

# TransMessenger™ Transfection Reagent プロトコールとトラブルシューティング

## 真核細胞へのRNAおよびsiRNAトランスフェクション用

目次	ページ
RNAトランスフェクションの至適化	2
トランスフェクション時の細胞密度	2
RNAの量	2
Enhancer Rの量	3
TransMessenger Transfection Reagent とRNA-Enhancer R混合液の比率	3
TransMessenger-RNAコンプレックスのインキュベーション時間	3
附着細胞へのRNAトランスフェクション用プロトコール	5
RNAi ( RNA interference )、siRNA、Transmessenger Transfection Reagent	8
siRNAトランスフェクションの至適化	9
TransMessenger Transfection Reagentを用いた siRNA二本鎖のトランスフェクションのためのガイドライン	10
トラブルシューティングガイド	12

英語版 October 2002 に  
対応します。



# RNA トランスフェクションの至適化

各々の細胞-RNAの組み合わせで最適のトランスフェクション効率を得るためにいくつかのパラメータを至適化することをお勧めします。

- TransMessenger Transfection Reagent、RNAおよびTransMessenger・RNAコンプレックスの量
  - 細胞の数 / 集密度
  - 細胞がTransMessenger・RNAコンプレックスと共にインキュベートされる時間
- 一旦、最大のトランスフェクション効率を得ることができるパラメータが決定した後は、その細胞タイプ / RNAの組み合わせでは全ての実験で、これらのパラメータを保持してください。

## トランスフェクション時の細胞密度

表1にトランスフェクションの前日に、培養ウェルに蒔く細胞数のガイドラインを記載しました。RNAを用いた場合の付着細胞のトランスフェクションに最適な集密度は80～90%です。最適な集密度はトランスフェクトする細胞ごとに新しく決定し、続いて行う実験では同じ条件で行います。細胞を蒔く前に細胞数を数え、細胞を蒔く時期からトランスフェクションまでの時間を一定（最低24時間）に保つことで一定条件保持が可能です。これらの操作により、細胞密度が高すぎず、トランスフェクション当日に最適な生理的条件の細胞が確実に得られます。

表1. 様々な培養フォーマットに蒔かれる細胞数のガイドライン

培養フォーマット	プレートに蒔く付着細胞の数*
96ウェルプレート	2～3 x 10 <sup>4</sup>
48ウェルプレート	4～8 x 10 <sup>4</sup>
24ウェルプレート	8～10 x 10 <sup>4</sup>
12ウェルプレート	2～3 x 10 <sup>5</sup>
6ウェルプレート	4～6 x 10 <sup>5</sup>

\* 細胞はトランスフェクションの少なくとも24時間前に蒔く。実際の細胞数は細胞の種類とサイズに依存する。トランスフェクション当日に80～90%の集密度になるように細胞を蒔く。使用する培養液の量は重要ではない。細胞培養フォーマットに適した量を使用する。

## RNAの量

RNAの量は効率的なトランスフェクションのために重要なファクターです。RNA量が多いと毒性効果が増加し、逆にRNA量が充分でないと発現レベルが低くなります。従って、トランスフェクトするRNA量は新しいRNAおよび / あるいは新しい細胞タイプごとに至適化してください。6ウェルプレートを用いたトランスフェクションに推奨されるRNA量は2 µgです。6ウェルプレートでの付着細胞のトランスフェクションに至適化するためのピペティング法を4ページの表2に記載しました。その他の培養フォーマットを用いたトランスフェクションは7ページの表3をご参照ください。

## Enhancer Rの量

4ページの表2に示されたRNA (µg) と Enhancer R (µl) の比率、1:2は変更しないでください。Enhancer RによるRNAの効率的な縮合はRNAの量に依存します。

## TransMessenger Transfection ReagentとRNA-Enhancer R混合液の比率

TransMessenger Transfection ReagentとRNA-Enhancer R混合液の比率によってTransMessenger-RNAコンプレックスの全体の電荷が決まります。マイナスに荷電した細部表面へTransMessenger-RNAコンプレックスが最適に結合するには、このコンプレックスがわずかにプラスに電荷している必要があります。TransMessenger Transfection Reagent (µl) とRNA (µg) の割合は、使用するそれぞれの細胞の種類およびRNAで至適化しなくてはならない重要なファクターです。至適条件で行うためには、スタート時、6ウェルプレートではRNA : TransMessenger Reagentが2 µg : 8 µlの比率で行うことを推奨します。

