

## はじめに

HilyMaxによりsiRNAをトランスフェクションする方法として、以下の2つの実験方法に関するプロトコルをご用意しました。目的とする実験の手順に従い、トランスフェクションを行って下さい。HilyMaxの調製法、保存条件およびプラスミドDNA導入に関しましては、製品添付のマニュアルを参照下さい。

初めてHilyMaxをsiRNA導入に使用する際は、『最適導入条件の検討方法』を参考に、必ず導入条件の最適化を行ってください。また24ウェルプレート以外のプレートを使用する際は、表3『培養プレート毎条件』を参照のもと、培養条件、複合体調製条件を変更して下さい。

### siRNAの導入

標的となる遺伝子が内在的に存在する細胞へ、HilyMaxによりsiRNAを導入し、標的遺伝子のノックダウン効果を確認する方法です。

### siRNAとDNAの同時導入（コトランスフェクション法）

siRNAとプラスミドDNAをHilyMaxにより同時に細胞へ導入し、DNAより転写されたmRNAのノックダウン効果を確認する方法です。コトランスフェクション法は、標的遺伝子を内在的にもつ細胞を必要としないため、簡易にsiRNAの能力を評価することが可能です。

### siRNA導入法：24ウェルプレート用

内在性遺伝子のノックダウン効果を確認するための、siRNA導入法を以下に示しました。

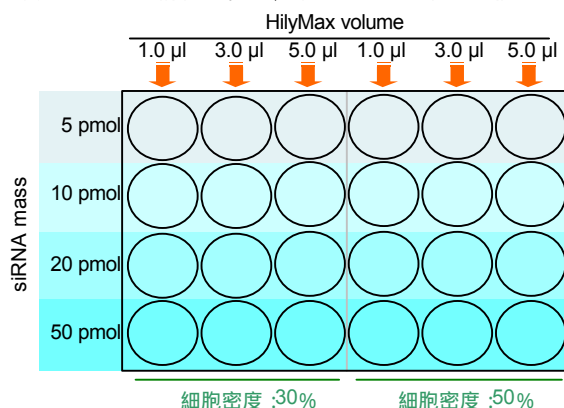
## 導入操作

1. 遺伝子導入時に細胞密度が30-50%になるよう増殖用培地で調整した細胞懸濁液 0.5 mlをプレートへ播種し、一晚培養する。
2. siRNA-HilyMax複合体の調製
  - 2-1. 抗生物質を含まない無血清培地 30  $\mu$ lを別途容器に用意する。
  - 2-2. 上記培地に、siRNA 5~50 pmol<sup>注)</sup>を添加し、ピペティングにより混合する。
  - 2-3. 上記siRNA溶液に、HilyMax溶液1~5  $\mu$ lを添加し、ピペティングにより混合する。
  - 2-4. 室温にて15分間静置する。
3. インキュベーション後のsiRNA-HilyMax複合体を準備した培養細胞へ添加する。
4. CO<sub>2</sub>インキュベーターにて、細胞を24~72時間培養する。
5. それぞれのレポーター遺伝子の発現活性を測定する。

<sup>注)</sup>使用するsiRNA溶液は、1  $\mu$ M以上の濃度でご使用下さい。

## 最適導入条件の検討方法

図1を参考にHilyMaxによる最適なsiRNAの導入条件をご検討下さい。細胞密度30%及び50%にて評価を行い、最適な細胞密度を確認することをお勧めします。



本検討による確認事項  
siRNAの最適量  
HilyMaxの最適量  
最適な細胞密度

図1 最適条件検討用プレートレイアウト

24ウェルプレート以外をご使用の際は、図1のDNA量およびHilyMax添加量に表1の換算倍率表の値を乗じた量をご使用下さい。

表1 プレート毎換算倍率表

96 well plate	: × 0.2	12 well plate	: × 2	6 well plate (35 mm dish)	: × 4
60 mm dish	: × 8	100 mm dish	: × 24		

## 導入操作

### siRNA-DNAの同時導入法（コトランスフェクション法）：24ウェルプレート用

HilyMaxを用いてsiRNAとDNAを細胞へ同時にトランスフェクションするための操作方法を以下に示しました。

1. 遺伝子導入時に細胞密度が30～50%になるよう増殖用培地で調整した細胞懸濁液 0.5 mlをプレートへ播種し、一晚培養する。
2. DNA-siRNA-HilyMax複合体の調製
  - 2-1. 抗生物質を含まない無血清培地 30  $\mu$ lを別途容器に用意する。
  - 2-2. 無血清培地に、DNA 1  $\mu$ gを添加する。
  - 2-3. 上記DNA溶液に、siRNA 5～50 pmol<sup>注)</sup>を添加し、ピペティングにより混合する。
  - 2-4. 上記DNA-siRNA溶液に、HilyMax溶液3～7  $\mu$ lを添加し、ピペティングにより混合する。
  - 2-5. 室温にて15分間静置する。
3. インキュベーション後のDNA-siRNA-HilyMax複合体を準備した培養細胞へ添加する。
4. CO<sub>2</sub>インキュベーターにて、細胞を24～72時間培養する。
5. それぞれのレポーター遺伝子の発現活性を測定する。

