

英語版 May 2008 に対応

HiPerFect Transfection Reagent

プロトコールとトラブルシューティング

siRNA と miRNA の真核細胞へのトランスフェクション用



Sample & Assay Technologies

目次

重要事項

siRNA 濃度の計算	4
siRNA トランスフェクションの至適化	4
様々なフォーマットでの siRNA 量と試薬量	6
マルチウェル・プレートでのトランスフェクション — マスターミックスの調製	7
適切な RNAi コントロール実験	7
mRNA あるいはタンパク質レベルで遺伝子サイレンシング効果を モニタリング	9

付着細胞用プロトコール

付着細胞への迅速な siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	10
付着細胞への siRNA/miRNA リバーストランスフェクション (96 ウェルプレート)	12
付着細胞への siRNA/miRNA リバーストランスフェクション (384 ウェルプレート)	14
付着細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (従来のトランスフェクション用プロトコール)	16

浮遊細胞およびマクロファージ用プロトコール

Jurkat や K562 などの浮遊細胞株への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	18
J774.A1 や RAW 264.7 などのマクロファージ細胞株への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	20
分化したマクロファージ細胞株 (THP-1 を含む) への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	22

初代培養細胞用プロトコール

HUVEC 細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	24
線維芽細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	26
ケラチノサイトへの siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	28
上皮細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	30
平滑筋細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)	32
初代神経細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (96 ウェルプレート)	34
初代肝細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (96 ウェルプレート)	36

特別プロトコール

付着細胞の大量 siRNA/miRNA トランスフェクション (100 mm デイッシュ)	38
付着細胞への長期間の siRNA/miRNA トランスフェクション	40
トラブルシューティング	42

Appendix A : 浮遊細胞およびマクロファージ細胞での siRNA トランスフェクションの至適化	45
---	----

Appendix B : 初代細胞での推奨事項	48
--------------------------------	----

重要事項

siRNA 濃度の計算

21 ntの二本鎖 siRNA の概算値：

- 20 μM siRNA は約 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に相当
- 21 nt siRNA の分子量は約 13 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{nmol}$ に相当

様々なフォーマット用の siRNA 量を計算する場合、付着細胞は表 3 (6 ページ) および表 4 (7 ページ)、浮遊細胞は表 8 (47 ページ)、マクロファージは表 9 (47 ページ)、分化したマクロファージは表 10 (47 ページ)、初代細胞は表 13 (50 ページ) をご覧ください。

siRNA トランスフェクションの至適化

付着細胞への siRNA トランスフェクションで最良の結果を得るためには、以下のパラメーターを至適化することをお奨めします。浮遊細胞、マクロファージ細胞への siRNA トランスフェクション至適化に関する詳細は、45 ページの Appendix A をご覧ください。初代細胞への siRNA トランスフェクション至適化に関する詳細は、48 ページの Appendix B をご覧ください。最適なトランスフェクションのための miRNA mimic/miRNA inhibitor 量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。

siRNA 量

使用する siRNA 量は、トランスフェクションと遺伝子サイレンシングを効率的に行なうために非常に重要です。24 ウェルプレートで siRNA トランスフェクションを始める際の濃度は、5 nM をお奨めします。24 ウェルプレートでの付着細胞への siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップは表 1 (5 ページ) に従ってください。

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率は、新しい siRNA と細胞株を使用するごとに至適化します。24 ウェルプレートを用いた際の至適化のスタートポイントとしては、浮遊細胞では 5 nM の siRNA と 3 μl の HiPerFect Transfection Reagent を推奨します。24 ウェルプレートでの siRNA トランスフェクションを至適化するために、表 1 (5 ページ) に従ってトランスフェクション混合溶液を個々に調製します。

表 1 は siRNA と試薬のスタート量を定める際にガイドラインとしてご利用ください。これらの量は HiPerFect Transfection Reagent を用いて検証されている細胞株でのトランスフェクション至適化のスタートポイントとしてもご利用ください。必要に応じて、HiPerFect Transfection Reagent 量をさらに減らすことも可能です。これにより性能が損なわれることはありません。

表 1. 24 ウェルプレートでの付着細胞への siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップ*

siRNA 量 (濃度)	75 ng (10 nM)	75 ng (10 nM)	75 ng (10 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl
siRNA 量 (濃度)	37.5 ng (5 nM)	37.5 ng (5 nM)	37.5 ng (5 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl
siRNA 量 (濃度)	7.5 ng (1 nM)	7.5 ng (1 nM)	7.5 ng (1 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl

* 24 ウェルプレートのウェルあたりの量。

括弧内の siRNA 濃度は各ウェルでの siRNA 最終濃度。

siRNA トランスフェクション至適化に関する詳細は、浮遊細胞やマクロファージ細胞では 45 ページの Appendix A を、初代細胞では 48 ページの Appendix B をご覧ください。

トランスフェクション時の細胞密度

トランスフェクションの最適な細胞密度は、新しい細胞株ごとに決定し、その後の実験ではこれをいつも使用します。これは、細胞播種前に細胞数を測定し、従来のトランスフェクション用プロトコール (16 ページ) では細胞播種とトランスフェクションの間隔を一定に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時の細胞過密を避け、最適な生理条件の細胞が得られます。様々なフォーマットで推奨する細胞数は、表 2 に示されています。

表2. 様々なフォーマットに播種する付着細胞の数

培養フォーマット	迅速なトランスフェクション用プロトコール リバーストランスフェクション・プロトコール (トランスフェクション当日に播種)	従来のトランスフェクション・プロトコール (トランスフェクション前日に播種)
384ウェルプレート	4,000~10,000	2,000~5,000
96ウェルプレート	1~5 x 10 ⁴	0.5~3 x 10 ⁴
48ウェルプレート	2~8 x 10 ⁴	1~4 x 10 ⁴
24ウェルプレート	0.4~1.6 x 10 ⁵	2~8 x 10 ⁴
12ウェルプレート	0.8~3 x 10 ⁵	0.4~1.6 x 10 ⁵
6ウェルプレート	1.5~6 x 10 ⁵	0.8~3 x 10 ⁵
60 mm ディッシュ	0.3~1.2 x 10 ⁶	1.5~6 x 10 ⁵
100 mm ディッシュ	2~4 x 10 ⁶	1~2 x 10 ⁶

播種する細胞数は、浮遊細胞やマクロファージ細胞では45ページのAppendix Aを、初代細胞では48ページのAppendix Bを参照にしてください。

様々なフォーマットでのsiRNA量と試薬量

迅速なトランスフェクション用プロトコール (10ページ)、従来のトランスフェクション用プロトコール (16ページ) で使用する様々なプレート/ディッシュ・フォーマットでの付着細胞へのsiRNAトランスフェクション至適化のためのスタートポイントが表3および4に記載されています。96ウェル、384ウェル、100 mmディッシュでのスタートポイントも各プロトコール (12~15ページ、38ページ) に記載されています。

表3. 様々なフォーマットにおける付着細胞へのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイント

培養フォーマット	細胞に加える培養液量 (μl)	siRNA量 (ng) *	希釈siRNAの最終容量 (μl)	HiPerFect Reagent量 (μl)	最終siRNA濃度 (nM)
48ウェルプレート	250	19	50	1.5	5
24ウェルプレート	500	37.5	100	3	5
12ウェルプレート	1,100	75	100	6	5
6ウェルプレート	2,300	150	100	12	5
60 mm ディッシュ	4,000	256	100	20	5

* 各siRNA量に相当するsiRNAストック溶液の量を表4に記載しています。

トランスフェクション至適化に関するスタートポイントは、浮遊細胞やマクロファージ細胞では45ページのAppendix Aを、初代細胞では48ページのAppendix Bをご覧ください。