6ウェルプレートを用いた付着細胞のトランスフェクションを至適化するためのピペッティング一覧表を表2に掲載しました。その他の培養フォーマットの至適化には以下の方法で各々のトランスフェクション混合液を準備します:

- スタート時には、7ページ、表3にあるRNAとTransMessenger Transfection Reagent量を用いる。
- リストの比率と量を約半分にする
- リストの比率と量を倍にする。

## TransMessenger・RNAコンプレックスのインキュベーション時間

細胞にTransMessenger・RNAコンプレックスを添加した3時間後にコンプレックスを除去し、PBSで洗浄後、新しい培養液を添加します。細胞毒性の影響が観測されない場合には、インキュベーション時間は最高4時間まで増加することができます。

表2.6 ウェルプレートでの付着細胞のトランスフェクションの至適化

RNAの 量	RNAとTransMessenger Transfection Reagentの比率		
	1:2	1:4	1:8
<b>1 µg</b>	1 µg RNA	1 µg RNA	1 µg RNA
	2 µl Enhancer R	2 µl Enhancer R	2 µl Enhancer R
	2 µl TransMessenger Reagent	4 µl TransMessenger Reagent	8 µl TransMessenger Reagent
<b>2 µg</b>	2 µg RNA	2 µg RNA	2 µg RNA
	4 µl Enhancer R	4 µl Enhancer R	4 µl Enhancer R
	4 µl TransMessenger Reagent	8 µl TransMessenger Reagent	16 µl TransMessenger Reagent
<b>4 µg</b>	4 µg RNA	4 µg RNA	4 µg RNA
	8 µl Enhancer R	8 µl Enhancer R	8 µl Enhancer R
	8 µl TransMessenger Reagent	16 µl TransMessenger Reagent	32 µl TransMessenger Reagent

# 付着細胞へのRNA トランスフェクション用プロトコール

次のプロトコールは6ウェルプレートでの1ウェル中の付着細胞へのトランスフェクション用です。スタート時、6ウェルプレートでのトランスフェクションには2 µg RNAを用いてください。その他のフォーマットを用いた場合のトランスフェクション至適条件は7ページ、表3に記載しました。プレートに蒔く細胞数は2ページの表1を参照してください。TransMessenger Transfection Reagentを用いた最も高いトランスフェクション効率を得るためには、各細胞-RNAの組み合わせごとに最適なトランスフェクション条件を決定します。2～3ページの至適化のガイドラインを参照してください。

## 実験を始める前の重要事項

- 実験を始める前に英語版 Handbook を熟読することをお薦めします。
- RNAの純度と機能性をチェックしてください（英語版 Handbook 7ページ ” RNA quality ” を参照）。
- トランスフェクションに用いる細胞ではRNAが効率的に翻訳されなければなりません（例えばIRESへの適応性；英語版 Handbook 6ページの ” RNA structure ” 参照）。
- 細胞はトランスフェクション当日に最適な生理条件になるよう調整してください。トランスフェクションの最低24時間前に、細胞を継代してください。トランスフェクションの最適な集密度は80～90%です。

## 操作手順

1. トランスフェクション前日に、6ウェルプレートの1ウェルあたり  $4 \sim 6 \times 10^5$  個の細胞（細胞タイプに依存）を血清と抗生物質を含んだ2 mlの適切な培養液に懸濁させてプレートに蒔く。

注：細胞が最適の状態にあること、トランスフェクションの最低24時間前には新たに植菌がされていることを確認してください。細胞はトランスフェクション当日に80～90%集密度になるようにしてください。

2. 細胞を通常の培養条件でインキュベートする（通常37℃、5% CO<sub>2</sub>）。
3. トランスフェクション当日、4 µlのEnhancer RをBuffer EC-Rで希釈する。2 µg RNA（RNA濃度は最低0.1 µg/µl）を添加して10秒間ボルテックスする。最終容量を100 µlにする。

