

英語版 September 2008 に対応

miRNA Mimic および miRNA Inhibitor 実験のためのガイドライン

miRNA 研究用



Sample & Assay Technologies

目次

プロトコール

付着細胞へのmiRNA Mimic/miRNA Inhibitor トランスフェクション (24 ウェルプレート)	3
付着細胞へのmiRNA Mimic/miRNA Inhibitor の リバーストランスフェクション (96 ウェルプレート)	5
付着細胞へのmiRNA Mimic および miRNA Inhibitor の コトランスフェクション (24 ウェルプレート)	7
プラスミド DNA と miRNA Mimic/miRNA Inhibitor の HeLa S3 細胞へのコトランスフェクション (24 ウェルプレート)	9
プラスミド DNA と miRNA Mimic および miRNA Inhibitor の HeLa S3 細胞へのコトランスフェクション (24 ウェルプレート)	11
トラブルシューティング	13

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

24 ウェルフォーマットでの miRNA Mimic あるいは miRNA Inhibitor トランスフェクション実験を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。24 ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。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。

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 Mimic/Inhibitor・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。必要に応じて逆の順序で、コンプレックスをウェルに添加後に細胞を添加するリバース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。

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。

実験開始前の準備事項

- QIAGEN で購入された miRNA Mimic/Inhibitor 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。英語版 Guideline 14 ページの説明書に従って再懸濁してください。

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 500 μ l に懸濁した $0.4 \sim 1.6 \times 10^6$ 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
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 、 $5\% \text{CO}_2$)。
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。
3. 37.5 ng の miRNA Mimic あるいは 187.5 ng の miRNA Inhibitor を、血清を含まない培養液 100 μ l で希釈する (ステップ5で細胞にコンプレックスを添加後の miRNA Mimic の最終濃度は 5 nM、miRNA Inhibitor の最終濃度は 50 nM になる)。希釈した miRNA Mimic/Inhibitor に 3 μ l の HiPerFect Transfection Reagent 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 と miRNA Mimic/Inhibitor の量は、細胞株と標的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・コンプレックスとインキュベートし、適切な時間に遺伝子発現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：解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、標的遺伝子、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 miRNA Mimic/miRNA Inhibitor のリバーストランスフェクション（96 ウェルプレート）

96 ウェルフォーマットでの miRNA Mimic/miRNA Inhibitor トランスフェクション実験を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。96 ウェルプレートの1 ウェルあたりの量が記載されています。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。

実験開始前の準備事項

- QIAGEN で購入された miRNA Mimic/Inhibitor 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。英語版 Guideline 14 ページの説明書に従って再懸濁してください。

操作手順

1. 96 ウェルプレートの1 ウェルあたりに、RNase フリー水 1 ~ 3 μ l で溶解した 12.5 ng の miRNA Mimic あるいは 62.5 ng の miRNA Inhibitor 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 miRNA Mimic の最終濃度は 5 nM、miRNA Inhibitor の最終濃度は 50 nM になる）。

注：スタンダードの miRNA の長さを 22 nt として miRNA Mimic/Inhibitor (ng) の量を計算します。

注：25 μ l の RNase フリー水で溶解した miRNA Mimic/Inhibitor を各ウェルに入れることも可能です。この場合、ステップ4で 150 μ l の培養液（細胞数 $1 \sim 5 \times 10^4$ ）を添加します。

2. 血清を含まない培養液 24.25 μ l に HiPerFect Transfection Reagent 0.75 μ l を添加する。希釈した HiPerFect Transfection Reagent を上記で準備した miRNA Mimic/Inhibitor に添加する。

注：正確な量を確実にピペッ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。調製後、1 ウェルあたり 25 μ l の希釈液を添加します。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent と miRNA Mimic/Inhibitor の量は、細胞株と標的遺伝子により変動します。

3. 室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ 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 μ l (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、miRNA Mimic/Inhibitor-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発現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: 解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、標的遺伝子、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 miRNA Mimic および miRNA Inhibitor のコトランスフェクション (24 ウェルプレート)

24 ウェルフォーマットでの miRNA Mimic および miRNA Inhibitor のコトランスフェクション実験を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。24 ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。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。

実験開始前の準備事項

- QIAGEN で購入された miRNA Mimic/Inhibitor 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。英語版 Guideline 14 ページの説明書に従って再懸濁してください。

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 500 μ l に懸濁した $0.4 \sim 1.6 \times 10^5$ 個の細胞 (1 ウェルあたり) を 24 ウェルプレートに蒔く。
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 、 $5\% \text{CO}_2$)。
あるいは本プロトコールのステップ4の後に細胞を蒔くこともできます。

