

DharmaFECTを用いた一般的なトランスフェクション法: siRNAのためのトランスフェクション法

本プロトコルは、DharmaFECT トランスフェクション試薬を使用して、哺乳動物細胞へsiRNAを導入する際の一般的な方法を記載しています。記載の各種条件は96ウェルプレートフォーマットに対して最適化されています。Table 1 では、さまざまなプレートフォーマットについて適したDharmaFECTの量を示しています。Table 2では、siRNAを細胞に効率的に導入するための推奨条件を、GAPDHあるいはPPIBをターゲットとするsiRNAを使ってさまざまな細胞株で検討した結果を示しています。それらの結果は、使用する細胞に最適なDharmaFECT試薬を選択する際のガイドとしてご活用ください。

siRNAの細胞へのトランスフェクションを成功させるには、注意深い条件検討が必要です。次ページの「トランスフェクション条件の最適化」を参考に事前に条件検討をしてください。

トランスフェクション実験では、下記1から5のサンプルを各3組ずつ (n=3) 含めることをおすすめします。

1. トランスフェクション試薬およびsiRNAを用いない細胞
2. トランスフェクション試薬のみ (siRNAなし)
3. ポジティブコントロールsiRNA (内在性またはレポーター遺伝子をターゲットとするsiRNA)
4. ネガティブコントロールsiRNA
5. お客様のターゲット遺伝子に対するsiRNA。

注) ターゲット遺伝子に対するsiRNAとして当社Horizon (Dharmacon)のsiRNAを使用する際は、ポジティブコントロールsiRNAおよびネガティブコントロールsiRNAは、ターゲット遺伝子に対するsiRNAと同じ種類・フォーマットの製品を使用してください。

※ 以下の操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行なってください

細胞のプレATING

プレATING時の最適な細胞密度は細胞の増殖特性により異なります。お使いの細胞株にあわせて条件の検討をおすすめします。96ウェルプレートフォーマットにおける細胞ごとの推奨細胞密度 (目安) をTable 2に記載しています。より大きなプレートフォーマットでは、ウェルの表面積の違いに比例して、プレートする細胞の数を変えることができます。

1. トリプシン処理後、細胞を数えます。
2. 抗生物質を含まない完全培地で細胞を希釈し、プレATING用の適切な細胞密度にします (完全培地とは細胞が生存できる培地で、血清を含んでいても構いません)。
3. 100 μ L の細胞溶液を96ウェルプレートの各ウェルにプレートします。
4. 37°C、二酸化炭素5%にて細胞を一昼夜培養します。

トランスフェクション (siRNA終濃度 25 nMの場合)

siRNAを終濃度5~50 nMにて使用することをおすすめします。左記の各サンプル3組ずつの実験をおすすめします。このプロトコルでは、96ウェルフォーマットにおいて、siRNAの終濃度25 nM、n=3として必要な量を記載しています。ピペティング操作でのサンプルロスを考慮して、全ての量を3.5倍で計算しています。

(P2に続きます)

- 1X siRNA Buffer あるいは他の適当なRNase フリー水を使用して、5 μ M siRNA 溶液を調製します。

*siRNA再溶解プロトコルは、当社ウェブサイト (<https://horizondiscovery.com/>) からダウンロードできます。

- 別のチューブ (2本) を用いて、適当量の5 μ M siRNA (チューブ1) またはDharmaFECT (チューブ2) を、それぞれ抗生物質を含まない無血清培地で希釈します (Table 1参照)。例えば、HeLa 細胞をトランスフェクションする際には、以下のように調製してください。
 - チューブ1: 5 μ M siRNA 1.75 μ L を無血清培地 33.25 μ L に加えてください。合計で35 μ L となります。
 - チューブ2: 0.7 μ L のDharmaFECT 1 を無血清培地34.3 μ L に加えてください。合計で35 μ L となります。
- 注意深くピペティングし、各チューブの内容物を穏やかに混合します。室温で5分間インキュベートします。
- チューブ1の溶液をチューブ2に加え。この例では合計量は70 μ L となります。注意深くピペティングして混合します。室温にて20分間インキュベートします。
- 抗生物質を含まない完全培地をステップ4の溶液に加え、トランスフェクション用培地を調製します。この例では、280 μ L の完全培地を加えて350 μ L のトランスフェクション用培地とします。
- 96ウェルプレートのウェルから培養培地を取り除き、100 μ L のトランスフェクション用培地を加えます。
- 37°C、二酸化炭素5%にて、細胞を24-48時間 (mRNA発現レベルでのノックダウン解析の場合)、または48-96時間 (タンパク質発現レベルでのノックダウン解析の場合) 培養します。

