

DharmaFECT Duoを用いた siRNAとプラスミドのコトランスフェクション法

このプロトコルは、DharmaFECT Duoトランスフェクション試薬を用いて、siRNAとプラスミドを細胞に導入する方法を記載しています。各種条件は、96ウェルプレートフォーマットにおいて、各ウェルあたり100 nMのsiRNAおよび100 ngのプラスミドの使用に対して最適化されています。このプロトコルは、microRNAとプラスミドの同時トランスフェクションに関するガイドラインとしてもご使用いただけます。

Table 4にはさまざまなプレートフォーマットについて適したDharmaFECT Duoの量を示しています。トランスフェクションではプラスミドのサイズやその発現特性が影響するため、プラスミド濃度の最適化が必要です。トランスフェクション最適条件を確立した後、オフターゲット効果を低減するため、siRNA濃度を低くする検討を行います。ノックダウン効率、細胞生存率、アッセイへの影響を考慮して最適なsiRNA濃度を決めます。

準備

Table 1に記載したサンプルを、トランスフェクション実験ごとに準備することをおすすめします。プロトコルのすべての操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行ってください。結果を統計的に解析するために、サンプルごとに3組ずつ (n=3) で実験を行います。

Table 1. siRNAとプラスミドのコトランスフェクション実験で用いるサンプル

サンプル	チューブ	目的
プラスミドのみ (DharmaFECT Duoあり)	チューブ 1a	プラスミドの取り込みと遺伝子発現レベルのベースを確認する
プラスミドおよびネガティブコントロール siRNA (DharmaFECT Duoあり)	チューブ 1b	配列特異的なノックダウンと非特異的な効果を区別する
プラスミドおよびテストする siRNA (DharmaFECT Duoあり)	チューブ 1c	ターゲット遺伝子のノックダウンおよびプラスミドからの遺伝子発現を行う
モックトランスフェクション (DharmaFECT Duoのみ)	チューブ 1d	トランスフェクション試薬や操作による非特異的な効果と細胞毒性を確認する
トランスフェクションせず (DharmaFECT Duoなし)	チューブ 1d	ベースとなる表現型およびターゲット遺伝子の発現レベル、細胞の生存率を定量する

他に必要な準備

トランスフェクション実験では一般的な細胞培養試薬や機器が必要になります。また、細胞生存率や遺伝子ノックダウンのアッセイに用いる機器・試薬が必要となります。Table 2では、DharmaFECT Duo以外に必要な細胞・試薬類を記載しています。

Table 2. siRNAとプラスミドのコトランスフェクション実験において必要な試薬

試薬	説明
細胞	最高のトランスフェクション効率を得るためには、継代回数が少なく、対数増殖期にある細胞を使用してください。
抗生物質を含まない完全培地	細胞を培養する培地で、最大20%まで血清を添加することができます。トランスフェクション過程で細胞毒性を引き起こす可能性があるため、抗生物質を含まない培地を使用してください。
抗生物質を含まない無血清培地あるいは低血清培地	siRNA、プラスミド、DharmaFECT Duoの複合体を形成させるために使用します。
プラスミド	目的の遺伝子を発現するプラスミド
テストするsiRNA	発現抑制する遺伝子のmRNAをターゲットとするsiRNA
ネガティブコントロール siRNA	プラスミドが発現するmRNAや、使用する細胞に内在するmRNAをターゲットとしない siRNAを用います (例えばON-TARGETplus Non-Targeting siRNAなど)。

細胞のプレATING

プレATING時の最適な細胞密度は細胞の成長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。細胞ごとの推奨細胞密度（目安）をTable 3に記載しています。

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、適当な密度（Table 3）のストック細胞溶液を調製します。
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。

Table 3. DharmaFECT Duoを用いたsiRNAとプラスミドのコトランスフェクション推奨条件

表に記載の数の細胞を96ウェルプレートにプレATINGし、一昼夜インキュベーションしました。psiCHECK-2 Vector（Promega, 100 ng/ウェル）とRenilla luciferase-targeting siRNA（100 nM）を、さまざまな量のDharmaFECT Duo（0.05-0.6 μ L/ウェル）と混合し複合体を形成させ、細胞にコトランスフェクションしました。トランスフェクション48時間後に、Firefly luciferaseの発現をDual-Glo Luciferase Assay System（Promega）を用いて評価しました。また、Renilla luciferase mRNAの発現量をbranched DNA analysis（Panomics社）を使用して定量し、細胞の生存率をalarBlueR Assay（Biosource International）により定量しました。細胞生存率およびノックダウン率は、トランスフェクションしていない細胞の値に対してノーマラズしています。

