

N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System

製品番号 N2913

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)
製品説明

従来の lipid ベースの siRNA トランスフェクション試薬には、初期細胞、神経細胞、分化細胞、非分裂細胞のようなトランスフェクションが困難である細胞が存在するといったさまざまな欠点がありました。シグマの N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System はペプチドをベースとしたトランスフェクション試薬であり、今まで扱いにくかった真核細胞などに siRNA を効果的に導入するために特別にデザインされています。

N-TER ペプチドは siRNA と非共有結合で結合し、nanoparticle を形成します。形成された N-TER/siRNA nanoparticle のプロトコールはハイスループットに適しています。この nanoparticle は-20℃で少なくとも 1 年は安定です。そのため、この nanoparticle を使用することで日々の実験や長期的なプロジェクトにおいて再現性が向上します。加えて、血清の存在下・非存在下にかかわらず、この nanoparticle を細胞内にトランスフェクションすることが可能です。そのためさまざまなタイプの細胞へのトランスフェクション条件の最適化が容易になります。

N-TER nanoparticle は幅広い細胞種に対して有効です。(詳細は www.sigma.com/nter をご覧ください)

本製品に含まれる試薬

- N-TER Peptide, 製品番号 N2788
- siRNA Dilution Buffer, 製品番号 N0413

Catalog Number	Package Size		
N2913	120 ul	400 ul	1 ml
Catalog Number	Quantities Provided		
N2788	120 ul	400 ul	1 ml
N0413	4 ml	14 ml	34 ml

本製品の他にご用意いただく試薬および器機

- 血清フリーの細胞培地
- 完全細胞培地(10-15%の血清を含む)
- 2x 血清培地(完全培地の 2 倍量の血清を含む)
- Water, Molecular Biology Reagent, 製品番号 W4502
- Target siRNA
- ポジティブおよびネガティブ control siRNA
- 殺菌処理した組織培養用プレート
- マイクロ遠心機
- 殺菌処理したマイクロテストチューブ

ご使用前の注意と免責事項

この製品は試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。試薬を取り扱う際には、手袋、安全眼鏡や保護服などを着用して下さい。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート(MSDS)をご覧ください。

保存および安定性

この製品の保存期間は発送から 1 年です。N-TER Peptide は-20 で保存して下さい。N-TER Buffer は室温または 2-8℃で保存して下さい。

操作手順

Nanoparticle Formation Solution (NFS)の調整法

下記のプロトコールは 100uL Nanoparticle Formation Solution (NFS) の調整法です。この方法は 24 ウェルプレートの中の 4 ウェルをトランスフェクションするのに適した NFS で、1 ウェルあたり 0.6ml中に終濃度 20nM siRNA を含みます。

siRNA の異なる濃度をご希望の場合は、最終章の“N-TER Nanoparticle Formation Solution 量の算出”をご覧ください。

1. 室温で N-TER Peptide と 5uM siRNA working stocks を溶解してください(約 10 分)。軽くボルテックスし、スピンドウンしてください。5uM siRNA working stocks は必要になるまで氷上で保管して下さい。
2. Target siRNA、control (ポジティブもしくはネガティブ) siRNA、Cells only control 用の滅菌チューブを用意してください (Table 1)。1A~3A のチューブに適量の siRNA dilution buffer を加えて下さい。それから、1A および 2A のチューブにそれぞれ 5uM Target siRNA および 5uM control siRNA を加えて下さい。軽くボルテックスし、スピンドウンして下さい。希釈した Target siRNA、control siRNA、Cells only control を必要になるまで氷上で保管して下さい。

Table 1: Preparation of Target siRNA, Control siRNA and Cells only control dilutions

Reagent	Tube 1A Target siRNA	Tube 2A Control siRNA	Tube 3A Cells only control
5uM Target siRNA	13uL	0	0
5uM control siRNA	0	13uL	0
siRNA Dilution Buffer	37uL	37uL	50uL
Final Volume	50uL	50uL	50uL

3. 滅菌チューブに N-TER Peptide 希釈液を用意して下さい (Table 2)。1B から 3B のチューブに適量の水を加えて下さい。それから、1B と 2B のチューブに N-TER Peptide を加えてください。軽くボルテックスし、スピンドウンして下さい。