もし24時間後に細胞毒性が見られたときは、トランスフェクション用培地を完全培地と取りかえ、培養を続けます。最良の結果を得るために、少なくとも80%の細胞が生存する条件を使用してください。

トランスフェクション条件の至適化

細胞のviabilityへの影響を可能な限り抑え、siRNAを効率よく導入するために、以下のガイドラインに従って使用する細胞ごとにトランスフェクション条件を検討することをおすすめします。至適化実験では、少なくとも3つの細胞密度と4つのDharmaFECTトランスフェクション試薬量 (Table 1に記載の範囲内) をご検討ください。

- 細胞密度を選択するときは、アッセイとタイムポイントの要件を考慮してください。長期アッセイでは細胞密度が低く、短期実験では細胞数が多くなります。
- 終濃度25 nMのポジティブおよびネガティブコントロールsiRNAと未処理の細胞を使用して、ポジティブコントロールsiRNAで80%を超えるターゲットmRNAノックダウンと80%以上の細胞生存率を示す条件を見つけます。ノックダウン効率、ネガティブコントロールsiRNAを導入した細胞に対して定量RT-PCR法を用いて評価してください。PCR用プライマーはsiRNAがターゲットとする配列を挟む配列とすることが推奨されます。
- 至適な条件が決まったら、ターゲット遺伝子に対するsiRNAを同時に用いて確認します。
- ターゲット遺伝子の固有の特性により、最適なノックダウンに必要なsiRNA量は変化する可能性があるため、ターゲット遺伝子に対するsiRNAの終濃度を変えてトランスフェクションを実行し (5~50 nMの範囲が目安)、最も適当なsiRNA濃度を見つけることをおすすめします。

トランスフェクション条件の至適化後、ターゲットsiRNAの濃度をノックダウン効率が十分な範囲で下げる検討をします。ノックダウン効率、細胞生存率、アッセイへの影響等を考慮してsiRNA濃度を決めます。

フォーマット (ウェル/プレート)	表面積 (cm ² /ウェル)	チューブ1 siRNA希釈溶液 (ウェルあたりの量)		チューブ2 DharmaFECT希釈溶液 (ウェルあたりの量)		完全培地液量 (μ L/ウェル)	プレーティング 液量 (μ L/ウェル)
		5 μ M siRNA (μ L)	無血清培地 (μ L)	DharmaFECT (μ L)	無血清培地 (μ L)		
96	0.3	0.5	9.5	0.05-0.5	9.95-9.5	80	100
24	2	2.5	47.5	0.25-2.5	49.75-47.5	400	500
12	4	5	95	0.5-5.0	99.5-95.0	800	1,000
6	10	10	190	1.0-10.0	199.0-190.0	1,600	2,000

Table 1. さまざまなプレートフォーマットにおいて、終濃度25 nMのsiRNAを細胞にトランスフェクションする際の推奨量を示しています。DharmaFECTの量は条件検討での初期目安値として、使用する細胞株ごとに条件の至適化を行ってください。

