

siRNA を哺乳動物培養細胞に導入する方法

任意の遺伝子に対して siRNA による遺伝子ノックダウンの効果を観察するには、siRNA 導入用試薬を用いて哺乳動物培養細胞に合成 siRNA を直接導入するのが最も手軽な方法である。トランスフェクション時に用いる試薬としては、タカラバイオから *TransIT*-TKO が発売されており、導入効率が高く、操作も簡便であるため、すぐに siRNA の効果を確認することができる。さらに、関連遺伝子を強制発現する場合やレポータープラスミドを同時に導入する場合のコトランスフェクション系の導入試薬とプロトコルも充実しているので、コトランスフェクション系の実験も非常に簡単にかつ正確に行うことができる。(siRNA の合成受託サービスは 2016 年 3 月をもちまして終了しました。)

準備するもの

- ・ 哺乳動物培養細胞と細胞培養関連器具・培地
- ・ マルチウェルプレート
- ・ 無血清培地
- ・ RNase free 緩衝液 [100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5)] に溶解した 2 本鎖 siRNA
- ・ *TransIT*-TKO (Mirus Bio 社製)

実験手順：詳細な手順はプロトコル参照

- (1) あらかじめ前日 (トランスフェクションの 18 時間程度前) に細胞 (1.9 cm²あたり 50,000 細胞以下) をプレートに播種し、通常の血清入り完全培地でインキュベートしておく。
- (2) 無血清培地に *TransIT*-TKO を添加してよく混和する。(Mixture)
- (3) 室温で 5~20 分間インキュベートする。
- (4) 1 μ M に希釈した siRNA を Mixture に添加してよく混和する。
- (5) 室温で 5~20 分間インキュベートする。
- (6) siRNA を含む Mixture を細胞に添加する。
- (7) 4~72 時間後に細胞を回収して効果を確認する。

実験例：siRNA 導入効率の定量的な測定

ここでは、*TransIT-TK0* の siRNA 導入効率の高さを示すために、FITC 標識した合成 siRNA を用いた導入効率の評価試験を紹介する。FITC 標識した合成 siRNA を *TransIT-TK0* のプロトコールに沿って HEK-293 細胞・HeLa 細胞に導入した。24 時間後にフローサイトメトリーを用いて標識 siRNA が導入された細胞数から導入効率を測定した。なお比較対照として、他社試薬の導入効率も併せて測定した。

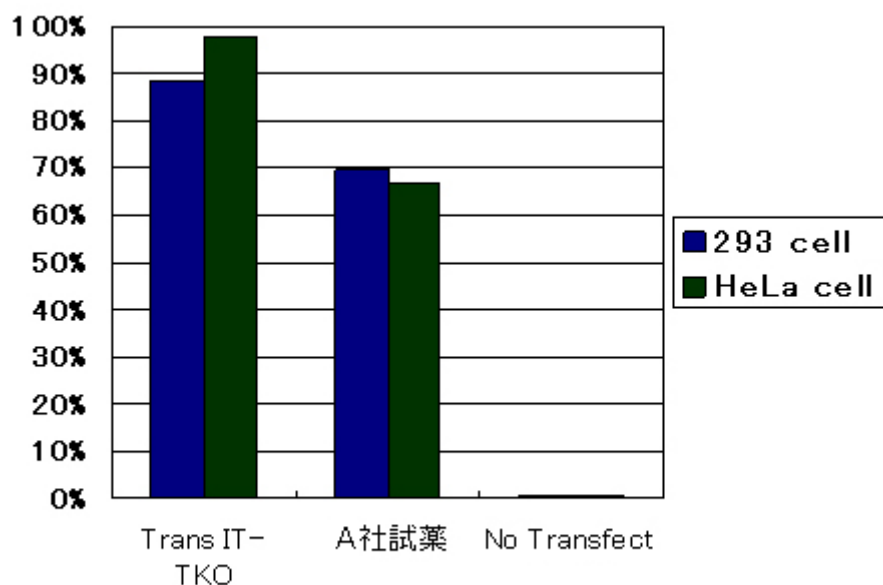


図1 各導入試薬を用いた場合の導入効率

図1に示すように、*TransIT-TK0* を用いた場合、HEK-293 細胞・HeLa 細胞に対してともに高効率の導入が得られた。

トランスフェクション条件の検討方法

実際の研究においては、実験に応じて様々な細胞に siRNA を導入する必要があるが、細胞種によっては、siRNA の導入効率が悪い、あるいは細胞毒性が強く表現型の観察が困難である場合がある。このような場合、通常はトランスフェクション条件を細胞に応じて至適化することにより改善されることが多い。具体的な至適化の検討項目は表 1 に示すが、特に試薬量と播種する細胞数の 2 点が重要である。精度の高い実験を効率よく行うためにも、新たな細胞種を用いて実験するときには、まずは以下の実験例のように試薬量と細胞数の 2 点をふり、条件検討することが望ましい。

表 1 トランスフェクション時のトラブルとその対処法

症状	原因	対処法
細胞毒性が強い	試薬量が多すぎる	試薬量を減らす 途中で培地の交換を行う
	細胞数が少ない	播種細胞数を増やす
	ノックダウンの対象が必須遺伝子	negative control でも同様に毒性があるかを検討する
導入効率が悪い	試薬量が少ない	試薬量を増やす
	細胞数が多すぎる	播種細胞数を減らす
	siRNA の利きが悪い	siRNA 濃度を増やす
	siRNA の純度が悪い	siRNA の純度を上げる

