

## トランスフェクション

プラスミドDNAを哺乳動物や昆虫細胞などに導入するトランスフェクションは、エレクトロポレーション法、リン酸化カルシウム沈殿法、脂質によるリポソーム系のトランスフェクション試薬、または脂質とその他の成分を配合した非リポソーム系のトランスフェクション試薬など的方法があります。トランスフェクション試薬は特殊な装置が不要かつ導入効率が高いことから培養細胞への日常的なトランスフェクションによく利用されています。

ロシュ社のトランスフェクション試薬 X-tremeGENE™ HP および 9 は脂質と独自の成分を配合した非リポソーム系のトランスフェクション試薬で、細胞毒性を低減させるとともに高いトランスフェクション効率を実現しています。

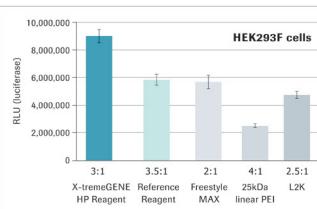
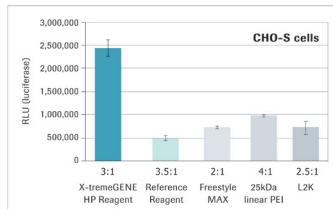
## プラスミドDNAのトランスフェクション試薬

ロシュ社 X-tremeGENE HP (エクストリームジーン エイチピー) は、哺乳動物の細胞や昆虫細胞などの広範囲な真核細胞だけでなく、トランスフェクションが困難と言われている細胞にも効率よくトランスフェクションが可能です。導入効率の良さからタンパク質収量の向上も期待できます。

ロシュ社 X-tremeGENE 9 (エクストリームジーン ナイン) は、非常に低毒性のトランスフェクション試薬です。通常よく使用される細胞で高効率かつ、副次的影響を与えることなくトランスフェクションが可能なため、トランスフェクション後の様々なアプリケーションに利用することができます。



	一般的な細胞	困難な細胞	プライマリー細胞	血清を含む培地での使用	ヒト及び動物由来成分	低毒性
X-tremeGENE HP	◎	◎	◎	可能	含まない	○
X-tremeGENE 9	◎	○	△	可能	含む	◎



CHO-S と HEK293F 細胞に対して 2ml/well の容量で図中に示した「試薬 : DNA」比により、各社の説明書に従いトランスフェクションを実施。ルシフェラーゼの発現は、標準的なルシフェラーゼアッセイにより、トランスフェクション後 48 時間の時点で測定。数値は、Relative light units (RLU) にて表示。エラーバーは 2 重測定でのレンジを示している。

## 人気製品

製品名	特長	製品番号	容量
X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬	様々な細胞に利用可能 低毒性 高効率のためタンパク質収量増加も期待	06 366 244 001 06 366 236 001 06 366 546 001	0.4mL 1.0mL 5×1mL
X-tremeGENE 9 DNA トランスフェクション試薬	非常に低毒性 一般的な細胞に利用可能	06 365 779 001 06 365 787 001 06 365 809 001	0.4mL 1.0mL 5×1mL