Table 2: Preparation of N-TER Peptide dilutions

Reagent	Tube 1B	Tube 2B	Tube 3B
N-TER Peptide	8uL	8uL	
Water	42uL	42uL	50uL
Final Volume	50uL	50uL	50uL

4. 1A の内容物を 1B に加えることで、Target siRNA Nanoparticle Formation Solution (NFS) を用意して下さい。軽くボルテックスし、スピンドウンして下さい。
5. 2A の内容物を 2B に、3A の内容物を 3B に加え、control siRNA NFS と Cells only control NFS を用意して下さい。軽くボルテックスし、スピンドウンして下さい。

Table 3: Preparation of Target and Control Nanoparticle Formation Solutions

Reagent	Tube 1B Target siRNA NFS	Tube 2B Control siRNA NFS	Tube 3B Cells only control NFS
From Tubes 1A→3A	50uL	50uL	50uL
From Tubes 1B→3B	50uL	50uL	50uL
Final Volume	100uL	100uL	100uL

NFS 中で N-TER Peptide/siRNA nanoparticle を形成するために Target siRNA NFS、control siRNA NFS と Cells only control NFS を室温で 15 分から 20 分間インキュベートして下さい。

Nanoparticle Formation Solutionを使用した細胞へのトランスフェクション

細胞の種類によっては N-TER Peptide/siRNA nanoparticle は血清存在下・非存在下でも効果的にトランスフェクションする可能性があります(方法 1 と 2)。

弊社 R&D にてさまざまな種類の細胞に対して、2 つの方法のバリデーションを行ってきました。お客様の細胞がバリデートされているかどうか確認は N-TER のウェブページ (<http://www.sigma.com/nter>) を参照してください。もしお客様の細胞がバリデートされていない場合、血清存在下・非存在下の両方法でトランスフェクションして下さい。それぞれの方法は下記のとおりです。

便宜上、24 ウェルプレートで 4 反復分に対する容量を下にリストしました。トランスフェクション培地の最終量は 1 ウェルにつき終濃度 20nM siRNA を含む 0.6mL です。もし siRNA を異なる濃度でトランスフェクションすることをご希望の場合は、最終章の“N-TER Nanoparticle Formation Solution 量の算出”をご覧ください。

トランスフェクションアッセイのための推奨細胞密度と液量

トランスフェクションする前に $1.3 \sim 2.6 \times 10^4$ の濃度で細胞を蒔き、16～20 時間インキュベートされることをお勧めします。それぞれのプレートの推奨培地量と細胞密度を Table 4 に示しております。ご参考下さい。

Table 4: Suggested cell densities and volumes for seeding cells to culture plates

Plate size	Number of cells per well	Surface area per well (cm ²) [†]	Volume per Well (mL)
96-well	$4.0 - 8.0 \times 10^3$	0.32	0.1
48-well	$1.2 - 2.4 \times 10^4$	0.95	0.3
24-well	$2.4 - 4.8 \times 10^4$	1.9	0.6
12-well	$4.8 - 9.6 \times 10^4$	3.8	1.2
6-well	$1.2 - 2.4 \times 10^5$	9.5	3.0

[†]Surface areas listed above are for Corning® Costar® tissue culture treated multi-well Plates with flat-bottom wells. The dimensions of other manufacturers' plates may vary.

方法 1

血清を含むトランスフェクション培地

1. Target siRNA NFS トランスフェクション培地を作るために、92ul の Target siRNA NFS を 2908ul の血清を含む培地で希釈し、数回転倒混和してください。
2. それぞれのウェルから培地を注意深く取り除き、培養プレートの 4 つのウェルに 600ul Target siRNA NFS トランスフェクション培地を入れてください。
3. 希釈した control siRNA NFS と Cells only control NFS を用いて、ステップ 1 と 2 を繰り返して下さい。
4. 37°C、5% CO₂ 濃度、24 時間でプレートをインキュベートして下さい。もし毒性が懸念されるのであれば、一様なレベルにノックダウンされていると思われる 4 時間後に取り除くことが可能です。
5. トランスフェクション後 24 時間で細胞を回収するか、それ以上細胞を培養したい場合は、新しいトランスフェクション培地と交換して下さい。