表 4. 様々な siRNA 量に対する siRNA ストック溶液の量

培養 フォーマット	siRNA 量 (ng)	相当する 0.2 μ M siRNA ストック 溶液の量 (μ l)*	相当する 2 μ M siRNA ストック 溶液の量 (μ l)*	相当する 20 μ M siRNA ストック 溶液の量 (μ l)*
48 ウェルプレート	19	7.5	–	–
24 ウェルプレート	37.5	–	1.5	–
12 ウェルプレート	75	–	3	–
6 ウェルプレート	150	–	6.0	–
60 mm デイツシュ	256	–	–	1.0

* 0.2 μ M siRNA ストック溶液を調製するためには、10 μ l の 20 μ M ストック溶液を希釈して最終容量を 1,000 μ l にします。2 μ M siRNA ストック溶液を調製するためには、10 μ l の 20 μ M ストック溶液を希釈して最終容量を 100 μ l にします。

マルチウェル・プレートでのトランスフェクションマスターミックスの調製

マルチウェル・プレートでトランスフェクションを行なう場合は、トランスフェクション・コンプレックスのマスターミックスを調製するか、トランスフェクション試薬と培養液（プロトコルにより異なる）のマスターミックスを調製してプレートウェルに分注します。

- マスターミックスを調製する前に、各成分量とトータル量を計算します。
- ピペティングの誤差を考慮して、必要な量の 10% 増しでマスターミックスを調製します（例；48 ウェルプレートでは、53 ウェル分のマスターミックスを調製）。
- プロトコルの解説に従ってマスターミックスの成分を添加・混和します。
- マスターミックスを分注するために連続分注ピペットを使用します。

適切な RNAi コントロール実験

正確なデータ解析を行なうためには、適切なコントロール実験が重要です。様々なコントロール siRNA をお届けしています。www.qiagen.com/AllStars をご覧ください。適切な miRNA コントロール実験に関する詳細は www.qiagen.com/miRNA をご覧ください。次ページのようなコントロール実験をお奨めします。

ポジティブコントロール siRNA

これは標的遺伝子を強くノックダウンする事が実証済みの siRNA です。例えば、Mm/Hs_MAPK1 Control siRNA (Cat. no. 1022564) はヒト・マウスの MAPK1 を効果的にノックダウンし、Rn_Mapk1 Control siRNA (Cat. no. 1027277) はラット MAPK1 を効果的にノックダウンします。AllStars Hs Cell Death Control siRNA (Cat. no. 1027298) は細胞生存に必要な不可欠な遺伝子をノックダウンし、光学顕微鏡で観察可能な高度の細胞死をもたらします。これらの siRNA はポジティブコントロールとして使用できます。

ポジティブコントロールは、トランスフェクション実験のセットアップおよびノックダウン解析が最適に行なわれたかどうかを確認するために用います。ある遺伝子をノックダウンし表現型への効果が得られる siRNA もまた、表現型を調べるためのアッセイが適切に行なわれているかどうかのポジティブコントロールとして使用できます。ポジティブコントロール siRNA は全ての RNAi 実験でトランスフェクトします。

ネガティブコントロール siRNA

ネガティブコントロール siRNA は、どのような既知の哺乳動物遺伝子とも相同性を持たない nonsilencing siRNA で、例えば QIAGEN の AllStars Negative Control siRNA (5 nmol, Cat. no. 1027280) などがあります。AllStars Negative Control siRNA は、徹底的にテストされ、検証されたネガティブコントロール siRNA です。遺伝子発現と表現型への非特異的な影響は最小限に抑えられ、RISC に取り込まれることが確認されました。詳細およびデータの一覧は www.qiagen.com/AllStars をご覧ください。

ネガティブコントロール siRNA のトランスフェクションは、表現型や遺伝子発現の変化が非特異的であるかどうかを決定するのに使用します。ネガティブコントロール siRNA は全ての RNAi 実験でトランスフェクトします。

トランスフェクションコントロール siRNA

このコントロールは、トランスフェクション効率を測定するために使用します。トランスフェクション効率は様々な方法で測定することができます。例えば、蛍光標識 siRNA のトランスフェクション後に蛍光顕微鏡を用いて、あるいは AllStars Hs Cell Death Control siRNA のような細胞生存に必須の遺伝子を標的にした siRNA をトランスフェクションした後に細胞死のレベルを観察することにより可能です。siRNA トランスフェクション効率はできるだけ高くします。このコントロールは、例えば新しい細胞株での RNAi 実験を確立する際の至適化に用います。

Mock トランスフェクションコントロール

Mock トランスフェクションコントロールとは siRNA なしに細胞にトランスフェクション操作だけを行なうことです (例えばトランスフェクション試薬だけで細胞を処理する)。このコントロールは、新しいトランスフェクション試薬あるいは工程が非特異的な効果を引き起こしたかどうかを示します。

未処理の細胞コントロール

正常な遺伝子発現量を測定するために、未処理細胞での遺伝子発現解析が行なわれなければなりません。未処理細胞の結果は他のすべてのサンプル結果と比較できません。未処理細胞はすべてのRNAi実験で解析されなくてはなりません。

表現型を確認するための追加の siRNA

遺伝子のノックダウンが引き起こす表現型への影響は、mRNAの異なる配列を標的にした siRNA を少なくとも 2 個以上用いて確認しなければなりません。

mRNA あるいはタンパク質レベルで遺伝子サイレンシング効果をモニタリング

mRNA あるいはタンパク質レベルで遺伝子サイレンシング効果はモニタリング可能です。タンパク質解析は、ウエスタンブロット、免疫蛍光法、FACS®解析により行なえます。タンパク質解析およびウエスタンブロット用プロトコールに関する詳細は www.qiagen.com/literature/BenchGuide をご覧ください。AllPrep® RNA/Protein Kit (Cat. no. 80404) は、同一サンプルからの RNA とタンパク質の同時精製を実現し、ノックダウン後のダウンストリーム解析が能率的に行なえます。タンパク質解析は、遺伝子が抑制されていることを示す最も包括的な方法です。しかしながら、タンパク質解析が常に可能なわけではありません（例；目的タンパク質のウエスタンブロットに必要な抗体が入手不可能）。

mRNA レベルでの遺伝子サイレンシングのモニタリングは、リアルタイム RT-PCR、マイクロアレイ解析、ノーザンブロットなどで通常行ないます。RNA 研究およびノーザンブロット用プロトコールに関しては www.qiagen.com/literature/BenchGuide をご覧ください。リアルタイム定量 RT-PCR は遺伝子サイレンシングのモニタリングを mRNA レベルでルーチンに行なえる容易な方法です。QuantiTect® Primer Assays はバイオインフォマティクスで検証済みのプライマーセットで、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ショウジョウバエ、ニワトリ、シロイヌナズナの遺伝子用が入手可能です。QuantiTect Primer Assays を QuantiTect あるいは QuantiFast™ SYBR® Green Kit と組み合わせ、SYBR Green 検出を用いた 1 ステップ / 2 ステップ・リアルタイム RT-PCR を高い感度と特異性で実現します。発現データを GAPDH などのハウスキーピング遺伝子のレベルと比較することにより、サンプルによりばらつく RNA 量を標準化できます。

プロトコール：付着細胞への迅速な siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagent を用いた siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで至適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。また、表 3 (6 ページ) に記載されている量の siRNA と試薬を用いて、他のフォーマット (48、12、6 ウェルプレート、および 60 mm ディッシュ) でのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイントとしてもご利用できます。

本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。いくつかの感受性の高い細胞では、トランスフェクションの前日に細胞を蒔く“従来のトランスフェクション用プロトコール” (16 ページ参照) を使用しなければいけないことがあります。

