

Accell siRNA 導入プロトコル

Accell siRNA は、トランスフェクション試薬を使わずに細胞に導入するための独自の化学修飾をもち、遺伝子発現プロファイルへの影響を最小としながら従来のsiRNAより高い濃度で機能します。

Accell siRNA では、専用培地Accell siRNA delivery media と共に使うことで、導入条件の至適化は通常ほとんど必要ありません。

以下は哺乳動物細胞でAccell siRNA を使用する際の一般的なプロトコルです。このプロトコルは、96ウェルプレートフォーマットで接着細胞を用いることを前提にしていますが、その他のプレートフォーマットや細胞株にも適用可能です。

実験では、下記のサンプルを各3組ずつ (n=3) 含めることをおすすめします。

1. 未処理の細胞 (Accell siRNA delivery mediaあるいは他の無血清培地のみで培養した細胞。よくある質問を参照ください。)
2. Accell positive control 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)
3. Accell Non-targeting siRNA control
4. お客様のターゲット遺伝子に対するAccell siRNA

注) Accell positive control siRNAおよびAccell Non-targeting siRNA control は、ターゲット遺伝子に対するAccell siRNAと同じフォーマットの製品を使用してください。

全ての計算値は、2つの96ウェルプレートにおいて3つのサンプル (2つの各プレートについて、1サンプルあたり3ウェル) を使用する際の値を示しています。ピペティング操作でのロスを考慮して、すべての量は1.25倍としています。

関連製品情報

製品	サイズ	製品番号
Accell siRNA Delivery Media	100 mL 500 mL	B-005000-100 B-005000-500
5X siRNA Buffer	100 mL	B-002000-UB-100
Molecular Grade RNase-free water	100 mL	B-003000-WB-100

接着細胞への導入プロトコル

全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。

最適な細胞密度は細胞の増殖特性により異なります。Accell siRNA を用いてノックダウン実験を行う前に、Accell siRNA delivery media を用いて、お使いの細胞株の増殖特性を調べることをおすすめします。

1. トリプシン処理後、細胞を数えます。
2. 15-75% (細胞の増殖速度や最終的にどのようなアッセイをするかによって決めます) の細胞密度となるまで細胞を培地で希釈します。
3. 96 ウェルプレートの各ウェルに、適当な密度で100 μ L の細胞をまきます。
4. 37°C、二酸化炭素5%にて細胞を一昼夜培養します。
5. 5X siRNA buffer (1 容量) と滅菌済みRNase フリー水 (4 容量) を混合することにより、1X siRNA bufferを調製します。
6. 1X siRNA buffer または他の適切なRNase フリーバッファーを用いて、100 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。
 - a. siRNAを含むチューブを短時間遠心し、siRNAペレットを底に集めた後、適当量の1X siRNA BufferあるいはRNase-free溶液を用いてsiRNAを再溶解します。
 - b. ピペットを用いて溶液をチップに3~5回出し入れします。泡立ないように注意してください。
 - c. オービタルシェーカー (ミキサー) を使用して、溶液を37°C (推奨) あるいは室温で70~90分間混合します。
 - d. siRNAを含むチューブを短時間遠心し、チューブの底に溶液が集まるようにします。
7. 別のチューブ (あるいはディープウェルプレートのウェル) 内で、7.5 μ L の100 μ M siRNA 溶液と、750 μ L の Accell siRNA delivery media を混合しdelivery mix を調製します。このdelivery mix はすぐに使用可能です。Accell siRNA の終濃度は、96 ウェルプレートのウェルにおいて1 μ M となります (無血清培地での生育が困難な細胞を用いる場合は、改変プロトコル1 をご覧ください) 。
8. 細胞から培地を取り除き、100 μ L のdelivery mix (Accell siRNA とAccell siRNA delivery media の混合液)を各ウェルに加えます。
9. 37°C、二酸化炭素5%にて細胞を72時間培養します。
10. ターゲット遺伝子のmRNA あるいはタンパク質のノックダウンを確認します (ノックダウンが検出されるまでに96時間以上の長時間を要する場合は、改変プロトコル2 をご覧ください) 。