方法 2

血清を含まないトランスフェクション培地

1. Target siRNA NFS トランスフェクション培地を作るために、92ul Target siRNA NFS に 1408ul 血清を含まない培地で希釈し、数回転倒混和してください。
2. それぞれのウェルから培地を注意深く取り除き、培養プレートの 4 つのウェルに 300ul Target siRNA NFS トランスフェクション培地を入れてください。
3. 希釈した control siRNA NFS と Cells only control NFS を用いて、ステップ 1 と 2 を繰り返して下さい。
4. 37°C、5% CO₂ 濃度下で、2～4 時間でプレートをインキュベートして下さい。
5. それぞれのウェルに 300ul 2x 血清培地を加えて下さい。もし毒性が懸念されるのであれば、ここでトランスフェクション培地を取り除き、600ul 完全細胞培地と取り替えることが可能です。
6. さらに 37°C、5% CO₂ でインキュベートして下さい。そのとき、ステップ 4 のインキュベート時間と合わせて 24 時間インキュベートするようにして下さい。

7. トランスフェクション後 24 時間で、細胞を回収するか新しいトランスフェクション培地と交換して下さい。

N-TER Nanoparticle Formation Solution 量の算出

N-TER nanoparticle transfection アッセイを始める前にお客様がご使用になる培養プレートのサイズ、siRNA の濃度、反復数などいくつかの要因が必要です。それらの要因はお客様にご用意いただく NFS の容量に関係があります。Table 5 は siRNA の終濃度と培養プレートのサイズによって、1 つのウェルに必要な NFS の容量を示しています。推奨しておりますトランスフェクション培地の容量は Table 4 をご参照下さい。

お望みの siRNA の濃度で 1 つのウェルに必要な NFS の容量を決めるために Table 5 をご参照下さい。

お客様のアッセイに必要な NFS の容量を算出するためには下記の式 1 をご参照下さい。この式をお使いになれば、お客様がトランスフェクションするウェルの数に応じて NFS の容量を算出することが可能になります (Table 5)。すべての反復に十分な量を算出するために、1.2 をかけてください。

Table 5 の NFS の容量が小数第二位まで記載してあることに留意して下さい。これはスケールの誤差を少なくする目的があります。NFS の全量を計算した後に端数を四捨五入してください。

式 1: $NFS_{total} = 1 \text{ ウェルあたりの NFS の容量} \times \text{ウェル数} \times 1.2$

Table 5: Volume of Nanoparticle Formation Solution (NFS) to add per well for a range of siRNA concentrations*

Final [siRNA] (nM)	Volume of NFS per well (uL)				
	96-well plate	48-well plate	24-well plate	12-well plate	6-well plate
50	7.69	23.08	46.15	92.31	230.77
40	6.15	18.46	36.92	73.85	184.62
30	4.62	13.85	27.69	55.38	138.46
20	3.08	9.23	18.46	36.92	92.31
10	1.54	4.62	9.23	18.46	46.15
5	0.77	2.31	4.62	9.23	23.08
1	0.15	0.46	0.92	1.85	4.61

*The concentration of the siRNA in the Nanoparticle Formation Solution prior to dilution in culture medium is 650 nM.

Lipid ベースのトランスフェクション試薬と違って、N-TER Peptide と Target siRNA の比は N-TERTM Nanoparticle siRNA Transfection System では一定です。トランスフェクションの量が増えれば、NFS を準備するときの試薬の量も増えます。nanoparticle 形成で使用する試薬の量を見積もるために、Table 6 中のそれぞれの数から式 1 で算出した NFS_{total} の容量を求めてください。それらの値は Table 1 と 2 に書かれている値に代入してください。

Table 6: Scaling Factors for Target siRNA, Control siRNA and N-TER Peptide dilutions

Reagent	siRNA (uL)	N-TER Peptide(uL)
5uM siRNA	$0.13 \times (NFS_{total})$	—
N-TER Peptide	—	$0.08 \times (NFS_{total})$
siRNA Dilution Buffer	$0.37 \times (NFS_{total})$	
Water		$0.42 \times (NFS_{total})$
Final Volume	$0.50 \times (NFS_{total})$	$0.50 \times (NFS_{total})$

N-TER is a trademark of Sigma-Aldrich Biotechnology LP Corning and Costar are registered trademarks of Corning, Inc.

PS, HH, PHC 08/07-2

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.

Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.

Please see reverse side of the invoice or packing slip.