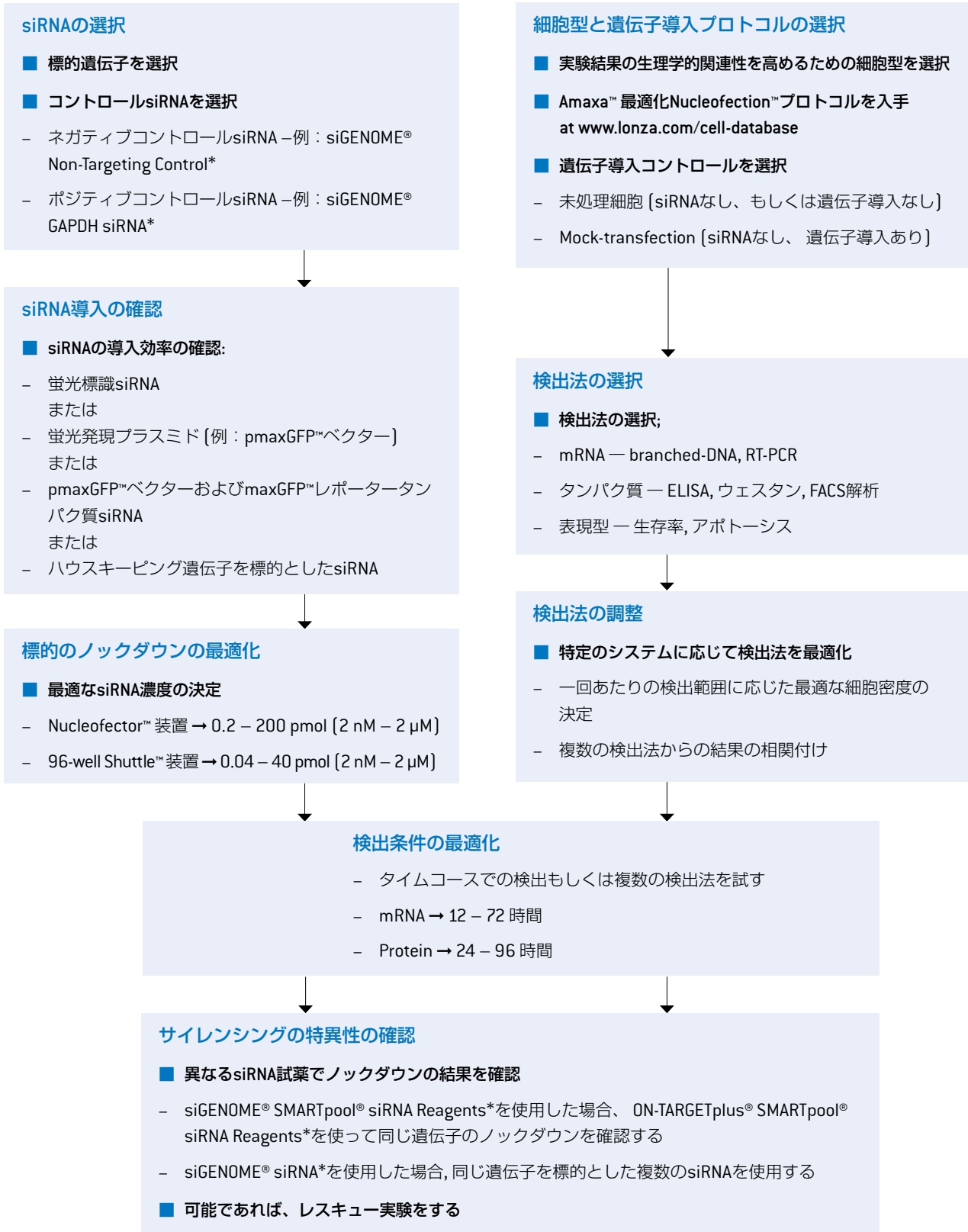


Nucleofection™を使ったsiRNA実験のデザイン

Amaxa™ Nucleofector™ テクノロジーは、初代細胞と遺伝子導入の難しい細胞株への siRNA や shRNA ベクターの遺伝子導入に最適です。



*Thermo Fisher Scientific, Dharmacon Products

Nucleofection™を使ったsiRNA実験のデザイン

続き

pmaxGFP™ベクターで、Nucleofection™条件を確立/検証します。

特定の細胞型に対する最適なNucleofection™条件は、DNAまたはRNAのどちらを遺伝子導入するかに関わらず同一となります。カスタマーの細胞に最適なNucleofector™溶液およびプログラムを確立/検証するためにpmaxGFP™ベクター（各キットに含まれるポジティブコントロールプラスミド）で予備実験を行うよう推奨されます。条件を決定したら、基質としてDNAまたはRNAのどちらを（あるいは両方同時に）遺伝子導入するかに関わらず、その条件が適用されます。

適切な実験コントロールを特定します。

siRNAの実験から導き出される結果が正確であるようにするため、適切な実験コントロールを設定する必要があります。各RNAi実験において、少なくとも4種類の実験コントロールを設定するよう推奨されます。複数の条件下での複数コントロールを使った平行試験は96-well Shuttle™システムを使用することで簡単に実行できます。

■ siRNAポジティブコントロール

サイクロフィリンB（PPIBとしても知られる）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、ラミンなどのハウスキーピング遺伝子を標的とするsiRNAプールまたは単体のsiRNAを使用します。十分に発現するものの非必須の遺伝子を標的とする良好なポジティブコントロールは生細胞率に影響しない実験パラメータを設定するのに役立ちます。またこれは、研究対象に関連する特定の経路と無関係なネガティブコントロールとして使用することもできます（目的遺伝子に対するアッセイでは表現型が観察されない）。

■ siRNAネガティブコントロール