RNA濃度が0.5 µg/µlの場合には、4 µlのEnhancer Rを92 µl Buffer EC-Rで希釈し、4 µl RNA溶液を添加する。

重要：

- RNA添加前にEnhancer RをBuffer EC-Rとミックスする。
- RNAとEnhancer Rの比率を常に一定に保つ。

注：最高の純度を持つRNAをトランスフェクションに用いた際に最高の結果が得られます。RNeasy Kitを用いてRNAを精製することをお薦めします。

4. 室温（15～25℃）で5分間インキュベート、チューブの蓋に付いた溶液を集めるために数秒間遠心する。

5. 8  $\mu$ lのTransMessenger Transfection ReagentをRNA・Enhancer R混合液に添加する。5回ピペティングでアップ、ダウンしてミックスするか、あるいは10秒間ボルテックスする。
6. トランスフェクション・コンプレックス形成のために室温（15～25℃）で10分間インキュベートする。
7. コンプレックス形成の間、プレートから培養溶液を静かに吸引除去し、細胞を拭く際に用いた培養溶液量の1.5～2倍量の滅菌したPBSで細胞を洗浄する。  
重要：細胞が乾燥しないように気をつけてください。溶液のっていない状態は最小限にしてください。
8. トランスフェクション・コンプレックスを含んだチューブに血清、あるいは抗生物質のっていない細胞培養溶液を900  $\mu$ l添加する。ピペットで2回アップダウンしてミックス後すぐに、細胞上にトランスフェクション・コンプレックスを1滴ずつ添加する。トランスフェクション・コンプレックスが均一に分布するようにプレートをゆっくりまわす。  
重要：RNaseコンタミネーションを避けるために血清あるいは抗生物質のっていない培養液を使ってください。
9. 通常の培養条件で3時間細胞をトランスフェクション・コンプレックスと共にインキュベートする。  
注：細胞毒性が観察されない場合にはインキュベーション時間を4時間まで増やすことができます。
10. 細胞からコンプレックスを除去し、PBSで1回細胞を洗浄、血清と抗生物質を含んだ2 mlの新しい培養液を添加する。
11. 通常の培養条件で細胞をインキュベートして、タンパク質を発現させる。インキュベーション時間はアッセイとRNAによって決定する。  
注：DNAトランスフェクションに比べて、RNAを用いた場合、タンパク質の最適な発現レベルはより早く得られることがあります。Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) レポーターRNAをトランスフェクトした細胞は約24時間のインキュベーションで最高のタンパク質発現レベルに達します。

表3. 様々なフォーマットでの付着細胞のトランスフェクション至適化のためのスタート時の各成分量

培養 フォーマット	RNA ( $\mu\text{g}$ )	Enhancer R ( $\mu\text{l}$ )	Buffer EC-R 中の RNA-Enhancer R の量 ( $\mu\text{l}$ )	TransMessenger Transfection Reagent ( $\mu\text{l}$ )	コンプレックス に添加する 溶液* の量( $\mu\text{l}$ )
Protocol step	3	3	3	5	8
96-well plate	0.25	0.5	15	1.5 <sup>†</sup>	25
48-well plate	0.5	1.0	30	2.5 <sup>†</sup>	50
24-well plate	0.8	1.6	100	4	100
12-well plate	1.6	3.2	100	6	300
6-well plate	2.0	4.0	100	8	900

- \* RNase のコンタミの可能性を避けるために、血清あるいは抗生物質の入っていない溶液を使用することを推奨。
- <sup>†</sup> トランスフェクションを96あるいは48ウェルプレートで行う場合、ステップ3でRNA-Enhancer R混合液に添加する前に、TransMessenger Transfection Reagent を Buffer EC-R で、トータル容量がそれぞれ10  $\mu\text{l}$  あるいは20  $\mu\text{l}$  になるように希釈する。

# RNAi (RNA interference) siRNA および TransMessenger Transfection Reagent

QIAGEN の R&D では遺伝子に特異的な siRNA と TransMessenger Transfection Reagent を用いた RNAi 実験に成功しました (1)。以下現在の文献 (2 ~ 5) および我々の実験データをベースにしたいくつかのガイドラインを記載します。(文献; 英語版 Handbook 22 ページの “Reference” を参照)