細胞株	ウェルあたりの最終細胞数	ストック細胞溶液の密度 (細胞/mL)	DharmaFECT Duo (μ L)	無血清培地 (μ L)	DharmaFECT Duo (μ L/ウェル)	細胞生存率 (%)	ノックダウン率 (%)
ES-D3	2.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	4.2	135.8	0.3	87	97
HeLa	2.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	1.4	138.6	0.1	79	81
Hep G2	2.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	0.7	139.3	0.05	72	91
Jurkat	6.0 x 10 ⁴	6.0 x 10 ⁵	8.4	131.6	0.6	89	96
MCF7	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵	2.8	137.2	0.2	80	99
MCF10a	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵	2.8	137.2	0.2	78	98
NIH/3T3	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵	5.6	134.4	0.4	83	97

トランスフェクション

各サンプル3組ずつ（n=3）の実験をおすすめします。ここでは96ウェルフォーマット、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えて、全ての量を3.5倍で計算しています。

1. ストック用のプラスミド溶液（20 μ g/mL）とsiRNA溶液（2 μ M）を、バッファー（RNaseフリー、pH7.4）を使用して調製します。
* 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。
2. プラスミド溶液とsiRNA溶液とをチューブ1a-1c中で混合します（下記）。
 - a. チューブ1a（プラスミドのみ）：プラスミド溶液 17.5 μ Lを無血清培地 17.5 μ Lで希釈し合計35 μ Lとします。
 - b. チューブ1b（プラスミドおよびネガティブコントロール siRNA）：プラスミド溶液 17.5 μ Lをネガティブコントロール siRNA溶液 17.5 μ Lと混合し、合計35 μ Lとします。
 - c. チューブ1c（プラスミドおよびテストするsiRNA）：プラスミド溶液 17.5 μ LをテストするsiRNA溶液 17.5 μ Lと混合し、合計35 μ Lとします。
 - d. チューブ1d（lipidのみ）：プラスミドもsiRNAも加えません。無血清培地のみ 35 μ L加えます。
3. チューブ2の中でDharmaFECT Duoを無血清培地で希釈し、合計140 μ Lとします。細胞株ごとの推奨条件を示したTable 3を参照してください。複数のsiRNAをテストする際には、この量を増やす必要があります。
4. 各チューブの内容物を注意深くピペティングして穏やかに混合します。
5. チューブを室温で5分間インキュベートします。
6. チューブ2の内容物35 μ Lをチューブ1a-1dの各々に加え、合計70 μ Lとします。各チューブの内容物を注意深くピペティングして穏やかに混合します。
7. 室温にて20分間インキュベートします。
8. 抗生物質を含まない完全培地280 μ Lを、ステップ7の各混合液に加えます。合計350 μ Lとなります。各溶液がトランスフェクション用培地となります。
9. 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。
10. 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。
11. もし培養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。細胞の生存率はalarBlue（Biosource International）やMTTアッセイなどにより定量します。最良の結果を得るために、少なくとも70%の細胞が生存する条件を使用してください。

Table 4. さまざまなプレートフォーマットにおいて、100 nMのsiRNAを細胞にトランスフェクションする際の推奨容量

表に記載のDharmaFECT量は目安であり、使用する細胞株ごとに至適化する必要があります。各溶液の量を10%程度ずつ増量することにより、ピペット操作を容易にできます。

プレートフォーマット		チューブ 1a ウェルあたりの量		チューブ 1bおよび 1c ウェルあたりの量		チューブ 1d ウェルあたりの量	チューブ 2 ウェルあたりの量		合計 (μ L/ウェル)
フォーマット (ウェル/ プレート)	表面積 (cm ² / ウェル)	20 μ g/mLのプ ラスミド (μ L)	無血清 培地 (μ L)	20 μ g/mLのプ ラスミド (μ L)	2 μ M siRNA (μ L)	無血清培地 (μ L)	DharmaFECT (μ L)	無血清培地 (μ L)	トランスフェ クション用培 地
96	0.3	5	5	5	5	10	0.05-0.5	9.95-9.5	100
24	2	25	25	25	25	50	0.5-2.0	49.5-48.0	500
12	4	50	50	50	50	100	1.0-3.0	99.0-97.0	1,000
6	10	100	100	100	100	200	2.0-6.0	198.0-194.0	2,000

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

psiCHECK-2 Vector and Dual-Glo are trademarks of Promega. Renilla is a trademark of Panomics. alamarBlue Assay 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 April 2018.

B034-2006-v2