siRNAネガティブコントロールは、選択される細胞型において既知の標的にならないよう生物情報学的に設計、検証されています。これらの試薬は、siRNAの細胞への導入に関連する配列非依存性効果と配列固有のサイレンシングを区別するのに重要です。このような配列非依存性効果の例として、核酸導入に関連する遺伝子導入のプロセスまたは二本鎖RNAの導入に対する過敏性に起因する毒性があります。ネガティブコントロールが観察可能で、標的とは無関係の意図しない効果を引き起こさないことを実験的に確認するために、各実験システムにおいて複数の候補を試験するよう推奨されます。このため、Thermo Fisher Scientificは複数のネガティブコントロールの製品群を取り揃えています。例えばON-TARGETplus®Non-Targeting Controlsがありますが、これはマイクロアレイ解析によって、HeLa細胞において標的とは無関係の効果をおおむね示さずか又は全く示さないことが確認されています。

■ 未処理の遺伝子導入コントロール

未処理のコントロールサンプルはsiRNAで処理されず、遺伝子導入プロセスにも関連しない細胞から構成されています。このコントロールは、他のすべての条件と比較して基準となる細胞活性自体の指標として使用できます。

■ 偽処理コントロール

偽処理のコントロールサンプルは、siRNAを含まずに遺伝子導入を行った細胞です。Nucleofection™の場合、細胞はNucleofector™溶液と混合され、siRNAを含まない状態でNucleofection™操作を行います。偽処理細胞の分析によって、遺伝子導入プロセス自体が細胞毒性またはその他の非特異的効果を示すかどうか分かります。

精密に調整された特異的siRNA 配列/濃度

同一のNucleofection™条件を使用すれば、siRNAを予備実験で使用されるpmaxGFP™ベクターに置き換えることができます。（独立した平行サンプル、またはsiRNAを用いたNucleofection™による共遺伝子導入のいずれかで）pmaxGFP™ベクターを実験間での相対的遺伝子導入効率を比較もしくは遺伝子導入される細胞を選択するための手段として取り入れることができます。DNAを用いた遺伝子導入効率は通常siRNAと比較してかなり低くなります。蛍光でラベリングしたオリゴヌクレオチドの使用に興味があれば、まずこの文書中補注部分を一読するか、ロンザの技術サポートチームにお問い合わせください。