## X-TremeGENE™ HP, 9 トランスフェクション試薬の使用例

一般的な細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数/well	コンフルエン特率	希釈に使用するOpti-MEM®	試薬:DNA	添加量/well
CHO-K1	X-tremeGENE HP	1.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	65-75%	200µL	2µL:2µg	10µL
	X-tremeGENE 9	1.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	65-75%	200µL	6:2	5µL
COS-7	X-tremeGENE HP	8.0-9.0x10 <sup>3</sup> (96ウェル)	75-85%	200µL	4:2	10µL
	X-tremeGENE 9	8.0-9.0x10 <sup>3</sup> (96ウェル)	75-85%	200µL	6:2	5µL
HeLa	X-tremeGENE HP	1.2-1.3x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70-90%	200µL	6:2	10µL
	X-tremeGENE 9	1.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70-90%	200µL	6:2	5µL
NIH-3T3	X-tremeGENE 9	1.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70-80%	200µL	6:2	5µL
HEK-293	X-tremeGENE HP	3.0-3.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	50-70%	200µL	6:2	10µL
困難とされる細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数/well	コンフルエン特率	希釈に使用するOpti-MEM®	試薬:DNA	添加量/well
MCF-7	X-tremeGENE 9	1.2-1.8x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70-90%	200µL	6µL:2µg	10µL
HepG2	X-tremeGENE 9	2.0-2.5x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	60-70%	500µL	30:10	5µL
Neuro-2a	X-tremeGENE 9	1.0x10 <sup>5</sup> (24ウェル)	30-40%	100µL	8:2	100µL
PC-3	X-tremeGENE HP	1.0-1.2x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	75-85%	200µL	2:2	10µL
HCT 116	X-tremeGENE HP	3.0-4.0x10 <sup>5</sup> (12ウェル)	80%	100µL	2:1	100µL
A549	X-tremeGENE HP	2.8x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70%	500µL	10:5	15µL
HuH-7	X-tremeGENE HP	1.0x10 <sup>5</sup> (6ウェル)	播種18-24時間後	100µL	1.5:1.5	100µL
U-2 OS	X-tremeGENE HP	2.5-3.0x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	70-90%	200µL	4:2	10µL
プライマリー細胞・幹細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数/well	コンフルエン特率	希釈に使用するOpti-MEM®	試薬:DNA	添加量/well
Primary MEF	X-tremeGENE HP	0.5-1.0x10 <sup>5</sup> (12ウェル)	60%	100µL	4µL:1µg	100µL
Human Primary Fibroblasts from Pre-Skin	X-tremeGENE HP	1.0x10 <sup>5</sup> (6ウェル)	40-50%	200µL	6:2	200µL
Murine Mesenchymal Stem Cells EK8	X-tremeGENE HP	3.0x10 <sup>4</sup> (96ウェル)	50%	392µL	8:8	10µL
Human Mesenchymal Stem Cells	X-tremeGENE HP	8.0x10 <sup>4</sup> (6ウェル)	50%	200µL	6:2	200µL
パッケージング細胞・昆虫細胞	トランスフェクション試薬	初期播種細胞数/well	コンフルエン特率	希釈に使用するOpti-MEM®	試薬:DNA	添加量/well
HEK-293T Cells for Lentiviral Production	X-tremeGENE HP	5.0x10 <sup>5</sup> (6ウェル)	60-80%	180µL	6µL:2µg	200µL
SF9 Insect Cells	X-tremeGENE HP	0.5x10 <sup>5</sup> (12ウェル)	播種後すぐ	100µL	8:1	100µL

ロシュ社データ引用。  
コンフルエン特率はトランスフェクション時点の値。  
特に記載がないものは細胞は播種から18 ~ 24時間後にトランスフェクションを行っています

## ロシュ社のバイオケミカル試薬 お取扱いしています

ロシュ社のゲノミクス、プロテオミクス、細胞アブリケーション用の研究用試薬・キットが  
シグマアルドリッヂ社からご利用いただけます。

取扱い製品はこちら  
[Sigma.com/roche-jp](http://Sigma.com/roche-jp)

## X-tremeGENE™ HPトランスフェクション試薬 プロトコール例

細胞 HEK-293

トランスフェクション試薬 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent

フォーマット 96 ウエルプレート

### A. 細胞の事前準備

1. トランスフェクションの18-24時間前に細胞を96ウェルプレートに播種します。

細胞数  $3.0 - 3.5 \times 10^4$  cells/well

培地 100µL/well (血清を含む完全培地)

2. 18-24時間培養し、50-70%コンフルエントになった状態でトランスフェクションを行います。

### B. トランスフェクション試薬調製 (トランスフェクション直前)

1. X-tremeGENE HP、Opti-MEM®などの無血清培地、およびプラスミドDNA溶液を室温に戻します。

2. 200µLのOpti-MEMなどの無血清培地を滅菌したチューブに入れます。

3. 2 µgのプラスミドDNAをチューブに添加します (1µg/µL DNA溶液を2µL添加)。

4. 穏やかにピベッティングしてよく混ぜます。

5. 6µLのX-tremeGENE HPを添加します (X-tremeGENE HP : DNA = 3 : 1)。

6. 穏やかにピベッティングしてよく混ぜます。

7. 室温で15-30分インキュベートします。

### C. トランスフェクション

1. Bで準備したX-tremeGENE HPとプラスミドDNAの混合液10µLをAで準備した細胞の各ウェルに滴下します。

2. プレートを穏やかに前後・左右に振り動かします。

3. 24-72時間インキュベートします。新たな培地に交換する必要はありません。

## X-tremeGENE 9トランスフェクション試薬 プロトコール例

細胞 CHO-K1

トランスフェクション試薬 X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent

フォーマット 96 ウエルプレート

### A. 細胞の事前準備

1. トランスフェクションの18-24時間前に細胞を96ウェルプレートに播種します。

細胞数  $1.5 \times 10^4$  cells/well

培地 100µL/well (血清を含む完全培地)