浮遊細胞への導入プロトコル

全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。

以下は、96 ウェルプレートフォーマットにおいて、サスペンション状態で増殖する細胞にAccell siRNAを導入するためのプロトコルです。最適な細胞密度は、細胞の増殖特性により異なります。Accell siRNAを用いてノックダウン実験を行う前に、Accell siRNA delivery mediaを用いて、お使いの細胞株の増殖特性を調べをおすすめします。

- 5X siRNA buffer (1 容量) と滅菌済みRNase フリー水 (4 容量) を混合することにより、1X siRNA bufferを調製します。
- 1X siRNA buffer または他の適切なRNase フリーバッファーを用いて、100 μM 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。
 - siRNAを含むチューブを短時間遠心し、siRNAペレットを底に集めた後、適量の1X siRNA BufferあるいはRNase-free溶液を用いてsiRNAを再溶解します。
 - ピペットを用いて溶液をチップに3~5回出し入れします。泡立てないように注意してください。
 - オービタルシェーカー (ミキサー) を使用して、溶液を37 $^{\circ}\text{C}$ (推奨) あるいは室温で70~90分間混合します。
 - siRNAを含むチューブを短時間遠心し、チューブの底に溶液が集まるようにします。
- 別のチューブ (またはディープウェルプレートのウェル) に、7.5 μL の100 μM siRNA 溶液を加えます。
- 一般的な細胞培養プロトコルに従い、フラスコ中の浮遊細胞の数を測定します。
- 遠心により細胞をスピンドウンし、培地を取り除きます。
注) 全血からの調製物については、1x PBSまたはAccell siRNA delivery mediaにより2-3回リンスし、残存する血漿因子や、分離操作過程で混入した残留物 (Ficoll など) を除去する操作が必要となる場合があります。
- 適量のAccell siRNA delivery mediaにより細胞を再懸濁します。その量は、96ウェルプレートの各ウェルあたりに必要とされる細胞の最終的な数によって決めます (無血清培地での生育が困難な細胞を用いる場合は、改変プロトコル1 をご覧ください)。

- 細胞とAccell siRNA delivery media の混合液750 μL を、チューブあるいはディープウェル中のsiRNAに加えます。Accell siRNA の終濃度は、96 ウェルプレートのウェルにおいて1 μM となります。
- 穏やかに混合した後、細胞とAccell siRNA delivery media と Accell siRNA の混合液100 μL を96 ウェルプレートの各ウェルに加えます。
- 37 $^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素5%にて細胞を72時間培養します。
- ターゲット遺伝子のmRNA あるいはタンパク質のノックダウンを確認します (ノックダウンが検出されるまでに96時間以上の長時間を要する場合には、改変プロトコル2 をご覧ください)。