注： 24 ウェルプレートを用いる際には、本プロトコールに記載されている順番、すなわちウェルに細胞播種を行なった後に siRNA/miRNA 試薬コンプレックスを添加し、トランスフェクションを行なうことを推奨します。これにより、細胞とコンプレックスの混和を確実に行なうことが可能です。リバーストランスフェクション用プロトコールを用いて、コンプレックスをウェルに添加後に細胞を添加してトランスフェクションを行なうことも可能です。リバーストランスフェクション用プロトコールではプレートに添加する細胞とコンプレックスの順番を変えるだけです (ステップ 1~5)。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適な量は、細胞株および解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクションの少し前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 0.5 ml に $0.4 \sim 1.6 \times 10^5$ 個の細胞（1 ウェルあたり）を 24 ウェルプレートに蒔く。

あるいは本プロトコールのステップ3の後に細胞を蒔くこともできます。

2. トランスフェクションまでの短時間、通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ ）。
3. 血清を含まない培養液 100 μl で siRNA 37.5 ng を希釈する（ステップ5で細胞にコンプレックスを添加後の最終 siRNA 濃度は 5 nM になる）。希釈した siRNA に HiPerFect Transfection Reagent 3 μl を添加して、ボルテックスにより混和する。

重要: 最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA と HiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は4ページをご覧ください。

4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（ $15 \sim 25^\circ\text{C}$ ）で 5 ~ 10 分間インキュベートする。
5. 1 滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後 6 ~ 72 時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。蛍光標識 siRNA を使用する際には、トランスフェクション 4 ~ 24 時間後に顕微鏡解析を行ないます。

プロトコール：付着細胞への siRNA/miRNA リバーストランスフェクション (96 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagent を用いた siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、96 ウェルプレートで至適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。他のフォーマットでのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイントは、表3 (6 ページ) にリストされています。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行ないます。

注：96 ウェルプレートでのトランスフェクションは迅速なトランスフェクション用プロトコールを用いて行なうこともできます。このリバーストランスフェクション用プロトコールではまずプレートウェル中でコンプレックス形成を行ない、それからコンプレックスの上に細胞を播種します。迅速なトランスフェクション用プロトコールでは、細胞をプレートウェルに播種してからコンプレックスを添加します (英語版 Handbook 11 ページ、Figure 3 参照)。迅速なトランスフェクション用プロトコールではプレートに添加する細胞とコンプレックスの順番を変えるだけです (ステップ1~4)。96 ウェルプレートを用いる場合は、迅速でピペッティングの回数が少なく、器具の少ないリバーストランスフェクション用プロトコールを推奨します (迅速なトランスフェクション用プロトコールではコンプレックス形成用と細胞にコンプレックスを添加するための2枚のプレートが必要になりますが、リバーストランスフェクション用プロトコールは1枚のみです)。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適な量は、細胞株および解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. 96ウェルプレートの1ウェルあたりに **siRNA Suspension Buffer/RNase フリー水** 1~3 μl に溶解した **siRNA 12.5 ng** を入れる（この条件によりステップ4で細胞をコンプレックスに添加後の最終 **siRNA 濃度が 5 nM** になる）。

注：本ステップの後、siRNA を -20°C で長期間保存できます。siRNA は溶液として保存できますが、室温（ $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）でプレート中で siRNA を乾燥させてから保存することも可能です。

注：25 μl の siRNA Suspension Buffer/RNase フリー水で溶解した siRNA を入れることも可能です。この場合、培養液 150 μl （細胞数 $1\sim 5 \times 10^4$ ）をステップ4で添加します。

2. 血清を含まない培養液 **24.25 μl** に **HiPerFect Transfection Reagent 0.75 μl** を添加する。希釈した **HiPerFect Transfection Reagent** をステップ1で準備した **siRNA** に添加する。

注：正確な量を確実にピペティングするために、HiPerFect Reagent の希釈は複数のウェル用にまとめて量を多くして調製します（7ページ、「マルチウェル・プレートでのトランスフェクション — マスターミックスの調製」参照）。調製した後、1ウェルあたり希釈液 25 μl を添加します。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA と HiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は4ページをご覧ください。

3. 室温（ $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で **5~10 分間** インキュベートして、トランスフェクション・コンプレックスを形成する。
4. 適切な培養液 **175 μl** （血清と抗生物質を含む）に懸濁した $1\sim 5 \times 10^4$ 個の細胞を、**siRNA HiPerFect Reagent** のトランスフェクション・コンプレックスの上に蒔く。
5. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後 **6~72 時間**）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：付着細胞への siRNA/miRNA リバーストランスフェクション (384 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagent を用いた siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、384 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。他のフォーマットでのトランスフェクション最適化実験のためのスタートポイントは、表3 (6 ページ) にリストされています。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。播種する細胞の最適用量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. **384 ウェルプレートの 1 ウェルあたりに siRNA Suspension Buffer/RNase フリー水 1 ~ 3 μ l に溶解した siRNA 3.125 ng を入れる (この条件によりステップ 4 で細胞をコンプレックスに添加後の最終 siRNA 濃度が 5 nM になる)。**
注：本ステップの後、siRNA を -20°C で長期間保存できます。siRNA は溶液として保存できますが、室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) でプレート中で siRNA を乾燥させてから保存することも可能です。
2. **血清を含まない培養液 9.5 μ l に HiPerFect Transfection Reagent 0.5 μ l を添加する。希釈した HiPerFect Transfection Reagent をステップ 1 で準備した siRNA に添加する。**
注：正確な量を確実にピペティングするために、HiPerFect Reagent の希釈は複数のウェル用にまとめて量を多くして調製します (7 ページ、“マルチウェル・プレートでのトランスフェクション — マスターミックスの調製” 参照)。
重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA と HiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は 4 ページをご覧ください。
3. **室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で 5 ~ 10 分間インキュベートして、トランスフェクション・コンプレックスを形成する。**

4. 適切な培養液 40 μ l (血清と抗生物質を含む) に懸濁し、4,000 ~ 10,000 個の細胞をウェル中の siRNA-HiPerFect Reagent のトランスフェクション・コンプレックスの上に蒔く。
5. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする (例; 実験系によるがトランスフェクション後 6 ~ 72 時間)。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：付着細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション（従来のトランスフェクション用プロトコール）

細胞をトランスフェクション前日に播いた方が良い場合には、HiPerFect Transfection Reagentを用いた24ウェルプレートの1ウェル中における付着細胞への siRNA/miRNA トランスフェクションの最適化実験のためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。他のフォーマットでのトランスフェクション最適化実験のためのスタートポイントは、表3（6ページ）にリストされています。HepG2 のようないくつかの細胞株では、“迅速なトランスフェクション用プロトコール”（10ページ）を用いることにより、本プロトコールに比べて非常に低濃度の siRNA でより高い遺伝子サイレンシング効果が得られることがあります。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。本プロトコールを用いたトランスフェクションに最適な細胞集密度は50～80%です。播種する細胞の最適用量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGENの siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション前日に、血清と抗生物質を含んだ0.5 mlの適切な増殖培養液に懸濁した $2 \sim 8 \times 10^4$ 個の細胞（1ウェルあたり）を24ウェルプレートに蒔く。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常37℃、5%CO₂）。
3. トランスフェクション当日に血清を含まない培養液100 μ l で siRNA 37.5 ng を希釈する（ステップ5で細胞にコンプレックスを添加後の最終 siRNA 濃度は5 nMになる）。希釈した siRNA に HiPerFect Transfection Reagent 3 μ l を添加して、ボルテックスにより混和する。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA と HiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は4ページをご覧ください。

4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。
5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。蛍光標識 siRNA を使用する際には、トランスフェクション4～24時間後に顕微鏡解析を行ないます。