■ 最適なsiRNA 配列の選択

あらかじめ特性が明らかになっていないsiRNA配列を使用している場合は、慎重に配列の選択をするように推奨されます。siRNAを提供している会社の多くは、オリゴヌクレオチドの最適化サービスを提供しています。しかし、遺伝子特異的なsiRNAオリゴヌクレオチドをいくつかテストして、標的となる遺伝子を効率的にダウンレギュレートするsiRNAオリゴヌクレオチドの同定が必要となる場合もまだ珍しくありません。

■ 最適な有効siRNA濃度の決定

siRNA媒介性ノックダウン実験を実行する際、用量反応（濃度）解析によって、mRNA、タンパク質または機能レベルに対して十分なターゲットのノックダウンに必要なsiRNAの最小濃度を決定するよう推奨されます。Nucleofection™では、最適なsiRNA濃度は2 nM 以下から2 μMの間です。最適な濃度は細胞型やmRNAおよび/またはターゲット遺伝子のタンパク質の半減期など複数の要因によって異なります。研究対象の細胞型やターゲットに最適な濃度を決定するためにsiRNA 濃度の初期滴定を2 nM ~ 2 μM の間で実行するよう推奨されます（Nucleofector™装置：0.2~200 pmol / 100 μl、96-well Shuttle™装置0.04~40 pmol / 20 μl）。最小濃度決定には30および300 nMを使用してください。使用するsiRNAの濃度は脂質媒介型の方法より高いように見えますが、

Nucleofection™を使ったsiRNA実験のデザイン

続き

表1：低濃度siRNAを用いたNucleofection™

siRNA濃度	細胞型	標的/解析法	ノックダウン	参考文献
2 nM (0.2 pmol*)	COS-7 (サル腎臓線維芽細胞)	Bruton's チロシンキナーゼ / FACS	96%	5
7 nM (0.7 pmol*)	THP-1 (ヒト単球白血球)	インターフェロン調節因子 (IRF5) / RT-PCR	≫強く抑制≪	6
1 nM (0.1 pmol*)	HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)	インターフェロンインテグリン 1/3および Akt / ウェスタンブロット	>90%	7

* Per cuvette (100 µl volume)

サンプル当たりではNucleofection™は5x~25x少ない量で反応を行っています (96-well Shuttle™装置では20 µl、96ウェルリポフェクションでは100 µl、標準Nucleofector™装置では100 µl、6ウェルリポフェクションでは1~2.5 ml)。

注記

1. siRNA濃度の計算：100 µl Nucleocuvette™中 1 pmol siRNAの Nucleofection™：1 pmol/100 µl = 20 µl Nucleocuvette™中 1 pmol siRNAの10 nM Nucleofection™：1 pmol/20 µl = 50 nM 個別の計算については、ロンザのウェブサイトのsiRNA計算式 (www.lonza.com/sirna-calculator) も参照してください。
2. 用量と重量の関係：1 pmol siRNAは、14 ng siRNAに相当します (21 bp siRNA ds-オリゴヌクレオチドの分子量：21×660 g/mol 約14 ng/pmol)。

最適な有効siRNA濃度はターゲットおよび細胞型によって異なります。実際、数多くの文献で望ましい遺伝子のノックダウンを導く際に <50 nM siRNA のNucleofection™が観察され、報告されています (表1を参照)。

ユーザーからは 1 µM よりも高い濃度で満足する結果を得たとの報告もあります。しかし効率的なノックダウンと標的とは無関係な効果の最小化とのバランスを保つことが重要です。siRNA<30ntを保つことによってプロテインキナーゼ (PKR) および2',5'-オリゴアデニル酸シンセターゼ経路の活性化を避けることができますが、siRNAはそれでも非ターゲット遺伝子の刺激や抑制といった非特異的な効果をもたらします。¹