<sup>注)</sup>使用するsiRNA溶液は、1  $\mu$ M以上の濃度でご使用下さい。

コトランスフェクション法による遺伝子導入の際は、コントロール実験を必ず行ってください。

siRNA(control)をコトランスフェクションした際のタンパク発現量が、HilyMax+DNAと同等の発現量となる条件を確認する必要があります。

siRNA(control)：細胞に影響しないsiRNA  
siRNA(target)：標的遺伝子をノックダウンするsiRNA

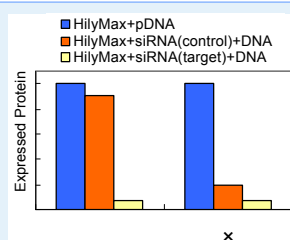


図2を参考にHilyMaxによる最適なsiRNA-DNAの導入条件をご検討下さい。評価の際、DNA量を固定しsiRNA及びHilyMaxの最適量をご確認下さい。

細胞密度30%及び50%にて評価を行い、最適な細胞密度を確認することをお勧めします。

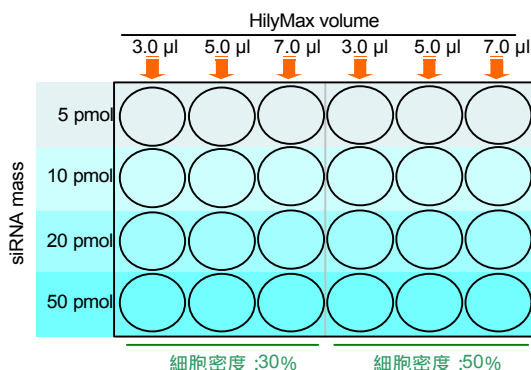


図2 最適条件検討用プレートレイアウト

#### 本検討による確認事項

siRNAの最適量  
HilyMaxの最適量  
最適な細胞密度

#### トラブルシューティング

問題：細胞毒性がみられる場合  
対処：DNA量を1/2～2/3倍に減らして下さい。

問題：導入効率が顕著に低い場合（毒性がない状態）  
対処：DNA量を1.5～2倍に増やして下さい。

24ウェルプレート以外をご使用の際は、図2のsiRNA量およびHilyMax添加量に表2の換算倍率表の値を乗じた量をご使用下さい。

表2 プレート毎換算倍率表

96 well plate	: ×0.2	12 well plate	: ×2	6 well plate (35 mm dish)	: ×4
60 mm dish	: ×8	100 mm dish	: ×24		

## 細胞容器毎条件

表3 細胞容器毎でのsiRNA導入条件

細胞培養条件			siRNA-HilyMax 調製条件			siRNA-DNA-HilyMax 調製条件 (コトランスフェクション法)			
培養容器	表面積	培養液量	無血清培地量	siRNA量	HilyMax	無血清培地量	siRNA量	DNA量	HilyMax
96 -well	0.3 cm <sup>2</sup>	0.1 ml	10 $\mu$ l	1-10 pmol	0.2-1.0 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1-10 pmol	0.2 $\mu$ g	0.6-1.4 $\mu$ l
24 -well	1.9 cm <sup>2</sup>	0.5 ml	30 $\mu$ l	5-50 pmol	1-5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	5-50 pmol	1.0 $\mu$ g	3-7 $\mu$ l
12 -well	3.8 cm <sup>2</sup>	1.0 ml	60 $\mu$ l	10-100 pmol	2-10 $\mu$ l	60 $\mu$ l	10-100 pmol	2.0 $\mu$ g	6-14 $\mu$ l
6 -well	9.2 cm <sup>2</sup>	2.0 ml	100 $\mu$ l	20-200 pmol	4-20 $\mu$ l	100 $\mu$ l	20-200 pmol	4.0 $\mu$ g	12-28 $\mu$ l
35 -mm	8.0 cm <sup>2</sup>	2.0 ml	100 $\mu$ l	20-200 pmol	4-20 $\mu$ l	100 $\mu$ l	20-200 pmol	4.0 $\mu$ g	12-28 $\mu$ l
60 -mm	21.0 cm <sup>2</sup>	5.0 ml	200 $\mu$ l	40-400 pmol	8-40 $\mu$ l	200 $\mu$ l	40-400 pmol	8.0 $\mu$ g	24-56 $\mu$ l
100 -mm	58.0 cm <sup>2</sup>	15.0 ml	600 $\mu$ l	120-1200 pmol	24-120 $\mu$ l	600 $\mu$ l	120-1200 pmol	24.0 $\mu$ g	72-168 $\mu$ l

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO 株式会社同仁化学研究所**  
 熊本県上益城郡益城町田原2025-5  
 熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202  
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525  
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp/

**ドージン・イースト(東京)**  
 東京都港区芝大門2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012  
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
 フリーダイヤル: 0120-489548  
 フリーファックス: 0120-021557