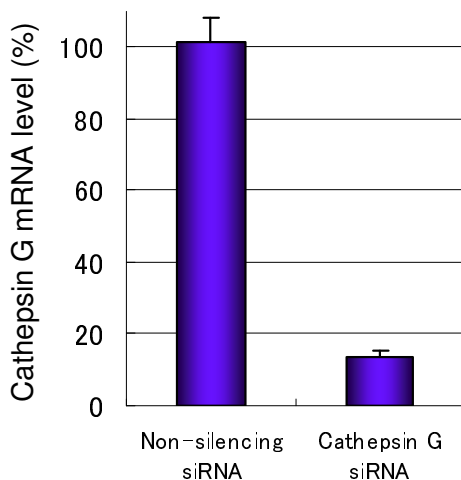


RNAi in difficult-to-transfect U937 cells

リポソーム系試薬やエレクトロポレーションでも導入が難しいとされるヒト単球性白血病U937細胞に対し *GenomONE-Neo* を用いて siRNA を効率良く導入し、85%以上の高いノックダウン効果を得た実験例をご紹介します。

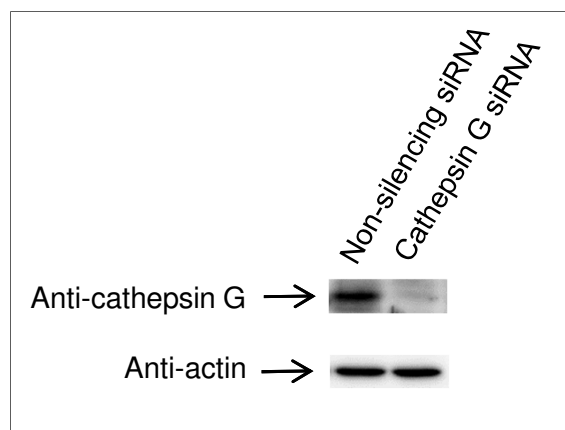
- ▶ siRNA導入72時間後にU937細胞を回収し、cathepsin GのmRNAおよびタンパク質量の変化を real-time PCR、Western blottingにより評価した。

Real-time PCR



Cathepsin G-specific siRNAの導入により、cathepsin GのmRNAレベルは約14%まで減少した。

Western blotting



Cathepsin G-specific siRNAの導入により、cathepsin Gのタンパク質レベルは約15%まで減少した。

- ▶ *GenomONE-Neo* は、他の導入試薬やエレクトロポレーションによる標準的な導入法よりも導入効率が高く、さらに細胞毒性が低いため、十分なノックダウン効果が得られた。

【データ提供】

土屋 幸弘 先生 (昭和薬科大学 衛生化学研究室)
(現) 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部

【関連文献】

Tsuchiya Y. *et al.*: 4-Hydroxy-2-nonenal-modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is degraded by cathepsin G. *Free Radical Biology & Medicine*, **43**, 1604-1615 (2007).

ISK 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

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

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

Efficient RNAi in U937 cells by using GenomONE-Neo

実験材料

トランスフェクション試薬: GenomONE-Neo (石原産業株式会社)
siRNA: HP GenomeWide siRNA (QIAGEN)
Cathepsin G-specific: Hs_CTSG_4 HP siRNA : 20 μ M
Non-silencing control: AllStars Negative Control siRNA: 20 μ M
U937細胞: 10%FBS-RPMI1640培地で培養
トランスフェクション前日に50% confluentに調整し、再培養
トランスフェクション当日、 2×10^6 cells/mLに調整し使用まで氷上保存

プロトコル*

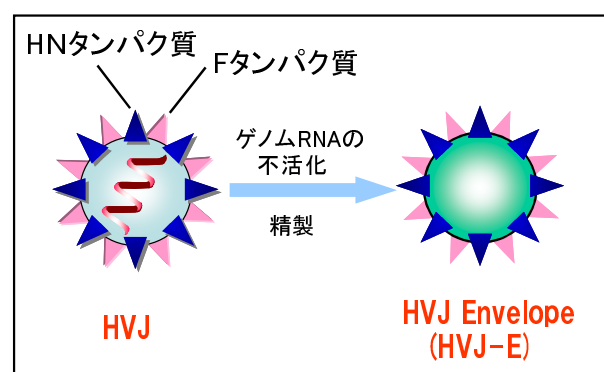
- 1) HVJ-E 懸濁液 20 μ Lをマイクロテストチューブに採取
- 2) siRNA溶液20 μ Lを添加・混合 (タッピング)
- 3) 試薬 B (封入剤) 4 μ L を添加・混合 (タッピング)
- 4) 10,000 \times g (12,000 rpm)、4 $^{\circ}$ Cで6分間遠心し、上清除去
- 5) 沈殿を緩衝液25 μ Lに懸濁 (ピペッティング20~30回)
- 6) 試薬 C (導入エンハンサー) 10 μ Lを添加・混合 (タッピング)
- 7) HVJ-Eベクター懸濁液35 μ Lの入ったチューブに、10%FBS-RPMI1640培地**に懸濁した細胞 0.5mL (1×10^6 cells) を加え軽くピペッティング
- 8) 10,000 \times g (12,000 rpm)、4 $^{\circ}$ Cで20分間遠心し、上清除去
- 9) 10%FBS-RPMI1640培地** 2.0 mLに再懸濁後、6-wellプレートに移し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で培養
- 10) 72時間後細胞を回収し解析に使用

* 1)~6)の操作は氷冷下で行う

** Opti-MEMなどの無血清培地では細胞毒性が強くなる傾向にあるため血清入りRPMI1640を使用

HVJ-Eとは？

GenomONE(ゲノムワン)シリーズは、センダイウイルス (HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)を完全に不活化・精製し、外膜(エンベロープ)の膜融合能だけを残した vesicle (HVJ Envelope: HVJ-E)と専用補助試薬をセットにした非ウイルス系トランスフェクション試薬です。プラスミドDNA、siRNA、アンチセンスオリゴ、デコイオリゴ、ペプチド、抗体、酵素などを培養細胞や動物組織に導入するツールとして幅広くご利用いただけます。



Kaneda, Y., et al.: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy*, 6, 219-226 (2002)

ISK 石原産業株式会社

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

〒550-0002 大阪市西区江戸堀1丁目3番15号

いますぐこちらにアクセス → <https://www.iskweb.co.jp/products/hvj-e/>