

英語版 May 2010 に対応

miScript Target Protector を用いた 実験ガイドライン

miRNA 機能解析用



Sample & Assay Technologies

目次

プロトコール

付着細胞への miScript Target Protector を用いた Fast-Forward トランスフェクション法 (24 ウェルプレート)	3
付着細胞への miScript Target Protector および miScript miRNA Mimic を用いた Fast-Forward コトランスフェクション法 (24 ウェルプレート)	4
付着細胞への miScript Target Protector およびプラスミド DNA を用いた Fast-Forward コトランスフェクション (24 ウェルプレート)	5
トラブルシューティング	6

プロトコール: 付着細胞への miScript Target Protector を用いた Fast-Forward トランスフェクション法 (24 ウェルプレート)

24 ウェルフォーマットでの miScript Target Protector 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。

操作手順

1. トランスフェクションの直前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 500 μ l に 0.4 ~ 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% CO₂)。
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. 血清を含まない培養液 97 μ l で miScript Target Protector (100 μ M ストック溶液) 3 μ l 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、miScript Target Protector の最終濃度は 500 nM になる)。希釈した miScript Target Protector に 3 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 と miScript Target Protector 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、ステップ 3 の混合液を室温 (15 ~ 25°C) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。
5. コンプレックスを 1 滴ずつ細胞に添加する。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 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：付着細胞への miScript Target Protector および miScript miRNA Mimic を用いた Fast-Forward コトランスフェクション法（24 ウェルプレート）

24 ウェルフォーマットでの miScript miRNA Mimic および miScript Target Protector 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。

操作手順

1. トランスフェクションの直前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 500 μ l に $0.4 \sim 1.6 \times 10^5$ 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% CO₂）。
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. 3 μ l の miScript Target Protector（100 μ M ストック溶液）および 0.3 μ l の miScript miRNA Mimic（20 μ M ストック溶液）を、血清を含まない培養液 96.7 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、miScript miRNA Mimic の最終濃度は 10 nM に、miScript Target Protector の最終濃度は 500 nM になる）。希釈した mimic/target protector に 3 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 と miScript miRNA Mimic および／あるいは miScript Target Protector 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、ステップ 3 の混合液を室温（15 ~ 25°C）で 5 ~ 10 分間インキュベートする。
5. コンプレックスを 1 滴ずつ細胞に添加する。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、適切な時間に表現型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：付着細胞への miScript Target Protector およびプラスミド DNA を用いた Fast-Forward 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 miScript Target Protector 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。

操作手順

1. トランスフェクションの直前に、血清および抗生物質を含んだ適切な培養液 500 μ l に $0.4 \sim 1.6 \times 10^5$ 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% CO₂)。

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. 血清を含まない 54 μ l の培養液で、3 μ l のプラスミド DNA (100 ng/ μ l ストック溶液) と 3 μ l の miScript Target Protector (100 μ M ストック溶液) 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、プラスミドは 300 ng、miScript Target Protector の最終濃度は 500 nM になる)。希釈した miScript Target Protector に 1.5 μ l の Attractene Transfection Reagent を添加し、ピペッティングにより静かに混和する。

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、miScript Target Protector 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、ステップ 3 の混合液を室温 (15 ~ 25°C) で 10 ~ 15 分間インキュベートする。

5. コンプレックスを 1 滴ずつ細胞に添加する。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 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

トランスフェクション効率が低い

- a) HiPerFect Transfection Reagent と miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector の比率が最適ではない
- 一定量の HiPerFect Transfection Reagent で、広範囲な miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector 濃度にわたって良好な結果が得られる。しかしながら、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り、その結果細胞表面への吸着が非効率的になることがある。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 miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector の比率を最適化するためには、HiPerFect Transfection Reagent の体系的な希釈を行なう（最適化の詳細はキアゲンウェブサイト www.qiagen.com/KB/HiPerFectTransfectionReagent_JA を参照）。
- b) 細胞密度が最適でない
- HiPerFect Transfection Reagent と miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector コンプレックス添加時に細胞密度が最適でない場合には、細胞がトランスフェクションに適切な増殖期ではない。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、miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector 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（表現型への効果がない）

- a) HiPerFect Transfection Reagent と miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector のコンプレックス濃度が高すぎる
- 細胞に加える HiPerFect Transfection Reagent と miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector のコンプレックス量を減らす。
- b) 細胞へのストレス
- 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。miScript miRNA Mimic/miScript Target Protector 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。

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。

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) 繰り返し実験で細胞密度が異なる
細胞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。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実験間で一定に保つ。
- 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 回未満）を使用することを推奨。
- d) miScript miRNA Mimic あるいは miScript Target Protector の濃度が低すぎる
トランスフェクションに使用する miScript miRNA Mimic あるいは miScript Target Protector の濃度を高くする。

miScript miRNA Mimic トランスフェクション後に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抑制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) miScript miRNA Mimic 濃度が低すぎる
トランスフェクションに使用する miScript 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 効果を検出することはできない。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）。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

-
- 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明確でないことがある。miRNA は遺伝子の完璧な抑制なしに、遺伝子発現を調節する制御機能も持つ。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。
- 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 種類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。

miScript Target Protector トランスフェクション後に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めるために経時実験を行なう。
- b) miScript Target Protector 濃度が低すぎる
トランスフェクションに使用する miScript Target Protector の濃度を高くする。通常は 500 nM 以下の miScript Target Protector が効率的であるが、プラスミドレポーター・コンストラクトを用いた実験では 1 μ M 以上の miScript Target Protector が必要になることがある。
- 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）。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

- 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明確でないことがある。miRNA は遺伝子の完璧な抑制なしに、遺伝子発現を調節する制御機能も持つ。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 1 種類以上の 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 による翻訳抑制を排除できない。可能であれば、目的の遺伝子をターゲットにしている内因性 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。他の miRNA が標的遺伝子を制御することを回避するために、異なる miScript Target Protector をコトランスフェクトすることも可能である。
- f) 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。
- g) miRNA 結合部位の予想が適切でない、あるいは複数の結合部位がある
miRNA 結合のメカニズムはまだ完全には理解されていない。miScript Target Protector が miRNA の結合部位を正確にターゲットにした場合にのみ、適切に作用する。ある miRNA が 1 つのターゲットに対して複数の miRNA 結合部位を持っていたり、結合部位の予測に汎用しているアルゴリズムが適切でないことがある。従って、全体の効果を観察するためには、異なる miScript Target Protector を用いた複数の miRNA 結合部位のブロックがしばしば必要になる。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。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, HiPerfect™ (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。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

© 2010–11 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

