

Reverse Transfection of siRNA

2014. 6 ver. 1

by S. Tanimura

siRNA のトランスフェクションによって、目的タンパク質の発現を抑制することを目的とする。なお、実験に用いる細胞や目的タンパク質によって条件が異なるため、siRNA の濃度、播種する細胞数、培養時間などについては、あらかじめ最適条件を検討することが必須である。

ここでは、24 well プレートで行う場合について記載するが、下表を参考にして適宜スケールを変更する。詳細はインビトロジェンの下記サイトを参照のこと。

<http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/rnaimax-reverse-transfections-lipofectamine.html>

Culture vessel	Rel. surf. area ¹	Vol. of plating medium	Dilution medium reverse transfection	Dilution medium forward transfection	RNAi (pmol)	RNAi (nM)	Lipofectamine® RNAiMAX ²
96-well	0.2	100 μ l	20 μ l	2 x 10 μ l	0.12-6	1-50	0.1-0.3 μ l
48-well	0.4	200 μ l	40 μ l	2 x 20 μ l	0.24-12	1-50	0.2-0.6 μ l
24-well	1	500 μ l	100 μ l	2 x 50 μ l	0.6-30	1-50	0.5-1.5 μ l
6-well	5	2.5 ml	500 μ l	2 x 250 μ l	3-150	1-50	2.5-7.5 μ l
60 mm	10	5 ml	1 ml	2 x 500 μ l	6-300	1-50	5-15 μ l
100 mm	30	10 ml	2 ml	2 x 1 ml	12-600	1-50	15-35 μ l

- 24 well プレートに Opti-MEM 100 μ l/well を添加し、そこに siRNA（最終濃度 1~50 nM）を加えて穏やかに攪拌する。
 - ☞ siRNA の濃度は目的タンパク質や細胞によって異なるため、最適化が必要である。
 - ☞ siRNA の最終濃度は、細胞懸濁液 500 μ l をあわせて全量が 600 μ l となることを踏まえて算出する。
- 上記の siRNA 希釈液に、Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen #13778-150）を 1 μ l 添加し、穏やかに攪拌する。
- 室温にて 10~20 分間静置する。
- 細胞を剥離し、抗生物質を除いた培地を用いて、必要量の細胞懸濁液（500 μ l/well）を準備する。
 - ☞ 細胞播種 24 時間後に 30~50%となることを推奨しているが、これも最適条件の検討が必要である。
2. にて調製した siRNA - Lipofectamine RNAiMAX 複合体溶液（100 μ l/well）に、4. で調製した細胞懸濁液（500 μ l/well）を添加し、穏やかに攪拌する。
- 24~72 時間培養後に、各種実験に用いる。