## RNAi 実験のコントロール

RNAi 実験では必ずコントロール実験を行わなければなりません。ネガティブコントロールとしてはスクランブルシークエンスを持つ siRNA を使用できます。ヒト遺伝子での RNAi 実験において遺伝子特異的な発現抑制が既に観察されたライブラリー siRNA も QIAGEN siRNA オリゴヌクレオチド合成サービスで購入できます (英語版 Handbook、24 ページ参照)。蛍光標識 siRNA はトランスフェクション効果を簡単にトラッキングできます。

## siRNA デザイン

siRNA のデザインは遺伝子特異的な抑制効果を発現するための重要な因子です。QIAGEN では最適な gene-silencing 効果を実現する siRNA のデザインに関して専門的なアドバイスを行なう siRNA オリゴヌクレオチド合成サービスを提供しています。詳細は [www.qiagen.com/jp/sirna](http://www.qiagen.com/jp/sirna) をご覧ください。

## Gene-silencing 効果の測定

ウェスタンブロット、免疫蛍光法、遺伝子機能解析または FACS® により gene-silencing 効果はタンパク質レベルでモニターできます。発現抑制はリアルタイム RT-PCR により mRNA レベルにおいてもモニターできます。QIAGEN では感度および特異性の高いツーステップ、ワンステップ・リアルタイム RT-PCR 解析用に QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit および QuantiTect Probe RT-PCR Kit を販売しています。非特異的な発現抑制効果の可能性を排除するために、全ての発現データは “ハウスキーピング” 遺伝子の発現レベルと比較するべきです。

## 一般的な推薦事項

次のガイドラインおよび推薦事項は 24 ウェルプレートを用いた RNAi 実験をベースにしています。これらはガイドラインであり、トランスフェクション効率、siRNA の品質、細胞タイプ、継代数やトランスフェクション時の細胞密度等の多くの異なる因子に依存していることに注意してください。使用した siRNA と TransMessenger Reagent の量および比率を変更して期待した結果が得られない場合には、これらのパラメーター変動を考慮すべきです。実験条件の最適化に関するご相談はテクニカルサポートにご連絡ください。

## RNAi 情報をオンラインで

QIAGEN Transfection Tools ウェブサイトでは siRNA トランスフェクション プロトコールと RNAi 用 QIAGEN 試薬に関する最新の情報と文献を掲載しています。Transfection Tools サイトではお客様の RNAi に関するご質問にお答えします。[www.qiagen.com/transfectiontools/](http://www.qiagen.com/transfectiontools/) をご覧ください。



## siRNA トランスフェクションの至適化

最高の siRNA トランスフェクション結果を得るために、次のようなパラメーターの至適化を行うことをお勧めします。

### siRNA および Enhancer R の量比

使用する siRNA 量は効率的なトランスフェクションと gene silencing に重要なファクターです。24 ウェルプレートでの siRNA のトランスフェクションに用いるスタートサンプル量は 0.8  $\mu\text{g}$  をお勧めします。24 ウェルフォーマットでの付着細胞への siRNA のトランスフェクション至適化実験のためのピペット操作スキームを次ページの表に示しています。核酸 ( $\mu\text{g}$ ) と Enhancer R ( $\mu\text{l}$ ) の割合は常に 1 : 2 になるようにします。

### TransMessenger Transfection Reagent と siRNA の割合

TransMessenger Transfection Reagent と siRNA の割合は使用する細胞タイプと siRNA の組み合わせが新しくなるたびに至適化することをお勧めします。至適化を始めるにあたって、まず siRNA : TransMessenger Transfection Reagent ( $\mu\text{g}$  :  $\mu\text{l}$ ) を 24 ウェルプレートを用いた際には 1 : 5 にすることをお勧めします。

24 ウェルフォーマットでの siRNA トランスフェクションの至適化にはトランスフェクション混合液は以下を用いて別々に調製することをお勧めします。

- 10 ページのプロトコールにある siRNA と TransMessenger Reagent 量を始めに用いる。
- プロトコールにある量および割合を半分にする。
- プロトコールにある量および割合を 2 倍にする。

### トランスフェクション時の細胞密度

siRNA で付着細胞へトランスフェクションするための最適な細胞集密度は 50 ~ 80 % です。トランスフェクションされる新しい細胞タイプごとに最適な集密度を確立し、将来の実験でも一定に保つようにしなければなりません。これは細胞を蒔く前に細胞数を数え、さらに細胞を蒔いてからトランスフェクションまでの時間 (最低 24 時間) を一定に保持することにより可能です。これにより、トランスフェクションの実施日に細胞密度が高くなり過ぎず、細胞が最適な生理条件であるという条件が確実に達成されます。