2. 24時間培養し、65-75%コンフルエントになった状態でトランスフェクションを行います。

### B. トランスフェクション試薬調製 (トランスフェクション直前)

1. X-tremeGENE 9、Opti-MEMなどの無血清培地、およびプラスミドDNA溶液を室温に戻します。

2. 200µLのOpti-MEMなどの無血清培地を滅菌したチューブに入れます。

3. 6µLのX-tremeGENE 9をチューブに入れます。

4. 穏やかにピベッティングしてよく混ぜます。

5. 2µgのプラスミドDNAを添加します (X-tremeGENE 9 : DNA = 3 : 1)。

6. 穏やかにピベッティングしてよく混ぜます。

7. 室温で30分インキュベートします。

### C. トランスフェクション

1. Bで準備したX-tremeGENE 9とプラスミドDNAの混合液5µLをAで準備した細胞の各ウェルに滴下します。

2. プレートを穏やかに前後・左右に振り動かします。

3. 24-72時間インキュベートします。新たな培地に交換する必要はありません。

細胞の種類によって最適な条件は異なります。播種する細胞数、トランスフェクション試薬とDNAの比率、添加する量などのパラメーターを変えて条件を検討することが重要です。

[Sigma.com/transfection-jp](http://Sigma.com/transfection-jp)

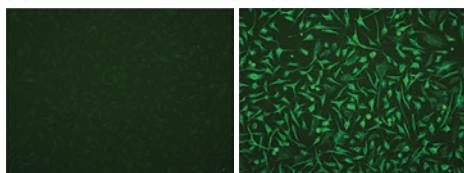
## siRNAのトランスフェクション試薬

製品名	特長	製品番号	容量
MISSION® siRNA トランスフェクション試薬	低濃度 (1nM) の siRNA でトランスフェクション可能 (実際の使用は 10-100nM 推奨)。使用する siRNA 量が少ないのでオフターゲットの低減が期待されます。	S1452-100UL	0.1mL
		S1452-1ML	1mL
N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System	ペプチドベースのトランスフェクション試薬。脂質系とは異なる導入法のため、siRNA が細胞質内で局在しにくいことが期待されます。siRNA は 5-100nM を推奨。	N2913-120UL	0.12mL
		N2913-400UL	0.4mL
		N2913-1ML	1mL
X-tremeGENE™ siRNA トランスフェクション試薬 (Roche 社)	非リポソーム系のトランスフェクション試薬。低毒性。動物由来成分フリー。	04 476 093 001	1 ml
		04 476 115 001	5 x 1 ml

## MISSION siRNAトランスフェクション試薬の特長

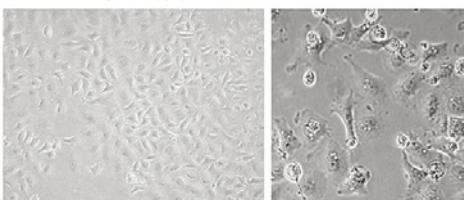
- ・様々な細胞に適応
- ・低い細胞毒性
- ・低濃度の siRNA で有効 = オフターゲット効果を抑制

## 高いサイレンシング効率



Vimentin に対する siRNA (5 nM) を 3T3 細胞へ導入 (左)。右はコントロール。導入 48 時間後に抗 vimentin 抗体を用いて検出。

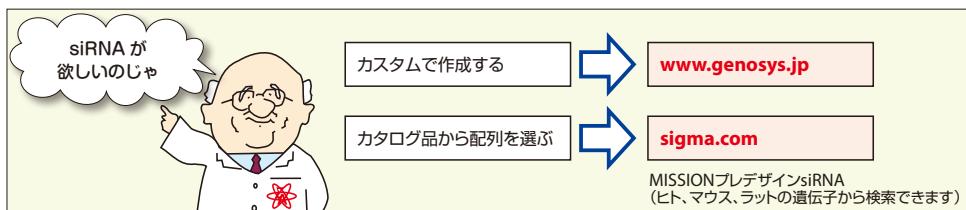
## 優れた細胞生存性



GL3 Luciferase 安定発現 A549 細胞へ Luciferase に対する siRNA (1 nM) を導入。48 時間後に細胞形態を観察。左は MISSION トランスフェクション試薬。右は他社製品。

## 実施例

付着細胞 (1nM siRNA)	ターゲット遺伝子	サイレンシング効率
3LL	GAPDH	≥90%
A549	Luciferase	≥90%
Ca Ski	GAPDH/Lamin A/C	≥90%
HEK-293	GAPDH	≥90%
HeLa	GAPDH/Lamin A/C	≥90%
HepG2	GAPDH	60-70%
MCF7	GAPDH/Lamin A/C	≥90%
MDA-MB-231	GAPDH	≥90%
NIH 3T3	Vimentin	≥90%
RAW 264.7	Eg5	≥90%
SiHa	GAPDH/Lamin A/C	≥90%
SK-OV-3	GAPDH	≥90%
初代細胞 (1nM siRNA)		
Murine embryonic fibroblasts	GAPDH	≥90%
Primary human fibroblasts	GAPDH/Lamin A/C	≥90%
Primary human hepatocytes	GAPDH	≥90%
Primary human keratinocytes	GAPDH	≥90%
浮遊細胞 (5nM siRNA)		
K562	GAPDH	≥80%
THP-1	GAPDH	≥80%