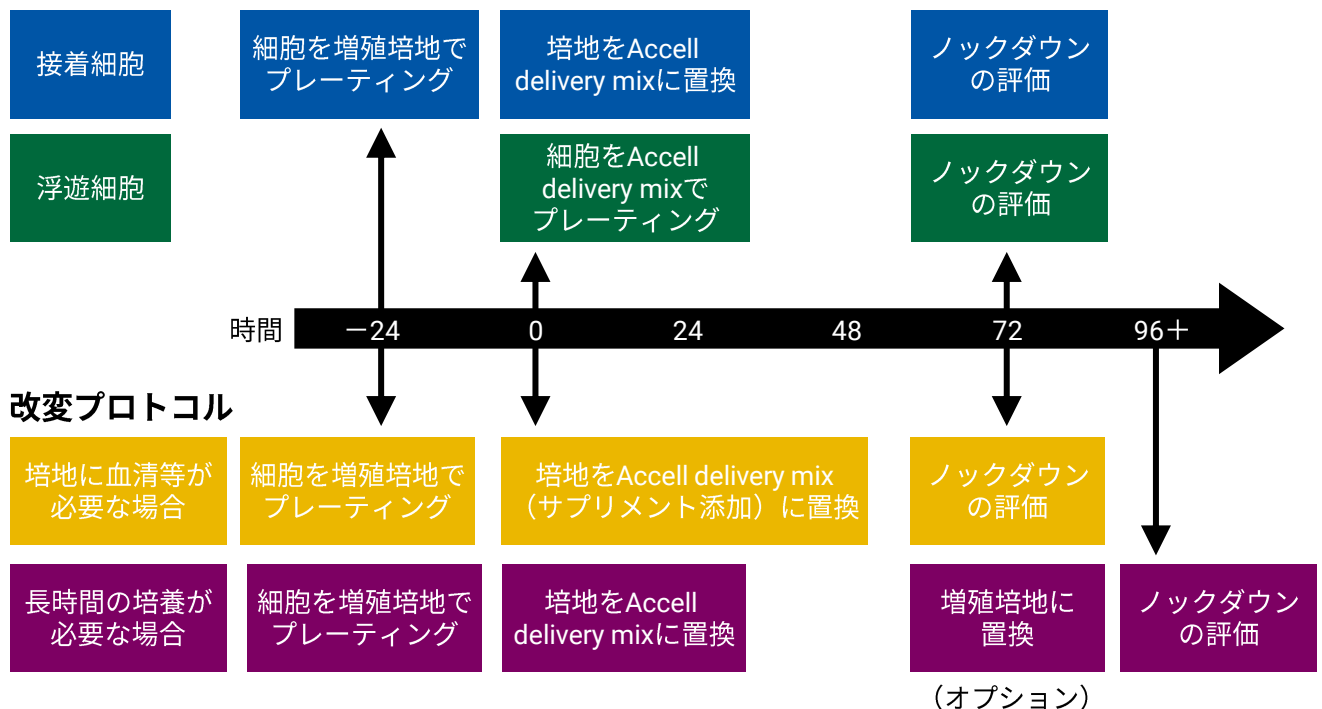
改変プロトコル1

細胞株の種類により必要な場合や、続くアッセイに必要な場合には、0-2.5%程度の血清あるいは無血清のサプリメント (成長因子など) をAccell delivery mix に添加してください。Accell siRNA添加から48時間後に早めに増殖培地を追加することも検討してください。
(最終頁の表に確認済みサプリメント等の情報があります。)

改変プロトコル2

アッセイにおいて長時間の培養が必要となる場合 (例えば長期間安定なタンパク質のノックダウンを検出する場合など) には、Accell siRNAを用いた通常の72時間の培養の後、細胞をAccell siRNA を含まない通常の増殖培地に戻し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、二酸化炭素5%にて24時間さらに培養することができます (その後、ノックダウン効率などのアッセイを行います)。細胞がAccell siRNAを用いた培養条件に耐性である場合は、途中で培地を交換せずに連続して96時間培養することもできます。

Accell siRNA導入標準プロトコル



よくある質問 (FAQ)