表4. 24ウェルプレートでのsiRNAトランスフェクション至適化実験のためのピペット操作スキーム

siRNA 量	siRNA : TransMessenger Transfection Reagent ( $\mu\text{g}$ : $\mu\text{l}$ )		
	1:2.5	1:5	1:10
<b>0.4 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.4 $\mu\text{g}$ siRNA	0.4 $\mu\text{g}$ siRNA	0.4 $\mu\text{g}$ siRNA
	0.8 $\mu\text{l}$ Enhancer R	0.8 $\mu\text{l}$ Enhancer R	0.8 $\mu\text{l}$ Enhancer R
	1 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	2 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	4 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent
<b>0.8 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.8 $\mu\text{g}$ siRNA	0.8 $\mu\text{g}$ siRNA	0.8 $\mu\text{g}$ siRNA
	1.6 $\mu\text{l}$ Enhancer R	1.6 $\mu\text{l}$ Enhancer R	1.6 $\mu\text{l}$ Enhancer R
	2 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	4 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	8 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent
<b>1.6 <math>\mu\text{g}</math></b>	1.6 $\mu\text{g}$ siRNA	1.6 $\mu\text{g}$ siRNA	1.6 $\mu\text{g}$ siRNA
	3.2 $\mu\text{l}$ Enhancer R	3.2 $\mu\text{l}$ Enhancer R	3.2 $\mu\text{l}$ Enhancer R
	4 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	8 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent	16 $\mu\text{l}$ TransMessenger Reagent

## TransMessenger Transfection Reagentを用いたsiRNA二本鎖のトランスフェクションのためのガイドライン

下の操作法はTransMessenger Transfection Reagentスタンダード操作とElbashir達によるRNAi研究をベースにしています(英語版 Handbook 22ページ “Reference 2” 参照)。本操作はTransMessenger Transfection Reagentを用いて哺乳動物細胞でのsiRNAトランスフェクションの至適化実験のスタートポイントとして記述しています。特殊な細胞タイプやターゲットでは、ここに記述したものと至適化条件は異なることがあります。実験を始める前に2～3ページに記載されているバックグラウンド情報とプロトコルの注を必ずお読みください。

1. トランスフェクション前日に、24ウェルプレートの1ウェルあたり50,000～100,000個の細胞(細胞タイプと解析時点に依存)を血清と抗生物質を含んだ0.5 mlの適切な培養液に懸濁させてプレートに蒔く。

細胞が最適の条件にあること、トランスフェクションの24時間前に細胞を蒔いたことを確認します。細胞はトランスフェクション当日に50～80%集密度になるようにします。

2. 細胞を通常の培養条件でインキュベートする（通常37℃、5% CO<sub>2</sub>）。
3. トランスフェクション当日、1.6 µl Enhancer RをBuffer EC-Rで希釈する。0.8 µg siRNA（siRNA濃度は最低0.1 µg/µl）を添加してボルテックスにより混和する。最終容量を100 µlにする。  
重要：RNAを添加する前に必ずEnhancer RをBuffer EC-Rと混和します。siRNAとEnhancer Rの比率（µg：µl）を常に一定（1：2）に保ちます。
4. 室温（15～25℃）で5分間インキュベート、チューブの蓋に付着した溶液を集めるために数秒間遠心する。
5. 4 µlのTransMessenger Transfection ReagentをsiRNA・Enhancer R混合液に添加する。5回ピペティングでアップ、ダウンして混和するか10秒間ボルテックスする。
6. トランスフェクション・コンプレックス形成のために室温（15～25℃）で10分間インキュベートする。
7. コンプレックス形成の間、プレートから培養液を静かに吸引除去し、細胞を静かに使用した培養溶液量の1.5～2倍の滅菌したPBSで細胞を洗浄する。  
重要：細胞が乾燥しないように気をつけてください。培養液のない状態は最小限にします。
8. siRNA・TransMessenger Reagentコンプレックスを含んだチューブに300 µlの細胞培養液（血清、抗生物質を含まない）を添加する。ピペットで2回アップダウンして混和後すぐに、細胞上にトランスフェクション・コンプレックスを1滴ずつ添加する。トランスフェクション・コンプレックスが均一に分布するようにプレートをゆっくりまわす。  
注：血清あるいは抗生物質の入っていない培養液を用いることによりRNaseの混入を避けることが可能です。培養液中に血清が存在するとトランスフェクションが促進することがあります。二本鎖siRNAは一本鎖RNAに比べてRNaseによる分解に抵抗性があるために、RNaseのコンタミが問題でない場合あるいは使用する血清でRNase活性が検出されない場合には、血清を含んだ培養液を使用できます。
9. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスと共に3時間インキュベートする。  
注：細胞毒性が観察されない場合には、インキュベーション時間を4時間まで増やすことができます。
10. 細胞からコンプレックスを除去し、PBSで細胞を1回洗浄し、血清と抗生物質を含んだ500 µlの新しい培養液を添加する。
11. 通常の培養条件で細胞をインキュベートし、適切なインキュベーション時間経過後、gene silencingをチェックする。必要なら培養液を交換する。  
注：gene silencing解析に最適な時点は、細胞タイプ、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。適切なインキュベーション時間を決定するために経時実験を行なってください。