## siRNAトランスフェクションプロトコール MISSION® siRNAトランスフェクション試薬

## 付着細胞へのトランスフェクション(フォワードトランスフェクション法)

トランスフェクションの前日に細胞を30～50%コンフルエントにする必要があります。

24ウェルプレートの場合、一般的に15,000～35,000個の細胞をトランスフェクションの24時間前にまきます。

その他の場合の目安は表1をご覧下さい。

使用するsiRNAの最適濃度を決めるために、最終濃度として1～30nMの範囲でテストすることが推奨されます。

24ウェルプレートの場合、siRNAが10nM以下ではトランスフェクション試薬は1～3μL、siRNAが10nMより高濃度ではトランスフェクション試薬は2～4μLが推奨されます。その他の場合の目安は表1をご覧下さい。

以下は24ウェルプレートで最終濃度10nMのsiRNAを用いるときのプロトコールです。1ウェルあたりの量を示しています。

- まず3ビコモルのsiRNA duplexを血清を含まない培地100μLで希釈し、穏やかに混ぜます。
- トランスフェクション試薬(製品番号 S1452) 2μLを手順1のsiRNA溶液に添加し、すぐに混ぜます。
- 混ぜてから10～15分間、室温でインキュベートします。(1時間以内に手順5に進んで下さい)
- インキュベーション中に前培養した細胞から培地を除去し、あらかじめ温めた新しい培地(血清を含む)を500μL入れて下さい。トランスフェクション時に抗生物質が含まれていても構いません。
- 手順3で準備したトランスフェクション試薬とsiRNA混合液100μLを4の細胞に添加し、穏やかに振り動かすようにして混ぜます。ここで最終液量は600μLになります。
- トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから24～96時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。
- より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表1.付着細胞のトランスフェクション条件

プレートのウェル数	前培養時の播種細胞数	前培養の培地量	siRNA duplex(ビコモル)	トランスフェクション試薬(siRNA1～10nMの場合)	トランスフェクション試薬(siRNA >10nMの場合)	トランスフェクションの量	トランスフェクション時の培地量
384	1,250-3,750	0.1mL	0.5	0.25-0.6μL	0.35-0.75μL	25μL	63μL
96	2,500-7,500	0.2mL	1	0.5-1.2μL	0.7-1.5μL	50μL	125μL
24	15,000-35,000	1mL	3	1-3μL	2-4μL	100μL	500μL
12	30,000-70,000	2mL	7	2-6μL	4-8μL	200μL	1mL
6	100,000-200,000	4mL	12	6-10μL	8-16μL	200μL	2mL

## 付着細胞へのトランスフェクション(リバーストランスフェクション法)

リバーストランスフェクション法ではトランスフェクションと細胞播種は同じ日に行います。siRNAとトランスフェクション試薬の混合液を準備し、細胞を入れる前の各ウェルに分注します。細胞は希望する濃度に希釈して、siRNAとトランスフェクション試薬混合液が入っているウェルに添加します。それぞれの細胞数とプレートサイズは表2をご覧下さい。

以下は96ウェルプレートでsiRNAの最終濃度10nMでトランスフェクションする場合のプロトコールです。

- トランスフェクション試薬(製品番号 S1452) 1μLを各ウェルに入れます。  
オートディスペンサーを用いる場合、トランスフェクション試薬と水を1:5で希釈し、各ウェルに5μL入れます。希釈したトランスフェクション試薬は24時間以内に使用して下さい。
- 次に150ビコモルのsiRNA duplexを血清を含まない培地5mLで希釈し、穏やかにピッピングして混合し、マスターミックスを準備します。
- 手順2のマスターミックス50μLを手順1の各ウェルに添加します。
- ボルテックスして10秒間混ぜ、10～15分間インキュベートします。(1時間以内に手順5に進んで下さい)
- 細胞を7,500個含んでいる完全培地100μLを手順4の各ウェルに添加し、プレートを穏やかに振り動かすように混ぜます。ここで1ウェルあたり155μLでsiRNAの最終濃度は10nMになります。
- トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから24～96時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表2.トランスフェクション時に播種する細胞数(リバーストランスフェクション法)

プレートのウェル数	細胞数	培地量
384	1,500-2,500	50μL
96	5,000-10,000	125μL
48	10,000-20,000	250μL
24	30,000-50,000	500μL