

genetransfer

siLentFect™ Lipid Reagent

取扱説明書

0.5 ml	170-3360
1.0 ml	170-3361
5 x 1.0 ml	170-3362

本製品は研究用途専用の試薬です。

4 で保存してください。

保存条件および使用期限

siLentFect Lipid Reagent は冷蔵状態で出荷されます。お手元に届きましたら、4 で保存して下さい。0 以下で保存しないで下さい。siLentFect は 4 で保存された場合、購入後 6 ヶ月間安定です。

内容量

siLentFect には 0.5ml(カタログ番号 170-3360)、1.0ml(カタログ番号 170-3361)および 5 x 1.0ml(カタログ番号 170-3362)の 3 種類のパッケージサイズがあります。一般に 1.0ml で 35mm シャーレ 200 ~ 500 枚分のトランスフェクションを行うことができます。siLentFect は 1.0mg/ml 溶液として供給されています。

多くの場合、siLentFect は他の脂質試薬に比べて少ない量で効果的に siRNA を導入することができます。別の脂質試薬を用いていた場合や、新たな細胞株で実験を行う場合、最良の結果を得るために siLentFect と siRNA の希釈系列を用いて条件を検討することが重要です。表 1 には培養容器の大きさに応じた試薬量の目安が記載されています。

概要

RNA 干渉(RNAi)は遺伝子発現制御の強力なツールとして、遺伝子機能の解析に用いられています。RNAi は 2 本鎖 RNA によって引き起こされる配列特異的な遺伝サイレンシングです。small interfering RNAs (siRNA)は 21 塩基対程度の 2 本鎖 RNA で、遺伝子特異的に強い遺伝サイレンシングを引き起こします。siLentFect は、ほ乳動物の培養細胞への siRNA の優れた導入試薬として開発されました。

siLentFect Lipid Reagent はカチオン性脂質と中性脂質の混合物で、血清存在下で細胞濃度 50 ~ 70%のほ乳動物培養細胞への siRNA の導入に最適化されています。本取扱説明書に記載されている、所定の培養容器サイズと siLentFect と siRNA の量を用いることで、多くの細胞株で、高いレベルの遺伝サイレンシングが期待できます。最良の結果を得るためには、目的の細胞株に最適な siRNA と試薬の量を用いることが重要です。

推奨事項

siLentFect は使いやすいプロトコールで、種々の細胞へ幅広く遺伝子導入できるよう開発されました。最適な導入効率を得るために下記の条件を検討します。

- ・ siLentFect 試薬の使用量
- ・ siRNA の濃度
- ・ トランスフェクション時の細胞濃度
- ・ 細胞と siLentFect-siRNA 複合体との反応時間

また、以下の項目は試薬の効果を十分に得るために重要です。

- ・ 使用前に siLentFect のチューブを転倒混和させてください。
- ・ siRNA 溶液や脂質溶液の調製には滅菌ポリスチレン製容器(例 12x75mm チューブやマイクロプレートなど)をご使用下さい。ポリプロピレン製容器は siLentFect-siRNA 複合体を吸着する恐れがあります。

条件の至適化

導入効率の至適化は、ジーンサイレンシングの最大化と細胞毒性の最小化に必要不可欠です。使用する培養容器サイズと細胞密度に対して、至適化されるべき最も重要なパラメーターは siLentFect の量と siRNA の濃度です。表 1.には培養容器の大きさに応じた試薬量の目安が記載されています。毒性が高い場合は siLentFect の量を減らしてご検討ください。最大限のジーンサイレンシングを引き起こすのに必要な siLentFect の量と siRNA の濃度は細胞種によって異なる場合があります。

表 1 . 培養容器の大きさに応じた試薬量の目安

培養容器	前培養時の培地量	siRNA濃度	無血清培地量**	siLentFect使用量
96 well	0.1ml	5-20nM	25 µl	0.05-0.4 µl
24 well	0.5ml*	5-20nM	50 µl	0.25-2.0 µl
12 well	1.0ml*	5-20nM	100 µl	0.5-4.0 µl
6 well/35mm	2.5ml*	5-20nM	250 µl	1.0-5.0 µl
60mm	5.0ml*	5-20nM	500 µl	2.5-10 µl
100mm	10.0ml*	5-20nM	1.0ml	5.0-20 µl