# トラブルシューティングガイド

## コメントおよび対処方法

トランスフェクション効率が低い	TransMessenger ReagentとRNAの比率が不適	TransMessenger Transfection ReagentとRNAの比率が最適でないと、コンプレックス全体の電荷が負、中性あるいは強い正になり、細胞表面への吸着が非効率的になる。至適化のガイドに従って(2~3ページ) TransMessenger Transfection Reagent とRNA の比率を至適化する。
	TransMessenger-RNAコンプレックス量が不十分	トランスフェクション効率は期待より低いが細胞毒性が低い場合は細胞に添加する Trans Messenger-RNAコンプレックスの量を増やす。4ページの表2のピペッティング一覧表を参照する。
	タンパク質発現のためのインキュベーション時間が不適	発現のレベルが最高に達するトランスフェクション後のインキュベーション時間は細胞系により異なる。ある細胞系-RNAの組み合わせで、この発現が最高に達する時間が不明の場合は経時変化の実験を行う。
	RNAの影響	RNAのサイズやRNA中に含まれる特別な特性(例えば IRES、キャップ、poly-A)のようなファクターが安定性および/あるいは発現速度に影響する。ある種のRNAの特性は全ての細胞系に適応しない。
	細胞密度が不適である	TransMessenger・RNAコンプレックス添加時における細胞密度が最適な状態でないと、細胞は適切な増殖時期ではないことがある。その結果、細胞へのコンプレックスの取込みが非効率的、あるいは目的のRNAプロセッシングが十分に起こらない。付着細胞ではトランスフェクション時での最適な細胞の集密度は通常80~90%(一本鎖RNA)あるいは50~80%(siRNA)である。トランスフェクションの少なくとも24時間前に細胞を蒔く。

細胞系とRNAの組み合わせ	Cap、poly-AあるいはIRES等を持ったRNAは全ての細胞系で遺伝子の発現が行われるわけではない。例えばIRESを持ったRNAはCOS-7とHeLa細胞では翻訳されない。発現が観測されない場合は、細胞系をかえるか、あるいは可能ならRNAを変える。
RNAの品質が悪い	トランスフェクションに用いるRNAは高品質でなければならない。RNA調製中の不純物によりトランスフェクション効率は著しく低下する。RNA分解により発現レベルが低下する。トランスフェクションを行う前にRNAが分解していないかチェックする。RNeasy KitあるいはQIAGEN DNA/RNA Kitを用いて、RNAを精製することを推奨する。
レポーターアッセイが問題	レポーターアッセイが最適に作用していることを確認するために、ポジティブコントロールを一緒に行う。
血清	血清はRNaseを含んでいることがあるので、血清の入っていない培養液でトランスフェクションを行うことを推奨する。
細胞死亡率が高い	TransMessenger・RNAコンプレックスの細胞との接触が長すぎる。 3時間インキュベーション後に高い細胞死亡率が観測された場合は、細胞とコンプレックスのインキュベーション時間を減らす。さらに感受性の高い細胞（たとえば初代細胞）ではTransMessenger-RNAコンプレックスを除去した後、PBSの代わりに血清の入っていない1.5～2容量の培養液で細胞を洗浄する。
TransMessenger・RNAの濃度が高すぎる	接触時間を減らしても細胞死亡率が高い場合には、細胞に加えるTransMessenger-RNAコンプレックスの量を減らす。
細胞へのストレス	温度変化や培養液なしの長い洗浄時間による細胞へのストレスを避ける。RNAトランスフェクションには、細胞が良い条件にあることは非常に重要。よってトランスフェクション時での細胞密度が低すぎないことを確認。附着細胞の最適なトランスフェクション細胞集密度は80～90%（一本鎖RNA）あるいは50～80%（siRNA）。トランスフェクション24時間前には細胞を蒔く。