プロトコール：JurkatやK562などの浮遊細胞株へのsiRNA/miRNAトランスフェクション（24ウェルプレート）

HiPerFect Transfection Reagentを用いた浮遊細胞へのsiRNA/miRNAトランスフェクション実験を、24ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。浮遊細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、45ページのAppendix Aに記載されています。

浮遊細胞の培養

トランスフェクションの少なくとも24時間前にスピナーフラスコで培養した浮遊細胞で最高のトランスフェクション効率を得られます。これにより最適なガス交換が行なわれ、細胞は対数増殖期にあります。トランスフェクション前日に細胞溶液の一部をトリパンブルー（死細胞を染色）と混和し、数測定用チャンバーを用いて生細胞（未染色）を測定します。適量の細胞を遠心操作して、細胞ペレットを新鮮な培養液で再懸濁し、スピナーフラスコに移します。スピナーフラスコ中の細胞密度は1 mlあたり 3×10^5 個になります（プロトコールのステップ1）。

スピナーフラスコは様々なサイズで入手可能です（例；50 ml、250 ml、1,000 ml）。フラスコ中のシャフト（攪拌翼）により細胞培養液が攪拌されます。フラスコ中の培養液量は、フラスコの約3分の1の量にします（例；250 mlのスピナーフラスコでは約85 mlの細胞懸濁液）。フラスコのキャップは空気の入出りを可能にするために緩めておきます。細胞懸濁液は1分あたり約60回以下で攪拌します。

翌日に細胞数を測定します。ほとんどの細胞株で、細胞数は2倍になります。適切な量の細胞を回収してトランスフェクションに使用します（プロトコールのステップ3）。細胞の増殖が予想より遅い場合には、細胞が健常ではない可能性があります。この場合は、新しい細胞と培養液で一晩培養を再度行ないます。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。表7（46ページ）で推奨する細胞数をご覧ください。播種する細胞の最適量は、細胞株および解析時間に依存します。
- QIAGENのsiRNAは凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNAに添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量はsiRNAに関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitorの最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されているsiRNA溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitorを希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション前日に、血清と抗生物質を含んだ適切な増殖培養液で細胞密度が 3×10^5 個/ml になるようにスピナーフラスコで希釈する。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ ）。
3. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ $100 \mu\text{l}$ の増殖培養液に懸濁した 2×10^5 個の細胞（1ウェルあたり）を 24 ウェルプレートに蒔く。
4. 血清を含まない培養液 $100 \mu\text{l}$ で siRNA 750 ng を希釈する（ステップ8で培養液を添加後の最終 siRNA 濃度は 100 nM になる）。希釈した siRNA に $6 \mu\text{l}$ の HiPerFect Transfection Reagent を添加し、ボルテックスで混和する。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。

5. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（ $15 \sim 25^\circ\text{C}$ ）で $5 \sim 10$ 分間インキュベートする。
6. 1 滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。

重要：96 ウェルプレートでトランスフェクションを行なう際には、細胞とトランスフェクション・コンプレックスを $4 \sim 6$ 回ピペッティングして混和することにより、トランスフェクション効率が著しく増加します。

7. 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 6 時間インキュベートする。
8. 血清と抗生物質の入った培養液 $400 \mu\text{l}$ を細胞に添加し、遺伝子サイレンシング解析までインキュベートする（例；実験系によるがトランスフェクション後 $6 \sim 72$ 時間）。必要に応じて新しい培養液を添加する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール： J774.A1 や RAW 264.7 などのマクロファージ細胞株への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagent を用いたマクロファージ細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。マクロファージ細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、45 ページの Appendix A に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。表7 (46 ページ) で推奨する細胞数をご覧ください。播種する細胞の最適量は、細胞株および解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載してある推奨の siRNA 溶液量になるよう miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクションの少し前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 100 μ l に懸濁した $0.4 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
あるいは本プロトコールのステップ3の後に細胞を蒔くこともできます。
2. トランスフェクションまでの短時間、通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、5% CO_2)。
3. 血清を含まない培養液 100 μ l で siRNA 375 ng を希釈する (ステップ7で培養液を添加後の最終 siRNA 濃度は 50 nM になる)。希釈した siRNA に 6 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を添加し、ボルテックスで混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 ($15 \sim 25^\circ\text{C}$) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。
5. 1 滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。

6. 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6時間インキュベートする。
7. 血清と抗生物質の入った培養液400 μ lを細胞に添加し、遺伝子サイレンシング解析までインキュベートする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：分化したマクロファージ細胞株 (THP-1を含む) への siRNA/miRNA トランスフェクション (24ウェルプレート)

分化したマクロファージ細胞への HiPerFect Transfection Reagent を用いた siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。分化したマクロファージ細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、45 ページの Appendix A に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。表7 (46 ページ) で推奨する細胞数をご覧ください。播種する細胞の最適量は、細胞の種類および解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション 24 時間前に、血清と抗生物質を含んだ 0.5 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 2×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
2. 適切な量の分化誘導剤を細胞に添加して、通常の培養条件で細胞を一晩インキュベートする (通常 37°C、5% CO₂)。
注：THP-1 細胞の分化には、100 ng/ml PMA を使用します。
3. トランスフェクションの少し前に培養液を細胞から除去し、血清および抗生物質を含んだ新鮮な培養液 100 μ l を添加する。
4. トランスフェクションまでの短時間、通常の培養条件で細胞をインキュベートする。
5. 血清を含まない培養液 100 μ l で siRNA 375 ng を希釈する (ステップ9で培養液を添加後の最終 siRNA 濃度は 50 nM になる)。希釈した siRNA に 6 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を添加し、ボルテックスで混和する。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。

6. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。
7. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
8. 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6時間インキュベートする。
9. 血清と抗生物質の入った培養液400 µlを細胞に添加し、遺伝子サイレンシング解析までインキュベートする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：HUVEC細胞へのsiRNA/miRNAトランスフェクション（24ウェルプレート）

HiPerFect Transfection Reagentを用いたHUVECおよびその他の内皮細胞へのsiRNA/miRNAトランスフェクション実験を、24ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。初代細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、48ページのAppendix Bに記載されています。

継代数の低い細胞（継代数が4を超えない）を使用してください。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。播種する細胞の最適な量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGENのsiRNAは凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNAに添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量はsiRNAに関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitorの最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されているsiRNA溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitorを希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ0.1 mlの適切な増殖培養液に懸濁した 6×10^4 個の細胞（1ウェルあたり）を24ウェルプレートに蒔く。
あるいは本プロトコールのステップ3の後に細胞を蒔くこともできます。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常37°C、5% CO₂）。
3. 75 ngのsiRNAを培養液（血清を含まない）100 μ lで希釈する（最終siRNA濃度は10 nMになる）。ボルテックス操作により混和する。希釈したsiRNAに3 μ lのHiPerFect Transfection Reagentを添加する。ピペッティングで5回アップダウン、あるいは10秒間ボルテックスして混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要なHiPerFect Transfection Reagentの量は、細胞株により変動します。特殊な細胞タイプやターゲットでは最適条件はここで記述している条件と異なることがあります。
最適な結果のために必要なsiRNA量もまた変動します。多くの細胞株ではsiRNA量を7.5 ng（1 nM）まで減らすことが可能です。細胞株によってはsiRNA量を225 ng（25 nM）まで増やす必要があります。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（15～25°C）で5～10分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする。
7. 3時間後に400 μ lの培養液を添加する。
8. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：線維芽細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いた線維芽細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。初代細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ 0.5 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 6×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
あるいは本プロトコールのステップ 3 の後に細胞を蒔くこともできます。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、5% CO_2)。
3. 75 ng の siRNA を培養液 (血清を含まない) 100 μl で希釈する (最終 siRNA 濃度は 10 nM になる)。ボルテックス操作により混和する。希釈した siRNA に 3 μl の HiPerFect Transfection Reagent を添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent の量は、細胞株により変動します。特殊な細胞タイプやターゲットでは最適条件はここで記述している条件と異なることがあります。
最適な結果のために必要な siRNA 量もまた変動します。多くの細胞株では siRNA 量を 7.5 ng (1 nM) まで減らすことが可能です。細胞株によっては siRNA 量を 225 ng (25 nM) まで増やす必要があります。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 (15 ~ 25°C) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：ケラチノサイトへの siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いたケラチノサイトへの siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで至適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。初代細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ 0.5 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 6×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。