最適な解析タイミングの決定

mRNAやその生成タンパク質の安定性と半減期はさまざまであるため、ターゲットのノックダウンを評価するのに最適なタイミングを実験的に決定することが重要です。例えば、哺乳動物細胞において、mRNAの半減期は数分から2日となるのに対し、タンパク質産物の半減期は数分未満から数日です。² このことを考慮すると、siRNAがRISCと結合し、mRNA/タンパク質濃度を目的のレベルまで大幅に減少させるための十分な時間がとれるような実験の設計が必要です。通常、ターゲットmRNAを大幅に減少させるための推奨時間幅は5~72時間であり、ターゲットタンパク質を適切にノックダウンして表現型の結果を評価するための推奨時間幅は24~96時間です。

siRNA特異性の検証

siRNA濃度を可能な限り低く保つことで非特異的な効果の最小化に役立ちますが、すべての実験に適切なコントロールを使用すること大切です。³ mRNAおよびタンパク質レベルにおける遺伝子ノックダウンのモニタリングによって、siRNA配列がmicroRNAではなく従来のRNA経路で作用していることが確認されます (標的mRNAの破壊を目標とするのではなく、少なくとも部分的にその変換を阻害)。RNAiデータの信頼性を高めるには、目的のRNA転写産物中の別々の場所をターゲットとする2つ以上のsiRNAを用いて同じの結果に導きます。最終コントロールとしてのレスキュー実験は、近年『Nature Cell Biology』³の論文で示唆されているように、あらゆるRNAi実験で選択されるコントロールは、siRNAでは目的遺伝子の発現抑制に効果が無い場合に有効です。通常、1つ以上のサイレントな第3コドンの点変異もしくは標的配列内の非翻訳領域の欠失を利用します。翻訳上の影響は、3'-非翻訳領域に対してターゲットとされるsiRNAを使用して避けることができます。レスキュー実験では、標的遺伝子のsiRNAとsiRNA耐性型のプラスミドを共遺伝子導入もしくは標的遺伝子のsiRNA耐性を共発現するshRNAを使用します。

設定したNucleofection™条件を使用してDNAとRNAの両方を遺伝子導入することができるため、Nucleofector™テクノロジーを利用すれば両方の実験を簡便に行うことができます。

補注

■ 遺伝子導入効率の測定

- 蛍光ラベリングされたsiRNAの使用：蛍光ラベリングされたsiRNAを用いた実験では、いくつかの細胞型において遺伝子導入効率が最大で99%を示します。Nucleofection™後、蛍光ラベルの多くがすぐに消失してしまうため、共焦点顕微鏡またはFACSが使用できない場合は最初のセットアップ実験において蛍光ラベルしたsiRNAの使用は推奨されません。同様に、蛍光細胞を適切に可視化するために必要な蛍光ラベリングsiRNAの量は、機能的反応に最適と思われる量よりもずっと多いことがよくあります。このため、これは高価であり有益ではない実験となっています。さらに、siRNAが細胞膜

Nucleofection™を使ったsiRNA実験のデザイン

続き

総量	21 bp siRNA ds-オリゴヌクレオチドの分子量： 21 × 660 g/mol = 13860 g/mol = 13.86 ng/pmol = 14 ng/pmol	濃度 100 µl用キュベット	濃度 20 µl用キュベット
1 pmol	14 ng	1 pmol/100 µl = 10 nmol/l = 10 nM	1 pmol/20 µl = 50 nmol/l = 50 nM
5 pmol	69 ng	5 pmol/100 µl = 50 nmol/l = 50 nM	5 pmol/20 µl = 250 nmol/l = 250 nM
10 pmol	140 ng	10 pmol/100 µl = 100 nmol/l = 100 nM	10 pmol/20 µl = 500 nmol/l = 500 nM
20 pmol	277 ng	20 pmol/100 µl = 200 nmol/l = 200 nM	20 pmol/20 µl = 1000 nmol/l = 1 µM
50 pmol	690 ng	50 pmol/100 µl = 500 nmol/l = 500 nM	50 pmol/20 µl = 2500 nmol/l = 2.5 µM
100 pmol	1.4 µg	100 pmol/100 µl = 1000 nmol/l = 1 µM	100 pmol/20 µl = 5000 nmol/l = 5 µM