RNAの品質が低い	トランスフェクションに用いるRNAは高品質でなければならない。RNA調製中の不純物によりトランスフェクション効率は著しく低下する。RNA分解により発現レベルが低下する。トランスフェクションを行う前にRNAが分解していないかチェックする。RNeasy KitあるいはQIAGEN DNA/RNA Kitを用いてRNAを精製することを推奨する。
RNAによる影響	毒性タンパク質をコードするRNAがトランスフェクトされた場合、あるいはRNA量が多すぎる場合には、細胞毒性の影響が顕著となる。逆に低いトランスレーションで不十分なRNAを用いると、トランスフェクション効率は低くなる。それぞれ新しいRNAおよび/あるいは細胞系ごとに、至適化ガイドに従って(2~3ページ)RNAの量を至適化する。
再実験でトランスフェクション効率の再現性がない	細胞を蒔く前に細胞を数えてそれぞれの実験で同じ数の細胞を使用する。実験毎に細胞を蒔く時からコンプレックスを添加するまでのインキュベーション時間を一定に保つ。細胞はトランスフェクションの最低24時間前に蒔く。
マイコプラズマのコンタミの可能性	マイコプラズマのコンタミはトランスフェクション効率に影響する。マイコプラズマに感染した細胞の増殖率の変化により、実験毎のトランスフェクションに再現性がなくなる。
細胞の継代数が多すぎる	細胞の継代数が増えると、増殖率、形態、特性およびトランスフェクション効率が変化する。継代数が多い細胞を繰り返し同じ実験に用いると、後で行った実験ではトランスフェクション効率が低下する可能性がある。継代数の低い細胞(50回以下)を使用することを推奨。

<p>siRNA トランスフェクション後 gene silencing 効果がほとんどあるいは全く観察されない</p>	<p>siRNA のデザインが最適でない</p>	<p>siRNA のデザインは gene silencing 効果に非常に影響する。QIAGEN は最大の gene silencing 効果を実現する siRNA のデザインに関して専門的なアドバイスを行なっています。詳細は <a href="http://www.qiagen.com/jp/sirna">www.qiagen.com/jp/sirna</a> をご覧ください。</p>
<p>トランスフェクション後のインキュベーション時間が短すぎる 実験デザインに問題がある</p>	<p>タンパク質レベルで観察される gene silencing 効果はタンパク質発現レベルや細胞内でのターンオーバーの速さに依存する。最適な解析時間を決定するために経時実験を行なう。</p> <p>ある細胞系では特定の siRNA で RNAi 効果が観察されないことがある。可能な場合には異なる細胞系 / siRNA で実験を繰り返す。ポジティブおよびネガティブコントロール共に実験を行なう。QIAGEN では gene silencing 効果を検証済みのライブラリー siRNA が入手可能です (英語版 Handbook “ordering information” 参照)。</p>	<p>タンパク質レベルで観察される gene silencing 効果はタンパク質発現レベルや細胞内でのターンオーバーの速さに依存する。最適な解析時間を決定するために経時実験を行なう。</p> <p>ある細胞系では特定の siRNA で RNAi 効果が観察されないことがある。可能な場合には異なる細胞系 / siRNA で実験を繰り返す。ポジティブおよびネガティブコントロール共に実験を行なう。QIAGEN では gene silencing 効果を検証済みのライブラリー siRNA が入手可能です (英語版 Handbook “ordering information” 参照)。</p>

**株式会社 キアゲン**

〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300

Fax: 03-5547-0818

E-mail: [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