細胞株	細胞名	推奨 DharmaFECT 種類	GAPDHあるいは PPIB 遺伝子発現抑制 (%)	96ウェルプレートの ウェルあたり必要な DharmaFECT量 (μL)	96ウェルプレートのウェルあたりの細胞数	その他の適用可能なDharmaFECT種類
ヒト						
786-0	Kidney adenocarcinoma	1	94	0.4	5.0 x 10 ³	2
A549	Lung carcinoma	1	92	0.2	1.0 x 10 ⁴	2, 3, 4
BxPC3	Pancreas adenocarcinoma	2	85	0.2	5.0 x 10 ³	1, 3, 4
DLD-1	Colorectal adenocarcinoma	2	85	0.4	5.0 x 10 ³	1, 3
DU 145	Prostate carcinoma	1	94	0.2	1.0 x 10 ⁴	2, 3, 4
NCI-H1299	Lung carcinoma	2	93	0.2	1.0 x 10 ⁴	4
HCT-116	Colorectal carcinoma	2	83	0.1	5.0 x 10 ³	4
HEK293	Kidney transformed embryonic cells	1	92	0.2	1.0 x 10 ⁴	2, 4
HeLa	Cervical epithelial adenocarcinoma	1	95	0.2	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
HeLa S3	Cervical epithelial adenocarcinoma	4	97	0.4	5.0 x 10 ³	1, 2, 3
Hep G2	Hepatocellular carcinoma	4	91	0.4	1.0 x 10 ⁴	1, 2
hMSC	Mesenchymal stem cells	1	94	0.4	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
HT-1080	Fibrosarcoma	4	96	0.2	5.0 x 10 ³	1, 2, 3
HT-29	Colorectal carcinoma	1	99	0.2	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
Huh-7	Hepatocarcinoma	4	76	0.05	5.0 x 10 ³	1, 2
HUVEC	Umbilical vein endothelial cells	4	85	0.2	2.0 x 10 ⁴	1, 2
LNCaP	Prostate carcinoma	3	80	0.2	1.0 x 10 ⁴	1
MCF-10a	Breast adenocarcinoma	1	93	0.2	1.0 x 10 ⁴	2
MDA-MB-231	Breast adenocarcinoma	4	87	0.1	5.0 x 10 ³	1
MDA-MB-453	Breast adenocarcinoma	2	91	0.2	1.0 x 10 ⁴	1, 3, 4
MCF7	Breast adenocarcinoma	1	90	0.2	1.0 x 10 ⁴	2, 4
OVCAR-3	Ovarian adenocarcinoma	1	90	0.1	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
PC-3	Prostate carcinoma	2	88	0.2	1.0 x 10 ⁴	3
SK-BR3	Breast adenocarcinoma	2	90	0.2	1.0 x 10 ⁴	1, 3, 4
SK-OV-3	Ovarian adenocarcinoma	3	90	0.4	1.0 x 10 ⁴	1, 2, 4
u87MG	Brain glioblastoma	1	87	0.1	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
げっ歯類						
A7R5	Rat aortic smooth muscle	2	95	0.1	5.0 x 10 ³	1
C2C12	Mouse myoblasts	1	87	0.2	5.0 x 10 ³	2, 3, 4
CHO K1	Chinese hamster ovary	4	92	0.8	1.0 x 10 ⁴	1, 2
ES-D3	Mouse embryonic stem cells	1	94	0.2	2.0 x 10 ³	2
ES-E14TG2a	Mouse embryonic stem cells	1	93	0.2	2.0 x 10 ³	2
H9C2	Rat heart myoblasts	1	96	0.2	1.0 x 10 ⁴	2, 3, 4
J774A.1	Mouse macrophages	4	90	0.2	1.0 x 10 ⁴	-
NIH/3T3	Mouse embryonic fibroblasts	1	91	0.2	1.0 x 10 ⁴	3
NRK-49F	Rat kidney fibroblast	2	92	0.2	1.0 x 10 ⁴	1, 4
RAT2	Rat fibroblast	1	75	0.2	2.0 x 10 ⁴	2
3T3-L1	Mouse embryonic fibroblast	1	80	0.2	5.0 x 10 ³	3
その他						
COS-7	African green monkey kidney	2	94	0.4	5.0 x 10 ³	1, 3, 4

Table 2. トランスフェクション条件の最適化：ハウスキーピング遺伝子GAPDHあるいはPPIBのノックダウン効果をトランスフェクション効率の指標として、siRNAの効率的な導入条件を検討しました。

GAPDHあるいはPPIBをターゲットとするコントロールsiRNA（これらのsiRNAは、最適化されたトランスフェクション条件ではmRNA発現レベルで90%以上のノックダウン効果が確認されています）を終濃度25-100 nM で用い、各々の細胞株について、プレーティング細胞密度（ウェルあたり2 x 10³, 5 x 10³, 1 x 10⁴, 2.5 x 10⁴個の細胞）、DharmaFECTの種類（4種類）、DharmaFECTの量（0.05-0.8 μL/ウェル）を試しました（トランスフェクション時間は24時間）。これら3つのパラメーターについて、最もsiRNAトランスフェクション効率の高かった組合せ（いずれもmRNA発現レベルで80%以上のノックダウン効果を確認）を示しています。多くの細胞株において、「推奨DharmaFECT種類」に示したDharmaFECT以外の種類のDharmaFECTを用いてもトランスフェクションが可能です。これらのデータは、細胞株ごとのトランスフェクション条件を最適化する際の、初期目安としてご使用ください。

よくある質問 (FAQ)