3. 血清を含まない培養液 50 μ l で 37.5 ng の miRNA Mimic 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 miRNA Mimic 濃度は 5 nM になる)。希釈した miRNA Mimic に 1.5 μ l の HiPerFect Transfection Reagent 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 と miRNA Mimic の量は、細胞株と標的遺伝子により変動します。

4. 血清を含まない培養液 50 μ l で 187.5 ng の miRNA Inhibitor 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 miRNA Inhibitor 濃度は 50 nM になる)。希釈した miRNA Inhibitor に 1.5 μ l の HiPerFect Transfection Reagent を添加して、ボルテックスにより混和する。

注：スタンダードの miRNA の長さを 22 nt として miRNA Mimic/Inhibitor (ng) の量を計算します。

重要：最適なパフォーマンスに必要な HiPerFect Transfection Reagent と miRNA Inhibitor の量は、細胞株と標的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（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。
6. ステップ3からのmiRNA Mimic-HiPerFect Reagentコンプレックスと、ステップ4からのmiRNA Inhibitor-HiPerFect Reagentコンプレックスを混和する。
7. 1滴ずつコンプレックス・ミ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発現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：解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、標的遺伝子、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: プラスミドDNAとmiRNA Mimic/miRNA InhibitorのHeLa S3細胞へのコトランスフェクション (24ウェルプレート)

Attractene Transfection Reagentを用いてHeLa S3細胞へのmiRNA MimicあるいはmiRNA InhibitorとプラスミドDNAのコトランスフェクション実験を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。24ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。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。その他の付着細胞株を使用する場合は、プロトコール・パラメーターの至適化が必要になります。

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。

実験開始前の準備事項

- QIAGENで購入されたmiRNA Mimic/Inhibitor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。英語版Guideline 14ページの説明書に従って再懸濁してください。

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 500 μ l で 6×10^4 個の細胞を希釈する。
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 $^{\circ}$ C、5% CO_2)。
あるいは本プロトコールのステップ4の後に細胞を蒔くこともできます。
3. 400 ng のプラスミド DNA と、34.5 ng の miRNA Mimic あるいは 172.5 ng の miRNA Inhibitor を、血清あるいは抗生物質を含まない培養液 60 μ l で希釈する (ステップ7でコンプレックスに細胞を添加後の miRNA Mimic の最終濃度は 5 nM、miRNA Inhibitor の最終濃度は 50 nM になる)。
注: スタンダードの miRNA の長さを 22 nt として miRNA Mimic/Inhibitor (ng) の量を計算します。
重要: 最適なパフォーマンスに必要な Attractene Transfection Reagent、プラスミドDNA、miRNA Mimic/Inhibitor の量は、検出方法により異なります。
4. 1.5 μ l の Attractene Transfection Reagent を添加する。ピペットでアップダウンし混和する。
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 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 10 ~ 15 分間インキュベートする。その後コンプレックスを、24ウェルプレートのシングルプレートに添加する。

6. ステップ1からの細胞培養液 500 μ l をウェルに添加する。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。
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発現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 24～72時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、標的遺伝子、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：プラスミドDNAとmiRNA MimicおよびmiRNA InhibitorのHeLa S3細胞へのコトランスフェクション（24ウェルプレート）

Attractene Transfection Reagentを用いてHeLa S3細胞へのmiRNA Mimic、miRNA InhibitorおよびプラスミドDNAのコトランスフェクション実験を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。24ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。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。その他の付着細胞株を使用する場合は、プロトコール・パラメーターの至適化が必要になります。

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。

実験開始前の準備事項

- QIAGENで購入されたmiRNA Mimic/Inhibitor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。英語版Guideline 14ページの説明書に従って再懸濁してください。

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 500 μ l で 6×10^4 個の細胞を希釈する。
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℃、5% CO₂）。

あるいは本プロトコールのステップ4の後に細胞を蒔くこともできます。

3. 血清あるいは抗生物質を含まない培養液 30 μ l で 400 ng のプラスミドDNAおよび 34.5 ng のmiRNA Mimicを希釈する（ステップ7でコンプレックスに細胞を添加後の最終miRNA Mimic濃度は5 nMになる）。0.75 μ l のAttractene Transfection Reagentを添加する。ピペットでアップダウンし混和する。

注：スタンダードのmiRNAの長さを22 ntとしてmiRNA Mimic/Inhibitor (ng)の量を計算します。

注：レポーターシステムによっては、使用するmiRNA Mimicの量を減らす必要があります。miRNA Mimicに強く応答するレポーターの場合は、0.69 ngのmiRNA Mimicで実験を開始することを推奨します（ステップ7でコンプレックスに細胞を添加後の最終miRNA Mimic濃度は0.1 nMになる）。