あるいは本プロトコールのステップ 3 の後に細胞を蒔くこともできます。

2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、5% CO_2)。
3. 37.5 ng の siRNA を培養液 (血清を含まない) 100 μl で希釈する (最終 siRNA 濃度は 5 nM になる)。ボルテックス操作により混和する。希釈した siRNA に 3 μl の HiPerFect Transfection Reagent を添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent の量は、細胞株により変動します。特殊な細胞タイプやターゲットでは最適条件はここで記述している条件と異なることがあります。

最適な結果のために必要な siRNA 量もまた変動します。多くの細胞株では siRNA 量を 7.5 ng (1 nM) まで減らすことが可能です。細胞株によっては siRNA 量を 225 ng (25 nM) まで増やす必要があります。

4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：上皮細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いた上皮細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。初代細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ 0.1 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 6×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
あるいは本プロトコールのステップ 3 の後に細胞を蒔くこともできます。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C、5% CO₂)。
3. 75 ng の siRNA を培養液 (血清を含まない) 100 μ l で希釈する (最終 siRNA 濃度は 10 nM になる)。ボルテックス操作により混和する。希釈した siRNA に 3 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent の量は、細胞株により変動します。特殊な細胞タイプやターゲットでは最適条件はここで記述している条件と異なることがあります。
最適な結果のために必要な siRNA 量もまた変動します。多くの細胞株では siRNA 量を 7.5 ng (1 nM) まで減らすことが可能です。細胞株によっては siRNA 量を 225 ng (25 nM) まで増やす必要があります。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 (15 ~ 25°C) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする。
7. 3時間後に400 μ lの培養液を添加する。
8. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：平滑筋細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いた平滑筋細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、24 ウェルプレートで最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。初代細胞へのトランスフェクションの詳細および様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタートポイントは、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 細胞はトランスフェクションを行なう時点で最適な生理条件になるように培養します。播種する細胞の最適量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション当日に、血清と抗生物質を含んだ 0.1 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 6×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
あるいは本プロトコールのステップ 3 の後に細胞を蒔くこともできます。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C、5% CO₂)。
3. 75 ng の siRNA を培養液 (血清を含まない) 100 μ l で希釈する (最終 siRNA 濃度は 10 nM になる)。ボルテックス操作により混和する。希釈した siRNA に 3 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent の量は、細胞株により変動します。特殊な細胞タイプやターゲットでは最適条件はここで記述している条件と異なることがあります。
最適な結果のために必要な siRNA 量もまた変動します。多くの細胞株では siRNA 量を 7.5 ng (1 nM) まで減らすことが可能です。細胞株によっては siRNA 量を 225 ng (25 nM) まで増やす必要があります。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 (15 ~ 25°C) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする。
7. 3時間後に400 μ lの培養液を添加する。
8. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：初代神経細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (96 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いた初代神経細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、96 ウェルプレートで行なうためのガイドラインです。本ガイドラインは類似した細胞株を用いた実験をベースにしていますが、使用されるラオ条件下では有効でない場合があります。本プロトコールでは、最高のトランスフェクション効率を達成するために至適化がさらに必要になります。初代細胞へのトランスフェクションの至適化に関する詳細は、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。播種する細胞の最適用量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション 5 日前に、0.2 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 1.6×10^6 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 96 ウェルプレートに蒔く。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)。
3. トランスフェクション当日、125 ng の siRNA を 25 μl の培養液 (血清を含まない) で希釈する (siRNA の最終濃度を 50 nM にする)。ボルテックス操作により混和する。
4. 血清を含まない培養液 24.5 μl に HiPerFect Transfection Reagent 0.5 μl を添加する。希釈した HiPerFect Transfection Reagent をステップ 3 で準備した siRNA に添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。

重要: 最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は変動します。細胞株と遺伝子ターゲットにより、HiPerFect Reagent の量を 1 μl あるいは 1.5 μl まで増やす必要があるかもしれません。
5. トランスフェクション・コンプレックスの形成のために室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

6. 細胞から培養液を除去し、1ウェル当たり0.15 mlの新鮮な培養液を添加する。
7. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
8. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：初代肝細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション (96 ウェルプレート)

HiPerFect Transfection Reagentを用いた初代肝細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を、96 ウェルプレートで行なうためのガイドラインです。本ガイドラインは類似した細胞株を用いた実験をベースにしていますが、使用されるラボ条件下では有効でない場合があります。本プロトコールでは、最高のトランスフェクション効率を達成するために至適化がさらに必要です。初代細胞へのトランスフェクションの至適化に関する詳細は、48 ページの Appendix B に記載されています。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。播種する細胞の最適な量は細胞株と解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクション前日に、0.15 ml の適切な増殖培養液に懸濁した 8×10^4 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 96 ウェルプレートに蒔く。
注：播種する細胞の密度および播種する時期は、実験のニーズおよび細胞の種類に依存します。播種する細胞数を調節します。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、5% CO_2)。
3. トランスフェクション当日、125 ng の siRNA を 25 μl の培養液 (血清を含まない) で希釈する (siRNA の最終濃度を 50 nM にする)。ボルテックス操作により混和する。
4. 血清を含まない培養液 24.25 μl に HiPerFect Transfection Reagent 0.75 μl を添加する。希釈した HiPerFect Transfection Reagent をステップ 3 で準備した siRNA に添加する。ピペティングで 5 回アップダウン、あるいは 10 秒間ボルテックスして混和する。

重要: 最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は変動します。細胞株と遺伝子ターゲットにより、HiPerFect Reagent の量を 1 μl あるいは 1.5 μl まで増やす必要があるかもしれません。

5. 室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートして、トランスフェクション・コンプレックスを形成する。
6. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
7. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：付着細胞の大量 siRNA/miRNA トランスフェクション (100 mm ディッシュ)

100 mm ディッシュでの HiPerFect Transfection Reagent を用いた付着細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション実験を最適化するためのスタートポイントとして本プロトコールをご利用ください。他のフォーマットでのトランスフェクション最適化実験のためのスタートポイントは、表3 (6ページ) にリストされています。本プロトコールでは、細胞播種とトランスフェクションを同じ日に行いません。いくつかの感受性の高い細胞では、トランスフェクションの前日に細胞を蒔く必要があります (16ページ、“従来のトランスフェクション用プロトコール” を参照)。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。播種する細胞の最適量は、細胞株および解析時間に依存します。
- QIAGEN の siRNA は凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNA に添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitor を希釈してください。

操作手順

1. トランスフェクションの少し前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 7 ml で $2 \sim 4 \times 10^6$ 個の細胞を懸濁して、100 mm ディッシュに播種する。
あるいは本プロトコールのステップ3の後に細胞を蒔くこともできます。
2. トランスフェクションまでの短時間、通常の培養条件で細胞をインキュベートする (通常 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)。
3. 血清を含まない培養液 1 ml で siRNA 600 ng を希釈する (ステップ5で細胞にコンプレックスを添加後の最終 siRNA 濃度は 5 nM になる)。希釈した siRNA に HiPerFect Transfection Reagent 40 μl を添加して、ボルテックスにより混和する。
重要: 最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA と HiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は4ページをご覧ください。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。混合液が均一に行き渡るように培養ディッシュを静かに揺り動かす。
6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする（例；実験系によるがトランスフェクション後6～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：遺伝子サイレンシング解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、ターゲット遺伝子、解析法に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。

