

ユーザーマニュアル: IVT mRNA (In Vitro 用)

保存および取り扱い

1. mRNA製品は1mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.4) に保存されています。mRNA製品はドライアイスで凍結出荷され、-80°Cで12ヶ月まで安定して保存できます。品質の低下を予防するために、凍結融解の繰り返しは避けてください。
2. RNAの取扱いは決められたエリアで行うことをお勧めします。
3. 作業前にRNase不活化剤で実験台やピペットマンを除染してください。
4. RNAを取り扱う際は、常にきれいな手袋とRNaseフリーのチップ、チューブ、試薬を使用してください。

接着細胞へのトランスフェクション

IVT mRNA はLipofectamine™ MessengerMAX™ (Thermo Fisher Scientific, US)、JetMESSENER® (Polyplus, France)、または Viromer® RED (Lipocalyx, Germany)といったmRNA用の様々なトランスフェクション試薬によってトランスフェクションを行うことができます。以下に EGFP IVT mRNAを哺乳類細胞にトランスフェクションする一般的なプロトコールを示します。

トランスフェクション用細胞の準備 Preparing Cells for Transfection

一般的に細胞はトランスフェクションの**前日**にプレートにまきます。一般的に目的の細胞はトランスフェクション時に40~80%コンフルエントになるようにします。表1に推奨される細胞の巻き込み数を示します。

表 1. 培養器により推奨される細胞の撒き込み数

| 培養器 | 表面積 (cm ²)* | 1 ウェルごとの接着細胞数** | 1 ウェルごとの浮遊細胞数** |
|-------------------------------------|-------------------------|---|---------------------|
| 96-ウェルプレート | 0.32 | 7.5×10 ³ - 2.5×10 ⁴ | 2.5×10 ⁴ |
| 24-ウェルプレート | 1.9 | 4.0×10 ⁴ - 1.0×10 ⁵ | 1.0×10 ⁵ |
| 12-ウェルプレート | 3.8 | 8.0×10 ⁴ - 1.5×10 ⁵ | 1.5×10 ⁵ |
| 6-ウェルプレート/35 mmディッシュ | 9.5/9 | 1.5×10 ⁵ - 4.0×10 ⁵ | 4.0×10 ⁵ |
| 60 mmディッシュ/フラスコ 25 cm ² | 21/25 | 2.0×10 ⁵ - 8.5×10 ⁵ | 1.6×10 ⁶ |
| 100 mmディッシュ/フラスコ 75 cm ² | 55/75 | 1.0×10 ⁶ - 4.0×10 ⁶ | 4.0×10 ⁶ |

注意:

* 表面積のサイズはコーニングのディスプレイャブル培養器に基づいています。

** 目的の細胞の大きさや増殖時間によって調整してください。

トランスフェクションのプロトコール例 Example Protocol for Transfection

以下は293T細胞とHeLa細胞にEGFP IVT mRNAをトランスフェクションするプロトコールの一例です（図1）。本プロトコールで示すmRNA量とトランスフェクション試薬の容量は12ウェルプレートを用いた場合の1ウェルあたりの値です。それぞれの実験において、使用するmRNA量/トランスフェクション試薬の量の比はそれぞれの実験において、条件検討されることをお勧めします。

- 12-ウェルプレートに細胞を1ウェル当たり 1.0×10^6 細胞ずつまきます。
- トランスフェクション当日に培養メEDIUMを替えます*。
- EGFP IVT mRNA 1ugをトランスフェクションバッファー 100 ul ので希釈します。
- トランスフェクション試薬をボルテックスまたは転倒混和で5秒間混合します。
- Add 2 ul of トランスフェクション試薬 2 ul を mRNA/トランスフェクションバッファー（3. で作製したものに添加し、ピペティングで混和します。（トランスフェクションマスターミックス）
- トランスフェクションマスターミックスを RT（室温）で15 分間、静置します。
- Add 100 ul of トランスフェクションマスターミックスを1ウェルあたり100 ul ずつ培養メEDIUMに添加します。
- プレートを軽く揺らし、マスターミックスが拡散するようにします。
- 6~72 時間後にEGFP発現を確認します**。

注意:

* トランスフェクション試薬のマニュアルを参照し、血清や抗生物質存在下で使用できることを確認してください。

** IVT mRNA（in vitro 発現用）はトランスフェクション後早くで6時間から検出可能で、タンパク質の発現は一過性です。タンパク質の発現のピークは細胞の種類やmRNA修飾によって異なるため、注意が必要です。48-72 時間後に強いタンパク質発現が検出されないこともございます。よって、実験ごとに幅広い時間帯で遺伝子発現を注意深く観察することをお勧めします。

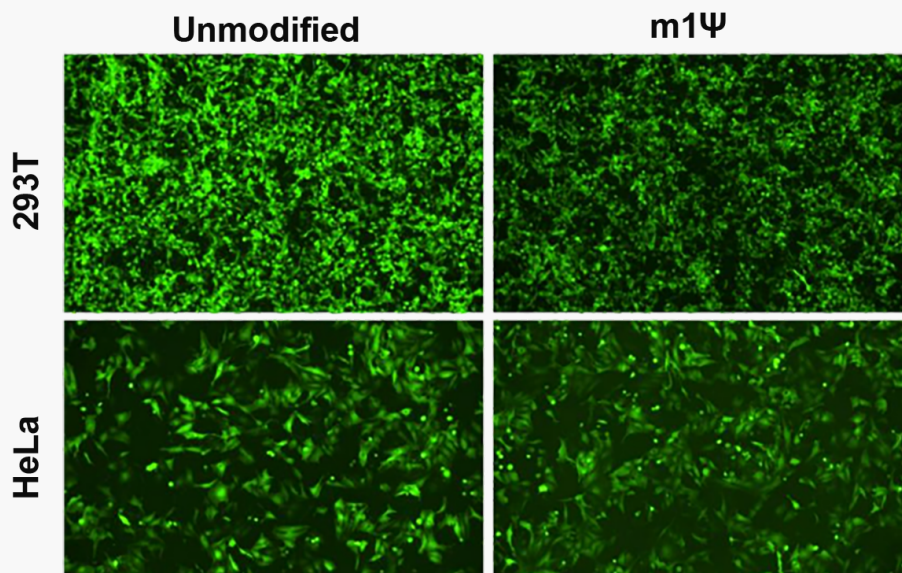


図 1. 293T細胞とHeLa細胞における EGFP mRNA の発現。12ウェルプレートで培養した 293T または HeLa 細胞が60%コンフルエントの状態に1ウェルあたりmRNA 1 ug をトランスフェクションした。トランスフェクション72時間後の EGFP 発現を顕微鏡下(100×)で観察した。EGFP mRNAは修飾核酸N1-Methylpseudouridine (m1Ψ)の有、無の状態で作成した。