重要：最適なパフォーマンスに必要なAttractene Transfection Reagent、プラスミドDNA、miRNA Mimicの量は、検出方法により異なります。

- 血清あるいは抗生物質を含まない培養液 30 μ l で 172.5 ng の miRNA Inhibitor を希釈する（ステップ7でコンプレックスに細胞を添加後の最終 miRNA Inhibitor 濃度は 50 nM になる）。0.75 μ l の **Attractene Transfection Reagent** を添加する。ピペットでアップダウンし混和する。

注：スタンダードの miRNA の長さを 22 nt として miRNA Mimic/Inhibitor (ng) の量を計算します。

重要：最適なパフォーマンスに必要な **Attractene Transfection Reagent** および miRNA Mimic の量は、検出方法により異なります。

- 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（15～25℃）で 10～15 分間インキュベートする。
- ステップ3からの miRNA Mimic・DNA コンプレックスと、ステップ4からの miRNA Inhibitor コンプレックスを混和する。その後コンプレックスを、24 ウェルプレートのシングルプレートに添加する。
- ステップ1からの細胞培養液 500 μ l をウェルに添加する。細胞が均一になるようにプレートを静かに揺り動かす。
- 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発現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 24～72 時間）。必要に応じて培養液を交換する。

注：解析のための最適なインキュベーション時間は細胞株、標的遺伝子、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。

トラブルシューティング

コメント

miRNA Mimic/Inhibitor トランスフェクション後のトランスフェクト効率が低い

- a) HiPerFect Transfection Reagent と miRNA Mimic/Inhibitor の比率が最適ではない
- 一定量の HiPerFect Transfection Reagent で、広範囲な miRNA Mimic/Inhibitor 濃度にわたって良好な結果が得られるが、コンプレックス表面の電荷がマイナス、ゼロまた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 miRNA Mimic/Inhibitor の比率を最適化するためには、HiPerFect Transfection Reagent の系統的な希釈を行なう（最適化の詳細はウェブサイト www.qiagen.com/KB/HiPerFect の HiPerFect Transfection を参照）。
- b) 細胞密度が不適
- HiPerFect Transfection Reagent-miRNA Mimic/Inhibitor 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。この状態で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、miRNA Mimic/Inhibitor へのプロセッシングが効率的に行なわれなくなる。

細胞死亡率が非常に高い

- a) HiPerFect Transfection Reagent と siRNA miRNA Mimic/Inhibitor の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
- 温度変化および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。miRNA Mimic/Inhibitor の効率的なトランスフェクションを行なうのに、細胞がよい状態にあることが非常に重要。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。

コメント

- c) 重要な遺伝子の発現が抑制あるいは重要なmiRNAが阻害 目的遺伝子あるいはmiRNAが細胞の生存に不可欠な場合、この遺伝子あるいはmiRNAの発現抑制あるいは阻害は細胞死をもたらす。
- d) レポーターベクターを使用した際にDNA品質が低い 不純物によりトランスフェクション効率が低下するためDNAは高品質でなければならない。HiSpeed®、QIAfilter、QIAGEN Plasmid Kitを用いてプラスミドDNAを精製するとよい。エンドトキシンに対する感受性の高い細胞には、EndoFree® Plasmid Kitを推奨 (www.qiagen.com/DNA 参照)。

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。実験ごと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は増殖状態が変化するため、実験ごとのトランスフェクション効率が変動する。
- 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) miRNA Mimic/Inhibitor濃度が低すぎる 高濃度のmiRNA Mimic/Inhibitorをトランスフェクションに使用する。

コメント

miRNA Mimic トランスフェクション後に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) 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。
- b) miRNA Mimic 濃度が低すぎる
- トランスフェクションに使用する miRNA Mimic 濃度を高くする。
- c) 実験アプローチが適切でない
- 多くのターゲットでは、転写レベルで miRNA 効果は検出することができない。異なる実験アプローチで、実験を繰り返す（例；PCR を用いて転写レベルを検出している場合は、タンパク質レベルの検出を試みる）。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。
- d) miRNA が調節機能のみを持つ
- miRNA の制御効果は siRNA による遺伝子抑制効果よりも弱い。miRNA はまた遺伝子を完全に抑制することなく、遺伝子発現を調節する制御機能を持つこともある。複数の miRNA が同一のターゲットに対して異なる制御効果を持つことがある。可能な場合、異なるターゲット（ほとんどの miRNA が様々なターゲットを持つため）あるいは同一のターゲットに対応する異なる miRNA Mimic を用いる。
- e) 研究中のターゲットが選んだ miRNA で制御されていない
- miRNA は自然界に存在する非コード RNA で、siRNA とは異なる結合パターンを持つ。このことはターゲットの予測を困難にし、入手できるターゲット予測ソフトで得たハイスコアが、研究中のターゲットが目的の miRNA により制御されることという確証にはならない。可能な場合、実験では必ずポジティブおよびネガティブコントロールの両方を同時に行なう。
- f) 異なる 3' UTR を持つ複数の目的転写物が存在する
- miRNA は標的 mRNA の 3' UTR に結合して翻訳抑制を調節する。多くの細胞性タンパク質が 2 つ以上の異なる転写物から翻訳される。これらの転写物のうち一つは 3' UTR に特異的な miRNA 結合部位を持つが、一つは持っていないなど、これらの転写物の 3' UTR が著しく異なることがある。