質問	回答
Accell siRNA を細胞に導入するとき、Accell siRNA delivery mediaの代わりに他の培地は使用できますか？	Accell siRNA delivery media以外の培地の使用は推奨していません。Accell siRNAの導入に影響する可能性があります。ただし、細胞株によっては、他の無血清培地や、0-2.5%の低濃度の血清を含む培地中、あるいは、下の表に記載のサプリメントの存在下で、効率をほとんど落とすことなくAccell siRNAを導入することができます。
細胞培養に必要なサプリメントをAccell siRNA delivery mediaに加えることはできますか？	多くの無血清培地用サプリメントは、ノックダウンに悪影響を及ぼすことなくAccell siRNA delivery mediaに添加できます。ただし、実験条件を検討する必要があります。例えば、初代神経細胞にGibco B-27 serum-free neuronal supplementを用いた成功例があります。下の表に、Accell siRNAを用いて評価したサプリメントや培地を記載しています。
培養に血清が必要な細胞を用いる場合、Accell siRNA delivery mediaに血清を添加することはできますか？	0-2.5%の血清をAccell siRNA delivery mediaに添加することができます。実験条件の検討を行ってください。血清の添加によりノックダウン効率への影響を最小限に抑え、細胞の生存率を向上できる可能性があります。
Accell siRNAの導入において細胞密度を検討する必要はありますか？	本プロトコルにより、多くの細胞株についてさまざまな細胞密度で良好な結果が得られます。お使いの細胞および導入後のアッセイに最適な細胞密度で実験を行なうことが重要です。導入条件を検討する場合は、細胞密度を変えてノックダウンの程度を評価してください。
Delivery mix (Accell siRNAとAccell siRNA delivery mediaの混合液)を用いて、何時間培養すればいいですか？	細胞はdelivery mix中で培地を交換せずに少なくとも48時間培養してください。最大のノックダウン効率を得るために、72時間の培養をおすすめします。
Accell siRNAの濃度を1 μM以下にしても効果はありますか？	濃度依存性 (1 μM、500 nM、200 nM) の評価により効率を確認することができます。推奨開始濃度は1 μMです。トランスフェクション試薬を使わないため、この濃度での毒性とオフターゲット効果は最小に抑えられます。
Accell delivery mix (Accell siRNAとAccell siRNA delivery mediaの混合液)はどのくらいの期間安定ですか？	4°Cで適切に保存した場合、90日間安定です。

Accell siRNA導入時に評価したプレートコーティング・培地・サプリメント

プレートコーティング	細胞株	コメント
Gelatin	Mouse ESD3 (embryonic stem cells)	ノックダウン効果への影響なし
Poly-L-lysine	HeLa, SH-SY5Y, MCF-7	ノックダウン効果への影響なし
0.001% Fibronectin	HeLa	ノックダウン効果への影響多少あり
0.001% Fibronectin	HUASMC	ノックダウン効果への影響かなりあり
0.001% Fibronectin	HUVEC	ノックダウン効果への影響なし
培地・培地用サプリメント		
Hyclone™ Cell Boost 1	HeLa, SH-SY5Y	ノックダウン効果への影響なし
Hyclone™ Cell Boost 2	HeLa, SH-SY5Y	ノックダウン効果への影響なし
Hyclone™ Cell Boost 3	HeLa, SH-SY5Y	ノックダウン効果への影響なし
Hyclone™ Cell Boost 4	HeLa, SH-SY5Y	ノックダウン効果への影響なし
HUVEC complete media (2%血清を含む)	HUVEC	ノックダウン効果への影響なし
Astrocyte basal media (ABM; 血清不含有)	NHA (normal human astrocytes)	ノックダウン効果への影響なし
2.5%の濃度までの血清*	MCF-7, SH-SY5Y, NIH/3T3	ノックダウン効果への影響は極わずか。細胞生存率が向上
Neurobasal™ media 血清不含有, Gibco™ B27添加	ラット初代培養神経細胞	お客様からの情報：ノックダウン効果への影響なし。細胞生存率が向上
Gibco™ B27 neuronal supplement	マウス脳切片	お客様からの情報：ノックダウン効果への影響なし。細胞生存率が向上

*Accell siRNAの導入効率を高めるため、血清の濃度は最低限に抑えることをおすすめします。

各Accell siRNA製品は、以下の1つ以上の特許によってカバーされています。

S8252755、US8501706、US8188060、およびUS8415466

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
horizondiscovery.com/contact-us

©2023 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved. Revvity is a trademark of Revvity, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc. All Revvity, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコル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。

B032-2006-v4

horizon