実験例：24-well plate を用いた条件検討

24-well plate の各 well に対して図 2 (A) に示すように様々な細胞数・試薬量となるよう条件を設定した。

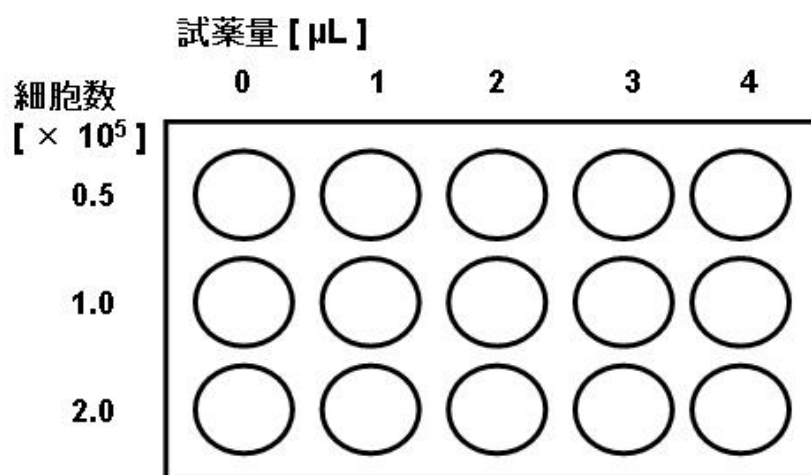


図 2 (A) 試薬量と細胞数： ウェルごとの条件

この条件に従い HEK-293 細胞に対して、*TransIT*-TKO を用いて FITC 標識した siRNA を Transfection した。24 時間後に細胞毒性の評価を Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて (図 2 (B))、導入効率をフローサイトメトリーを用いて測定した (図 2 (C))。その結果、細胞数が増え、または試薬量が減るほど生存細胞数は増加するが、導入効率は逆に細胞数が少なく試薬量が多いほど高い、ということが明らかになった。つまり、このような検討結果から実験目的に応じた条件設定を行えばよい。

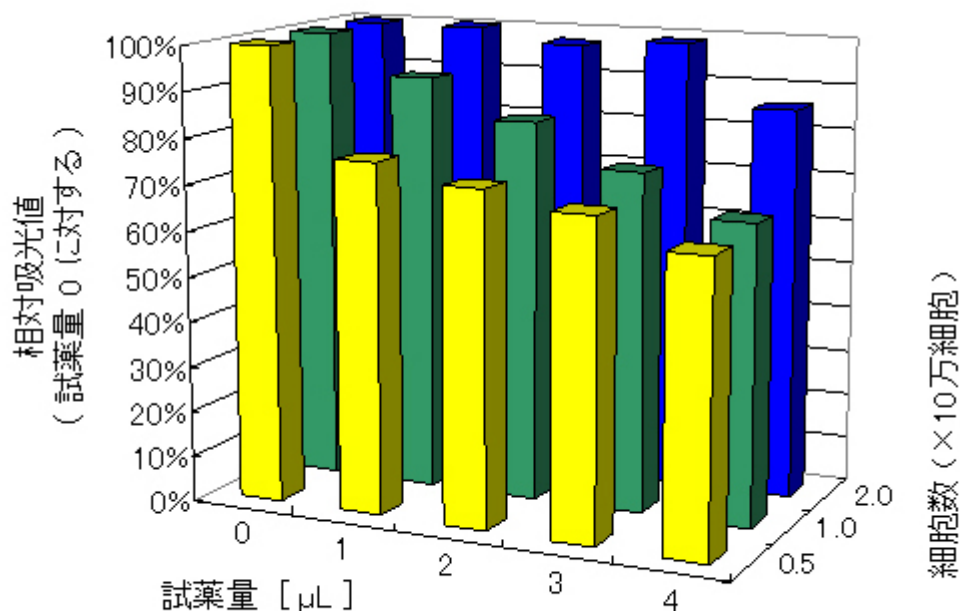


図 2 (B) 条件を変化させた時の生細胞数 (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System 使用)

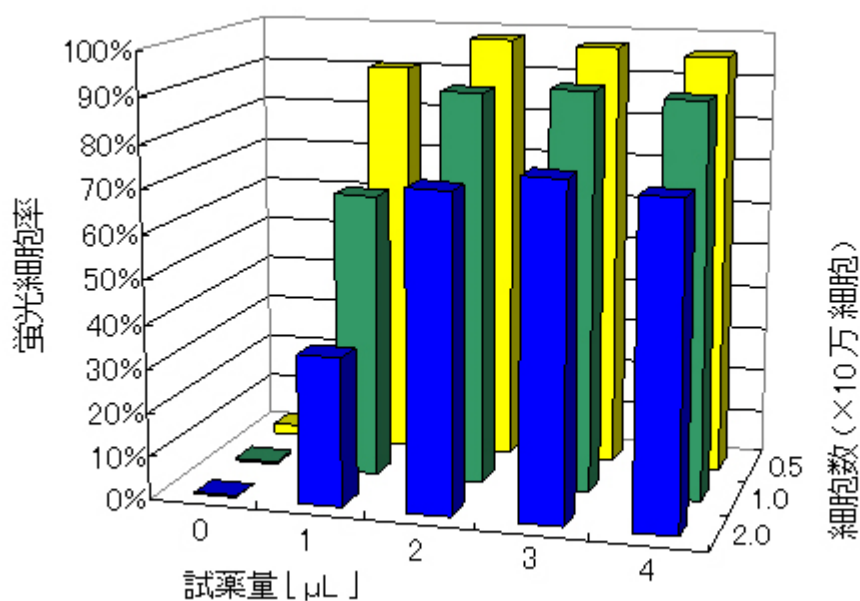


図 2 (C) 条件を変化させた時の導入効率

関連製品

[TransIT-TK0 \(製品コード MIR2150\)](#)

[Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System \(製品コード MK400\)](#)