コメント

miRNA Inhibitor トランスフェクション後に阻害効果が弱いあるいは観察されない

- a) 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観察される阻害効果は、目的のタンパク質合成速度により異なる。最適な解析時点を決定するために経時実験を行なう。
- b) miRNA Inhibitorの濃度が低すぎる トランスフェクションに使用する miRNA Inhibitor の濃度を高くする。
- c) 実験アプローチが適切でない 多くのターゲットでは、転写レベルで miRNA 効果は検出することができない。異なる実験アプローチで、実験を繰り返す（例：PCRを用いて転写レベルを検出している場合は、タンパク質レベルの検出を試みる）。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。
- d) miRNA は調節機能のみを持つ miRNA の制御効果は siRNA による遺伝子抑制効果よりも弱い。miRNA はまた遺伝子の抑制なしに、遺伝子発現を調節する制御機能を持つ。このために、特異的な miRNA の抑制は転写レベルやタンパク質レベルで顕著な変化を起こさないことがある。
- e) 複数の miRNA がターゲットを制御する 多くのターゲットは複数の miRNA で制御されている；従って 1 つの miRNA を阻害するだけでは、同一の遺伝子をターゲットにした他の miRNA による翻訳抑制を相殺しない。可能であれば、目的の遺伝子をターゲットにした内因性 miRNA が非常に少ない細胞システムを使用する。あるいは数個の内因性 miRNA でのみ制御されているターゲットを選ぶ。
- f) 研究中のターゲットが選んだ miRNA で調節されていない miRNA は自然界に存在する非コード RNA で、siRNA とは異なる結合パターンを持つ。このことはターゲットの予測を困難にし、入手できるターゲット予測ソフトで得たハイスコアが、研究中のターゲットが目的の miRNA により制御されるこという確証にはならない。可能な場合、実験では必ずポジティブおよびネガティブコントロールの両方を同時に行なう。

コメント

Unregulated-vector control からレポーターの発現が低い

- a) Attractene Reagent と DNA との割合が不適 トランスフェクション試薬とプラスミド DNA 比率が最適ではない場合、コンプレックスの全体的な電荷がマイナス、0 あるいは強度にプラスになり、細胞表面へ吸着が非効率的になる。英語版 Guideline 17 ページの Table 4 を用いて Attractene Transfection Reagent と DNA の比率を最適化する。
- b) Attractene Reagent ・ DNA コンプレックスが不十分 トランスフェクション効率が期待より低いか細胞毒性が非常に低い場合には、細胞に加える Attractene Reagent ・ DNA コンプレックスの全体量を増やす。
- c) インキュベーション時間が不適 トランスフェクション後に遺伝子発現が最高レベルに達する時間は、細胞株により異なる。このことをトランスフェクション後のインキュベーション時間を決定する際に考慮しなければならない。特定の細胞株で最高の発現時間がわからない場合には、経時変化実験が必要である。
- d) 細胞密度が不適 Attractene Reagent ・ DNA 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、細胞へのコンプレックスの取り込みが非効率的である。
- e) ベクターの影響 プロモーター、複製起源およびプラスミドサイズ等のファクターは遺伝子発現率に影響を及ぼす。トランスフェクションに使用したプラスミド DNA の最適な量はプラスミドの発現率に依存する。
- f) DNA の品質が低い 不純物によりトランスフェクション効率が低下するため DNA は高品質でなければならない。HiSpeed、QIAfilter、QIAGEN Plasmid Kit を用いてプラスミドを精製するとよい。エンドトキシンに対する感受性の高い細胞には、EndoFree Plasmid Kit を用いることを推奨する。

Trademarks: QIAGEN®, EndoFree®, HiSpeed® (QIAGEN Group).

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。

© 2009 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