For individual calculation, also refer to our website www.lonza.com/sirna-calculator

に接着し、実際は細胞内に入っていないことに起因する誤った陽性結果が顕微鏡観察によって導かれる可能性があります。例えば相対的な遺伝子導入効率の推定を行うために、siRNAと平行して（または同じサンプルとして）、pmaxGFP™ベクターをサンプルとして遺伝子導入するよう推奨されます。それでもなお、siRNA分子の遺伝子導入効率は通常高くなることを考慮してください。ラベルしたsiRNAを実験に使用したい場合は、ロンザの技術サポートチームに連絡して、実験がなるべくスムーズに進むよう支援を受けてください。

■ 遺伝子導入細胞を増やすには

遺伝子導入細胞を増やす方法の1つは、siRNAを蛍光レポーターまたは表面マーカーを発現するプラスミドと共遺伝子導入し、レポーターを発現する細胞を選択することです。このアプローチは、Wuらによって使用されています（2005年）⁴。shRNA発現ベクターを使用することによって、共発現される蛍光または抗生物質耐性マーカーを使用し、遺伝子導入された細胞を選択できます（下記参照）。しかし、プラスミド DNAの遺伝子導入効率は、一般的にsiRNA二本鎖よりも低くなっています。

■ 長期的なRNAi効果（二本鎖siRNA vs. shRNA発現ベクター）

化学的に合成される二本鎖siRNAは、siRNA配列を迅速に知るための手段になります。これは標的遺伝子の効率的なノックダウンにつながりますが、このダウンレギュレーションは一過性（通常2～5日持続）であり、短期間で標的遺伝子の発現を抑制する目的、または長期間の効果が必要とするその他の用途においては、十分でない可能性があります。siRNAまたはshRNA（ヘアピン構造の小型RNA）の発現を促すための数多くのプラスミドベクターが市販されています。siRNA/shRNAの長期的発現を可能にすることに加え、プラスミドDNAとして増殖、取り扱い、保存できるという利点を有しており、蛍光マーカーまたは抗生物質耐性遺伝子（遺伝子導入細胞の特定や安定的遺伝子導入細胞の選択に利用）を共発現し、誘

導プロモーターで操作して、ノックダウン表現型のオンとオフを切り替えることができます（pSuperior、OligoEngineなど）。DNAを初代細胞（そして他の手段による遺伝子導入が難しいか不可能な数多くの細胞株）に遺伝子導入するNucleofector™テクノロジーによって、これらのベクターを実際にどんな細胞型でも使用することが現在可能となっています。ただし、遺伝子導入効率は、一般的にDNAプラスミドよりもsiRNAオリゴヌクレオチドを用いた場合の方が良好です。

■ Nucleofector™溶液における二本鎖siRNAの安定性

Nucleofector™溶液はRNAse活性試験済みです。溶液中のRNAを2時間、37℃でインキュベートしたところ、RNAの安定性には影響がみられませんでした。詳細については、ロンザの技術サポートチームまでお問い合わせください。

■ 参考文献

1. Persengiev SP, et al. RNA. 2004 Jan;10(1):12-8
2. Ross J, 1995, Microbiol Rev 59:423-50
3. Editorial [2003] Wither RNAi. Nat Cell Biol. 5 (6), 489-490.
4. Wu et al. [2005] MCB 25(22):9741-9752
5. Lindvall JM et al. [2005] Immunol Rev 203, 200-215.
6. Schoenemeyer A et al. [2005] J Biol Chem 280, 17005-17012.
7. Short SM et al. [2005] J Cell Biol 168, 643-653.