*トランスフェクションの 15~60 分前に注意深く培地を抜き取り、2 分の 1 量の培地を添加します。

**無血清培地は siRNA と siLentFect の希釈の際に半量ずつ使用します。

多くの場合、siLentFect は他の脂質試薬に比べて少ない量で効果的に siRNA を導入することができます。別の脂質試薬を用いていた場合や、新たな細胞株で実験を行う場合、最良の結果を得るために siLentFect と siRNA の希釈系列を用いて条件を検討することが重要です。表 1 には培養容器の大きさに応じた試薬量の目安が記載されています。

接着細胞用プロトコール

下記のプロトコールには 24 ウェルプレートを用いて行なう場合の用量を示してあります。

それ以外のタイプのプレートを使用する場合には容量を換算してください。

1. トランスフェクションの前日に、翌日に 50~70%コンフルエントになるよう 24well プレートに細胞を撒き、血清を含む培地 (500 μ l) で培養します。多くの細胞株では 0.5ml 培地中に $0.1 \sim 4.0 \times 10^5$ 個の細胞密度が推奨されます。5%CO₂、37 °C で一晩インキュベートします。

2. トランスフェクションの 15~60 分前に培地を注意深く取り除き、250 μ l の新しい培地を各 well に入れておきます。

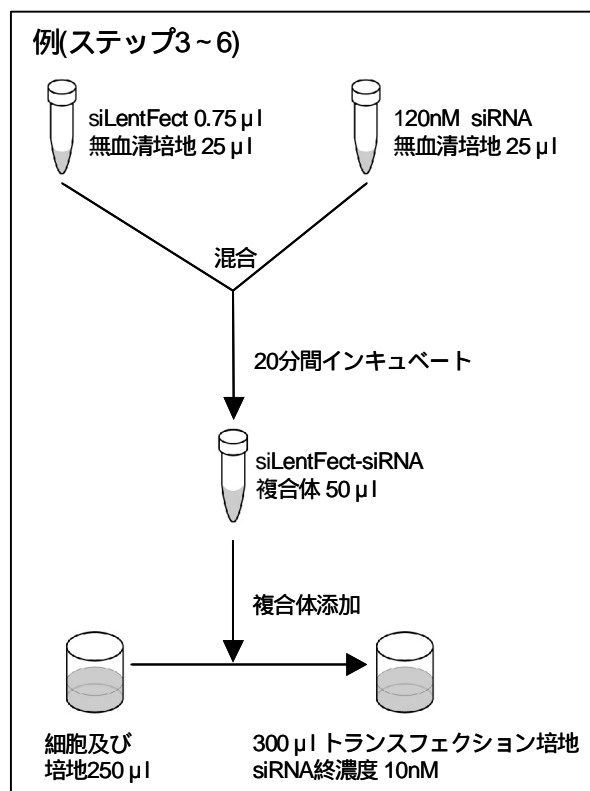
3. 初期条件としては、1well 当たり、siLentFect 0.75 μ l を無血清培地 25 μ l の比率で希釈します。(右図)

最適な siLentFect の量は表 1 の範囲(0.25 ~ 2.0 μ l)で検討する必要があります。

4. 1well 当たり、120nM の siRNA を含む無血清培地を 25 μ l 用意します(右図)。120nM の溶液を作成することで、右図 に示した溶液の濃度が 10nM となります。

最適な siRNA 量は表 1 に示した濃度範囲で検討する必要があります。

5. siLentFect 希釈液と siRNA 希釈液を混合します。タッピングまたはピペティングで混和し、20 分間室温でインキュベートします。(右図 -)



6. ステップ 2 で調製した血清培地中の細胞に 50 μ l の siLentFect-siRNA 複合体溶液を加え、プレートを穏やかにゆすり混和します。37 °C の CO₂ インキュベーターで培養します。(右図 -)

7. アッセイは、トランスフェクションから 4~72 時間後に mRNA 量またはタンパク質発現量を測定することで行います。毒性が問題になる場合はトランスフェクションから 4~24 時間後に培地を交換し、毒性を軽減することが可能です。

簡易法 ステップ 2 の培地の交換を行わずに、siLentFect-siRNA 複合体を直接細胞に添加することも可能です。この場合は培地の総量が異なるため試薬や siRNA の使用量を培地量に応じて変更します。