プロトコール：付着細胞への長期間の siRNA/miRNA トランスフェクション

本プロトコールは24ウェルプレートの1ウェル中における付着細胞への siRNA/miRNA トランスフェクション用です。HiPerFect Transfection Reagent を用いた哺乳動物細胞への siRNA/miRNA トランスフェクションの最適化実験のためのスタートポイントとして利用してください。

実験を始める前の重要事項

- 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に培養します。本プロトコールを用いたトランスフェクションに最適な細胞集密度は50～80%です。播種する細胞の最適用量は細胞株と解析時間に依存します。
- 本プロトコールでは滅菌済みPBSおよびTrypsin/EDTA（別途準備）が必要です。PBSおよびTrypsin/EDTAの調製に関する詳細は、英語版 Handbook 13ページの“Reagents to Be Supplied by User”を参照してください。
- QIAGENの siRNAは凍結乾燥品としてお届けします。トランスフェクションを行なう前に再懸濁してください。siRNAに添付の説明書に従って再懸濁してください。
- プロトコール中の核酸量は siRNA に関する量を掲載しています。miRNA mimic/miRNA inhibitorの最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。できればプロトコールに記載されている siRNA 溶液量になるように、miRNA mimic/miRNA inhibitorを希釈してください。

操作手順

1. 最初のトランスフェクション前日に、血清と抗生物質を含んだ0.5 mlの適切な増殖培養液に懸濁した $2 \sim 8 \times 10^4$ 個の細胞（1ウェルあたり）を24ウェルプレートに蒔く。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常37℃、5%CO₂）。
3. トランスフェクション当日に血清を含まない培養液100 μ lで siRNA 37.5 ngを希釈する（ステップ5で細胞にコンプレックスを添加後の最終 siRNA 濃度は5 nMになる）。希釈した siRNA にHiPerFect Transfection Reagent 3 μ lを添加して、ボルテックスにより混和する。
重要：最適なパフォーマンスに必要なHiPerFect Transfection Reagent および siRNA の量は、細胞株とターゲット遺伝子により変動します。siRNA とHiPerFect Transfection Reagent の割合の最適化に関する詳細は4ページをご覧ください。
4. トランスフェクション・コンプレックス形成のために、サンプルを室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。

5. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。

6. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする。6～24時間後に培養液を交換する。

注：細胞の種類によっては、培養液の交換は不要です。代わりに、最適な細胞密度になるまでコンプレックスを細胞上に残しておくことも可能です。

7. 細胞が密集したら次のように細胞を分けて、トランスフェクトを行なう（ステップ7～13）。培養液を除去し、PBS 500 µlで細胞を洗浄。

8. Trypsin/EDTA 100 µlを添加して、細胞が剥離するまでインキュベートする。過剰なトリプシン処理を行なわないよう、細胞の状態に注意する。

9. 900 µlの細胞培養液（血清と抗生物質を含む）を細胞に添加してトリプシン処理を停止する。

10. ステップ3、4に記載されているようにトランスフェクション・コンプレックスを調製する。

11. トリプシン処理した細胞を血清と抗生物質を含んだ培養液を加えて最終容量500 µlにして、これらを新しい24ウェルプレートの1ウェルに移す。

注：希釈係数は細胞の種類に特異的です。通常は細胞種の倍增期間を反映します。

12. 1滴ずつコンプレックスを細胞に添加する。プレートを手静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。

13. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする。6～24時間後に培養液を交換する。

注：細胞の種類によっては、培養液の交換は不要です。代わりに、細胞が集密するまで、あるいは分析するまでコンプレックスを細胞上に残しておくことも可能です。

14. 細胞が密集したら細胞を分けてステップ7からの操作を繰り返す。

15. 適切な時間に遺伝子サイレンシング効果をモニタリングする。

注：遺伝子サイレンシング解析を行なう前の継代回数およびトランスフェクションの回数は標的遺伝子と研究している表現型に依存します。経時実験を行なうことにより、適切なインキュベーション時間を決定することができます。この方法を用いることにより、細胞毒性のない効率的なノックダウンが最初のトランスフェクションから最高2週間後まで観察されました。

トラブルシューティングガイド

コメント

トランスフェクション効率が低い

- a) HiPerFect Transfection ReagentとsiRNAの比率が最適ではない
- 一定量のHiPerFect Transfection Reagentで、広範囲なsiRNA濃度にわたって良好な結果が得られるが、コンプレックスの表面の電荷がマイナス、ゼロあるいは強いプラスになることがあり、その結果細胞表面への吸着が非効率的になる。コンプレックスが弱いプラスの電荷を帯びている場合、吸着が最適になる。HiPerFect Transfection ReagentとsiRNAの比率を表1 (5ページ)、表5 (45ページ)、表6 (46ページ)、表11 (49ページ) を用いて最適化するか、あるいはHiPerFect Transfection Reagentの段階希釈を行なう。
- b) 細胞密度が不適
- HiPerFect Transfection Reagent-siRNA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場合、細胞はトランスフェクションに最適な増殖期ではない。この状態は細胞へのコンプレックスの取り込みが不十分であったり、siRNAへのプロセッシングが効率的に行なわれないことに繋がる。付着細胞では“従来のトランスフェクション用プロトコール”を用いたsiRNAトランスフェクションでの最適な細胞集密度は50～80%である (16ページ)。
- c) siRNAの品質が低い
- 不純物がトランスフェクション効率を低下させるため、siRNAは高品質でなければならない。効果的な遺伝子サイレンシングにはHP GenomeWide siRNAあるいは検証済みのHP Validated siRNAを推奨する (www.qiagen.com/GeneGlobe)。

細胞死亡率が非常に高い

- a) HiPerFect Transfection Reagent-siRNA コンプレックス濃度が高すぎる
細胞に加えるHiPerFect Transfection Reagent-siRNA コンプレックスの量を減らす。
- b) 細胞へのストレスが高い
温度変化や、洗浄中に培養液が無い状態が長くなるような細胞へのストレスを避ける。siRNAのトランスフェクションには、細胞が良い条件にあることが特に重要である。従ってトランスフェクション時の細胞密度が低すぎないことを確認する。付着細胞では“従来のトランスフェクション用プロトコール”を用いたsiRNAトランスフェクションでの最適な細胞集密度は50～80%である（16ページ）。
- c) siRNAの品質が低い
不純物がトランスフェクション効率を低下させるため、siRNAは高品質でなければならない。効果的な遺伝子サイレンシングにはHP GenomeWide siRNAあるいは検証済みのHP Validated siRNAを推奨する (www.qiagen.com/GeneGlobe)。
- d) 重要な遺伝子の発現が抑制
目的遺伝子が細胞の生存に不可欠な場合、この遺伝子の発現抑制は細胞死をもたらす。

繰り返し実験でトランスフェクション効率の再現性がない

- a) 同一実験ごとに細胞集密度が異なる
細胞の播種前に細胞数を数えて、それぞれの実験で同じ数の細胞を必ず使用する。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。
- b) 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を及ぼす。マイコプラズマに感染した細胞の増殖の変化により、実験ごとのトランスフェクション効率が変わる。
- c) 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や形態が変化する傾向があり、トランスフェクション効率が低下する。継代数が多い細胞を繰り返し同じ実験に用いる場合、後で行なった実験で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。
- d) siRNA濃度が低すぎる
トランスフェクションで使用するsiRNA濃度を増やす。

