

ScreenFect™ siRNA 最適化プロトコール

ご使用中の細胞株およびアプリケーションに最適な siRNA 濃度及び Transfection Reagent 使用量を下記手順で検討することを推奨します。(96 well format)

概要

1 ウェルあたり、ScreenFect™ siRNA Transfection Reagent 0.15~0.35 μ l と siRNA 1~3 pmol の範囲で検討します。

ScreenFect™ siRNA siRNA トランスフェクションの最適化

1. 各濃度 (3 点) siRNA/ Dilution Buffer 溶液の作製	
1-A	siRNA 4pmol、8pmol 及び 12pmol を Dilution Buffer に加え、最終容量 20 μ l の siRNA/Dilution Buffer 溶液を作製して下さい。
1-B	1-A で調製した各 siRNA/Dilution Buffer 溶液から 5 μ l ずつ 3 ウェル分、後述の 3. で示す 96-well PCR Tube Plate のウェル位置に分注して下さい。 (後の操作で調製する Transfection Reagent 各 5 μ l をこれらの siRNA/Dilution Buffer に加えます。)
Note: 各 siRNA/Dilution Buffer は PCR Tube Strips に小分けしても良いです。	

2. 各濃度(3点)ScreenFect™siRNA Transfection Reagent/Dilution Buffer 溶液の作製		
ScreenFect™siRNA Transfection Reagent の希釈には PCR Tube Strips の使用を推奨します。		
96-well PCR Tube Plate 中の ScreenFect™siRNA Transfection Reagent 最終使用量	Dilution Buffer 量	ScreenFect™siRNA Transfection Reagent 量
0.15 μ l	97 μ l	3 μ l
0.25 μ l	38 μ l	2 μ l
0.35 μ l	93 μ l	7 μ l
※ ScreenFect™siRNA Transfection Reagent は Dilution Buffer に直接添加し、すばやいピペッティング(4~5回)、もしくはボルテックスにより混合して下さい。		

3. siRNA-lipid complex の作製 :

2.で調製した各希釈 ScreenFect™siRNA Transfection Reagent 5 μl を、あらかじめ分注した各濃度の siRNA/Dilution Buffer に添加、混合後室温で 20 分インキュベートして下さい。この混合物を siRNA-lipid complex とします。

希釈した 3 種の ScreenFect™siRNA Transfection Reagent 5 μl を、1 pmol siRNA をあらかじめ分注しているウェルに添加して下さい (ウェル No. 1-3 ; 下図の C5-C7 に相当します)。すぐにピペッティングですばやく混合して下さい (10 ストローク)。ボルテックスは使用しないで下さい。

同じ操作を 2 pmol (ウェル No. 4-6 ; D5-D7)、3 pmol (ウェル No. 7-9 ; E5-E7) でも行って下さい。

96-well PCR Tube Plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A														siRNA: 1 pmol 2 pmol 3 pmol
B														
C					1	2	3							
D					4	5	6							
E					7	8	9							
F														
G														
H														

Transfection Reagent 量 : 0.15 0.25 0.35 μl

4. siRNA-lipid complex と細胞の混合 (トランスフェクション)

1-Step 法(リバーストランスフェクション法)を推奨します。培養細胞の剥離には、トリプシンや Accutase® を使用して下さい。

細胞懸濁液 100 μl (1.0-4.0 × 10⁴ cells) を siRNA-lipid complex を分注した各ウェルに加え、ピペッティングで穏やかに混合して下さい。

2-Step 法(フォワードトランスフェクション法)では、細胞をあらかじめ播種し、70-90%コンフルエントまで培養して下さい。トランスフェクション時に 96 ウェル細胞培養用プレートから古い培地を除去し、新しい培地 100 μl を各ウェルに加えて下さい。培地添加後、別途調製した siRNA-lipid complex を各ウェルに加えて下さい。

トラブルシューティング

トランスフェクション効率が低い場合、以下の内容を参考にして下さい。

考えられる問題	推奨する解決方法
siRNA の質、 もしくは量不足	<ul style="list-style-type: none"> • ストックしている siRNA の品質及び量を確認して下さい。 • 最適化プロトコールにより適した siRNA 量を検討して下さい。
siRNA-lipid complex 形成不十分	<ul style="list-style-type: none"> • Screen/Fect™siRNA Transfection Reagent/Dilution Buffer 溶液と siRNA/Dilution Buffer 溶液を混合した後、すぐにすばやいピペッティングで混ぜて下さい。 • siRNA-lipid complex の液量が 200µl を超えている場合、小分けしてチューブあたりの液量を減らすことで siRNA-lipid complex の形成が促進されることがあります。 • Screen/Fect™siRNA Transfection Reagent/Dilution Buffer 溶液と siRNA/ Dilution Buffer を混合した後、室温で 20 分以上インキュベートして下さい。
siRNA と Transfection Reagent の比率	<ul style="list-style-type: none"> • 最適化プロトコールにより siRNA と Screen/Fect™siRNA Transfection Reagent の比率を最適化して下さい。
保存条件	<ul style="list-style-type: none"> • 本品は冷蔵で保存して下さい。室温で長時間放置したり、凍らせたりしないで下さい。使用後はすみやかに冷蔵保存し、過度な温度変化を避けるようにしてください。
細胞	<ul style="list-style-type: none"> • 指数増殖期で均等に増殖している細胞をトランスフェクションに使用して下さい。 • コンタミしていないことを確認して下さい。 • 継代培養中は抗生物質の使用を推奨します。 • 実験中及び継代中に細胞密度が過密または希薄にならないよう、適切に継代をして下さい。
細胞密度、細胞分裂	<ul style="list-style-type: none"> • 指数増殖期で均等に増殖している細胞をトランスフェクションに使用して下さい。実験中及び継代中に細胞密度が過密または希薄にならないよう、適切に継代をして下さい。このポイントは 1-Step 法、2-Step 法両方にとって重要です。 • 2-Step 法では、トランスフェクションを行う 15-24 時間前に継代を行って下さい。 • 過度な継代はトランスフェクション効率を下げる恐れがあるため、再現性を得るためには継代回数を統制して下さい。 • 新しい細胞を使用して下さい。

考えられる問題	推奨する解決方法
siRNA-lipid complex 形成阻害	<ul style="list-style-type: none"> 血清は本品の性能に影響を与えませんが、トランスフェクションを行う際には、EDTA や硫酸デキストランのような陰イオン性阻害物質だけでなく抗生物質の使用を避けることを推奨します。
不適切なプロトコール	<ul style="list-style-type: none"> ScreenFect™ シリーズ製品については、1-Step 法によるトランスフェクションを推奨します。多くの場合、1-Step 法の方が2-Step 法を用いた場合よりも効率良くノックダウンできる傾向にあります。 ただし、1-Step 法が全ての細胞種及びアプリケーションに適しているわけではありません。1-Step 法によって期待される結果が得られない場合は2-Step 法を検討して下さい。 <p><u>2-Step 法</u></p> <p>トランスフェクション時に適した状態になるよう前日に細胞を播種します。siRNA-lipid complex を細胞に加える直前に培養上清全て(接着性が弱い細胞の場合は半量)を除去する事を推奨します。96 ウェルプレートの場合は新鮮な培地 100 μl (接着性が弱い細胞の場合は 50 μl) を各ウェルに添加し、調製した siRNA-lipid complex を添加します。接着性が弱い細胞の場合では特に細胞を剥がさないように注意下さい。</p>