質問	回答
6ウェルプレート用のプロトコルはありますか？	6ウェルプレートを含む、様々なプレートフォーマットにおいて、終濃度25 nMのsiRNAを細胞にトランスフェクションする際の各試薬の推奨量をTable 1に示しています。細胞密度はウェルの表面積およびアッセイ系に応じて至適化してください。Table 2に記載の推奨データ(DharmaFECT 1, 2, 3, 4)は、あらゆるプレートフォーマットに適用可能です。
・トランスフェクション用培地を添加後、何時間後に完全培地に取り換えるべきですか？ ・トランスフェクションに要する時間は？	トランスフェクション用培地を添加後、6時間以降に完全培地に取り換え可能ですが、必ずしもその必要はありません。トランスフェクションは6時間以内におよそ完了しますが、遺伝子発現抑制の検出実験はトランスフェクション24時間以降に実施してください。
抗生物質を含まない培地を使用する理由は何？	トランスフェクション実験では、抗生物質を使用しないことが一般的に推奨されています。その理由は、トランスフェクション時には細胞の物質透過性が高まり、トランスフェクション試薬とsiRNAの複合体とともに抗生物質が細胞に取り込まれ、細胞死のリスクが高まるためです。もし、抗生物質を含まない培地での培養時間をできるだけ短くする必要のある場合は、抗生物質を含まないトランスフェクション用培地を添加6時間以降に、抗生物質を含む培地に取り換えることをおすすめします。
・トランスフェクション実験で血清を用いることはできますか？ ・プロトコルのどの過程で無血清培地を使用すべきですか？	トランスフェクションプロトコルのステップ1及び2において、siRNA溶液およびDharmaFECTの希釈を行う際には無血清培地を使用してください。siRNAとDharmaFECTが複合体を形成した後は完全培地を使用することができます。
siRNAの使用終濃度はどれくらいにすれば良いですか？	最適なsiRNA濃度は、ターゲット遺伝子ごとにmRNAの発現量や安定性等が異なるため、siRNAごとに異なります。siRNA終濃度を5-100 nMの範囲で変えてノックダウン実験を行い、十分なノックダウン効果の得られる最小の濃度をsiRNAごとに決めてください。
siRNAの量を倍にしてトランスフェクション実験を行う場合、DharmaFECTの量も倍にすべきですか？	使用するDharmaFECTの量は、使用する細胞の密度に応じて決めます。ある細胞密度において、50 nMの濃度のsiRNAを効率よく導入できるDharmaFECT量を決定した場合、それと同じDharmaFECTの量を用いて0.1-50 nMの範囲の濃度のsiRNAを効率よく導入できることを私どもは確認しています。
私の使用する細胞株がTable 2にはありません。どのDharmaFECTを使用すべきでしょうか？	DharmaFECT 1が、多くの細胞への効率的なsiRNA導入に適用可能な、最も汎用性のある処方方のトランスフェクション試薬です。多くの研究者が、まずはDharmaFECT 1を用いてトランスフェクション実験を開始しています。しかし、DharmaFECT 1以外の処方方の試薬 (DharmaFECT 2, 3, 4) の使用によって、より効率的なsiRNA導入、より高いcell viabilityを得ることのできる場合があります。Table 2に記載のない細胞株を使用する場合は、DharmaFECT 1-4をセットとしたSet of 4製品を用いて、4種類すべての処方方について検討実験を行うことをおすすめします。また、文献検索により、使用する細胞株で既に実績のあるDharmaFECT処方方を見つけて使用することもおすすめします。
トランスフェクション効率が低い、あるいは細胞毒性が出ます。理由は何でしょうか？	トランスフェクション条件は、使用する細胞ごとに、cell viabilityへの影響を最小限にとどめつつ最も高い導入効率の得られるように最適化します。細胞密度やDharmaFECTの量はトランスフェクション効率に影響を与えます。トランスフェクション時間を24時間とした場合の推奨条件を記載したTable 2を、トランスフェクション条件の至適化実験の参照としてください。細胞成長特性やアッセイ時間、細胞密度がTable 2と異なる条件で実験を行った場合、トランスフェクション効率やcell viabilityの変わる可能性があります。トランスフェクション条件を十分検討しても至適な条件が見つからない場合は、その細胞はトランスフェクション試薬を用いたトランスフェクションに不向きである可能性があります。その場合は、エレクトロポレーションやAccell siRNAなど、他のsiRNA導入法の検討をおすすめします。

本プロトコルは英語版プロトコル (<https://horizondiscovery.com/>) を元にした日本語版です。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0001東京都渋谷区神宮前4-18-6 イスルギビル #326
Tel: 03-6434-5410
rnai.jp@horizondiscovery.com
www.horizondiscoverykk.com

almarBlue is a trademark of Thermo Fisher Scientific, Inc. All trademarks are the property of Horizon Discovery Company unless otherwise specified. ©2018 Horizon Discovery Group Company—All rights reserved. First published June 2014.
B033-2006-v2

horizon™
INSPIRED CELL SOLUTIONS