コメント

遺伝子サイレンシング効果が弱いあるいは観察されない

- a) siRNAのデザインが最適でない
- siRNA デザインは遺伝子サイレンシング効果に非常に大きな影響を与える。効果的な遺伝子サイレンシングには HP GenomeWide siRNA あるいは検証済みの HP Validated siRNA を推奨する (www.qiagen.com/GeneGlobe)。
- b) 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
- タンパク質レベルで検出される遺伝子サイレンシング効果はタンパク質の発現量と、細胞中の代謝回転速度に依存する。最適な解析時点を決定するために経時実験を行なう。
- c) 実験デザインに問題
- いくつかの細胞株で特定の siRNA を用いた際に RNAi 効果が観察されないことがある。可能なら、異なる細胞株あるいは／および siRNA を用いて実験をやり直す。実験にポジティブおよびネガティブコントロール両方を含める。QIAGEN は様々なコントロール siRNA をお届けしています。ウェブサイトをご覧ください (www.qiagen.com/AllStars)。
- d) siRNA 濃度が低すぎる
- トランスフェクションで使用する siRNA 濃度を増やす。

Appendix A : 浮遊細胞およびマクロファージ細胞での siRNA トランスフェクションの至適化

siRNA トランスフェクションで最良の結果を得るためには、以下のパラメーターを至適化することをお奨めします。miRNA mimic/miRNA inhibitor の最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。

siRNA 量

使用する siRNA 量は、トランスフェクションと遺伝子サイレンシングを効率的に行なうために非常に重要です。24 ウェルプレートでの siRNA トランスフェクションを始める際の濃度は、浮遊細胞では 100 nM、マクロファージおよびマクロファージに分化する細胞株では 50 nM をお奨めします。24 ウェルプレートでの浮遊細胞への siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップは表 5 と表 6 に従ってください。

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率は、新しい siRNA と細胞株を使用するごとに至適化します。24 ウェルプレートを用いた際の至適化のスタートポイントとしては、浮遊細胞では 100 nM の siRNA と 6 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を、マクロファージおよび分化したマクロファージ細胞株では 50 nM の siRNA および 6 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を推奨します。24 ウェルプレートでの siRNA トランスフェクションを至適化するために、表 5 および表 6 に従ってトランスフェクション混合溶液を別個に調製します。

表 5 および表 6 は siRNA と試薬のスタート量を定める際にガイドラインとしてご利用ください。これらの量は HiPerFect Transfection Reagent を用いて検証されている細胞株でのトランスフェクション至適化のスタートポイントとしても良い結果が得られました。必要に応じて、HiPerFect Transfection Reagent 量をさらに減らすことも可能です。これにより性能が損なわれることはありません。

表 5. 浮遊細胞への siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップ (24 ウェルプレート) *

siRNA 量 (最終濃度)	1.5 μ g (200 nM)	1.5 μ g (200 nM)	1.5 μ g (200 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μ l	9 μ l
siRNA 量 (最終濃度)	750 ng (100 nM)	750 ng (100 nM)	750 ng (100 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μl	9 μ l
siRNA 量 (最終濃度)	375 ng (50 nM)	375 ng (50 nM)	375 ng (50 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μ l	9 μ l

* 24 ウェルプレートのウェルあたりの量。

表6. マクロファージおよび分化したマクロファージ細胞株への siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップ (24 ウェルプレート) *

siRNA 量 (最終濃度)	750 ng (100 nM)	750 ng (100 nM)	750 ng (100 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μ l	9 μ l
siRNA 量 (最終濃度)	375 ng (50 nM)	375 ng (50 nM)	375 ng (50 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μl	9 μ l
siRNA 量 (最終濃度)	187.5 ng (25 nM)	187.5 ng (25 nM)	187.5 ng (25 nM)
HiPerFect Reagent 量	3 μ l	6 μ l	9 μ l

* 24ウェルプレートのウェルあたりの量。

トランスフェクション時の細胞密度

トランスフェクションの最適な細胞密度は、新しい細胞株ごとに決定し、その後の実験ではこれをいつも使用します。これは、細胞接種前に細胞数を測定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時の細胞過密を避け、最適な生理条件の細胞が得られます。様々なフォーマットで推奨する細胞数は、表7に示されています。

表7. 様々なフォーマットに浮遊細胞やマクロファージ細胞を接種する際に推奨する細胞数

培養フォーマット	推奨する浮遊細胞の数
96ウェルプレート	3 ~ 6 x 10 ⁴
24ウェルプレート	1 ~ 2 x 10 ⁵
	推奨するマクロファージ細胞の数
96ウェルプレート	1 ~ 6 x 10 ⁴
24ウェルプレート	0.4 ~ 2 x 10 ⁵
	推奨する分化したマクロファージ細胞の数
96ウェルプレート	3 ~ 6 x 10 ³
24ウェルプレート	1 ~ 2 x 10 ⁴

様々なフォーマットでのsiRNA量と試薬量

表8～10に様々なプレートおよびディッシュ・フォーマットでsiRNAトランスフェクション至適化のためのスタートポイントが、浮遊細胞（表8）、マクロファージ（表9）、分化したマクロファージ細胞株（表10）ごとに記載されています。

表8. 様々なフォーマットにおける浮遊細胞へのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイント

培養フォーマット	播種した細胞量 (μl)	siRNA量 (ng)	希釈siRNAの最終容量 (μl)	HiPerFect Reagent量 (μl)	最終siRNA濃度 (nM)	6時間後に添加する培養液の量 (μl)
プロトコールステップ	3	4	4	4	6	8
96ウェルプレート	30	250	30	1	100	140
24ウェルプレート	100	750	100	6	100	400

表9. 様々なフォーマットにおけるマクロファージ細胞へのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイント

培養フォーマット	播種した細胞量 (μl)	siRNA量 (ng)	希釈siRNAの最終容量 (μl)	HiPerFect Reagent量 (μl)	最終siRNA濃度 (nM)	6時間後に添加する培養液の量 (μl)
プロトコールステップ	1	3	3	3	5	7
96ウェルプレート	30	125	30	1	50	140
24ウェルプレート	100	375	100	6	50	400

表10. 様々なフォーマットにおける分化したマクロファージ細胞へのトランスフェクション至適化実験のためのスタートポイント

培養フォーマット	細胞に添加する培養液量 (μl)	siRNA量 (ng)	希釈siRNAの最終容量 (μl)	HiPerFect Reagent量 (μl)	最終siRNA濃度 (nM)	6時間後に添加する培養液の量 (μl)
プロトコールステップ	3	5	5	5	7	9
96ウェルプレート	30	125	30	1	50	140
24ウェルプレート	100	375	100	6	50	400

Appendix B : 初代細胞での推奨事項

初代細胞培養時の推奨事項

初代細胞は取り扱いに注意し、不必要な継代は回避してください。初代細胞での推奨事項を以下に示します。

■ 培養液

温めておいた培養液を常に使用し、室温での長期インキュベーションは避けてください。初代細胞に特化された培養液は不安定な成分を含んでいます。このため、調製後4週間経過した培養液は使用しないでください。

■ 継代数

トランスフェクション前の初代細胞の継代は必要最低限にします。線維芽細胞、上皮細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞に関しては、継代数が10~12を超えないようにします。内皮細胞特にHUVECに関しては、継代数が4~5を超えないようにします。

■ 細胞継代

初代細胞の継代の際、トリプシンとの長時間インキュベーションは避けてください（例外として、上皮細胞は37℃でのトリプシン処理に長時間のインキュベーション時間が必要です）。HUVECおよびその他の内皮細胞に関しては、トリプシンの代わりにアクターゼのような緩和な酵素を使用することをお奨めします。細胞が剥離したらすぐにトリプシンの効力を停止する試薬（かなりの血清が入った培養液など）を添加してトリプシン処理を止めます。低速で5分間の遠心操作により細胞を回収し、適切な培養液に再懸濁します。トリプシン処理は細胞にストレスを与えるので、2日連続のトリプシン処理は避けてください（細胞を播種する前日に細胞を継代しない）。

■ ピペット

線維芽細胞や平滑筋細胞などの大きな細胞を傷める原因になるので、細いピペットは使用しないでください。

■ 細胞集密度

理想的な細胞集密度は、細胞の種類や培養方法により異なります。細胞毒性が観察される場合は、プロトコール中の播種する細胞数を至適化する必要があります。

siRNA トランスフェクションの至適化

初代細胞へのsiRNA トランスフェクションで最良の結果を得るためには、以下のパラメーターを至適化することをお奨めします。miRNA mimic/miRNA inhibitorの最適なトランスフェクションのための量に関しては、メーカーの説明書を参照してください。

siRNA量

使用するsiRNA量は、トランスフェクションと遺伝子サイレンシングを効率的に行なうために非常に重要です。24ウェルプレートでsiRNAトランスフェクションを始める際の濃度が各プロトコールに記載されています。24ウェルプレートでのケラチノサイトへのsiRNAトランスフェクション至適化のためのピペティングは表11を参照してください。

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率

HiPerFect Transfection Reagent と siRNA の比率は、新しいsiRNA と細胞株を使用するごとに至適化してください。各種細胞株用に至適化したスタートポイントがプロトコールに記載されています。siRNA トランスフェクション至適化のために、siRNA と試薬の量を変更して試薬・siRNA 混合液を個々に調製します。例えば、24ウェルプレートでのケラチノサイトへのsiRNA トランスフェクションを至適化するために、表11に従ってトランスフェクション混合溶液を個々に調製します。

表 11. ケラチノサイトへの siRNA トランスフェクション至適化のためのセットアップ (24ウェルプレート) *

siRNA 量 (濃度)	75 ng (10 nM)	75 ng (10 nM)	75 ng (10 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl
siRNA 量 (濃度)	37.5 ng (5 nM)	37.5 ng (5 nM)	37.5 ng (5 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl
siRNA 量 (濃度)	7.5 ng (1 nM)	7.5 ng (1 nM)	7.5 ng (1 nM)
HiPerFect Reagent 量	1.5 µl	3 µl	4.5 µl

* 24ウェルプレートのウェルあたりの量。

トランスフェクション時の細胞密度

トランスフェクションの最適な細胞密度は、新しい細胞株ごとに決定し、その後の実験ではこれをいつも使用します。これは、細胞播種前に細胞数を測定し、トランスフェクション前日に細胞を播種する場合において、播種とトランスフェクションの間隔を一定に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時の細胞過密を避け、最適な生理条件の細胞が得られます。様々なフォーマットで推奨する細胞数は、表12に示されています。

神経細胞および肝細胞では、培養を成功させるのに必要とされる細胞数を使用することを推奨します。これは実験条件により異なり、実験間で変動することがあります。その他の初代細胞に関しては、継代や増殖率の類似した細胞株で指定されている細胞数をスタートポイントにすることを推奨します。

表 12. 様々なフォーマットに播種する推奨の細胞数

培養フォーマット	細胞数
96ウェルプレート	20,000
48ウェルプレート	40,000
24ウェルプレート	60,000
12ウェルプレート	120,000
6ウェルプレート	200,000

HUVEC、線維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞、平滑筋細胞の数です。

様々なフォーマットでの siRNA 量と試薬量

様々なプレート・フォーマットでの培養細胞への siRNA トランスフェクションの最適化のスタートポイント（試薬量と最終 siRNA 濃度）を表 13 に記載しています。24 ページのプロトコルは、HUVEC および内皮細胞にお奨めします。次の細胞に特化したプロトコルも記載されています；線維芽細胞（26 ページ）、ケラチノサイト（28 ページ）、上皮細胞（30 ページ）、平滑筋細胞（32 ページ）、神経細胞（34 ページ）、肝細胞（36 ページ）。その他の細胞に関しては、継代や増殖率の類似した細胞株のプロトコルを使用することをお奨めします。

表 13. 様々なフォーマットにおける初代細胞へのトランスフェクション最適化実験のためのスタートポイント *

培養 フォーマット	HUVEC	線維芽 細胞	ケラチノ サイト	上皮 細胞	平滑筋 細胞	神経 細胞	肝細胞
96 ウェル プレート	0.75 μ l 10 nM	0.75 μ l 10 nM	1.5 μ l 5 nM	0.75 μ l 10 nM	0.75 μ l 10 nM	0.5 μ l 50 nM	0.75 μ l 50 nM
48 ウェル プレート	1.5 μ l 10 nM	1.5 μ l 10 nM	2 μ l 5 nM	1.5 μ l 10 nM	1.5 μ l 10 nM	-	-
24 ウェル プレート	3 μ l 10 nM	3 μ l 10 nM	3 μ l 5 nM	3 μ l 10 nM	3 μ l 10 nM	-	-
12 ウェル プレート	6 μ l 10 nM	6 μ l 10 nM	6 μ l 5 nM	6 μ l 10 nM	6 μ l 10 nM	-	-
6 ウェル プレート	12 μ l 10 nM	12 μ l 10 nM	12 μ l 5 nM	12 μ l 10 nM	12 μ l 10 nM	-	-

* HiPerFect Transfection Reagent の量 (μ l) および siRNA の最終濃度 (nM)。

Trademarks: QIAGEN®, QuantiFast™, QuantiTect®, AllPrep®, GeneGlobe™ (QIAGEN Group); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); FACS® (Becton, Dickinson and Company).

siRNA technology licensed to QIAGEN is covered by various patent applications, owned by the Massachusetts Institute of Technology, the Carnegie Institute of Washington, Alnylam Corporation, and others.

This product is covered by one or more patent applications and/or foreign counterpart patent applications owned by Synvolux. The purchase of this product conveys to the buyer the limited, non-exclusive, non-transferable right (without the right to resell, repackage, or further sublicense) under the patent rights to perform siRNA delivery methods for research purposes solely in conjunction with this product delivered by QIAGEN GmbH, its affiliates or distributors. No other license is granted to the buyer whether expressly, by implication, by estoppel or otherwise. In particular, the purchase of this product does not include nor carry any right or license to use or otherwise exploit this product or components of the product in clinical diagnostics, therapeutics or in clinical studies. This product is sold pursuant to a license from Synvolux, and Synvolux reserves all other rights under these patent rights. For information on purchasing a license to the patent rights for uses other than in conjunction with this product or to use this product for purposes other than research, please contact Synvolux at +31-50-311 8115. The Synvolux reference number is SQ-004.

Purchase of miScript, QuantiFast, and QuantiTect SYBR Green Kits is accompanied by a limited, non-transferable immunity from suit to use it with detection by a dsDNA-binding dye as described in U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States for the purchaser's own internal research. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights, and no right to use this product for any other purpose are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

Purchase of QuantiFast and QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits is accompanied by a limited, non-transferable license under RT and Reverse Transcription-PCR patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd to use it for the purchaser's own internal research. No real-time patent rights of any kind, no right under any other patent claims (such as apparatus or system claims), and no right to use this product for any other purpose is hereby granted expressly, by implication or by estoppel.

QuantiTect Primer Assays and miScript Primer Assays are compatible for use in the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes covered by patents owned by Roche or owned by or licensed to Applied Biosystems Corporation. No license under these patents to practice the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes are conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

Purchase of QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits, and miScript SYBR Green PCR Kits is accompanied by a limited license under U.S. Patent Numbers 5,035,996; 5,945,313, 6,518,026 and 6,287,823 and corresponding foreign patents.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2008 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

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

