

Условия эксперимента по доставке siRNA для нокдауна экспрессии белков

Дизайн siRNA

Дизайн мРНК проводили в программе BLOCK-IT (rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/) с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей нуклеиновых кислот Vector NTI (Thermo). Из подобранных РНК выбирали последовательности с максимальным рейтингом, и количество GC-пар от 35 до 55%. В качестве контроля использовали siRNA к GFP со следующими последовательностями:

- GFP_siRNA_for 5'-GACCCGCGCCGAGGUGAAGdTdT-3'
- GFP_siRNA_rev 5'-CUUCACCUCGGCGCGGGUCdTdT-3'

siRNA для таргетных генов синтезировали в компании «ДНК-синтез» в концентрации 4 ОЕ и условием дополнительной очистки.

Таблица 1. Последовательности siRNA для генов *Bax*, *Bak* и *Bim*

Название	Прямая последовательность
siBax1	5'-CCAAGAAGCUGAGCGAGUGUCUCAAAdTdT-3'
siBak1	5'-UGGUGGUUCUGGGUGUGGUUCUGUU-3'
siBim1	5'-A CCG AGA AGG UAG ACA AUUdTdT-3'

Трансфекция

Клетки Hela сажали в 6-луночные планшеты и дорастивали до 70% конфлюентности. Для культивирования была использована среда DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Gibco), 584 г/л сухого L-глутамина и гентамицина в конечной концентрации 10 мг/мл. В день трансфекции среду меняли на Optimem (Thermo) с добавлением 5% FCS (Gibco).

В двух пробирках собирали siRNA со средой Optimem (эппендорф №1) и трансфекционный агент со средой Optimem (эппендорф №2) (Таблица 2). По каплям добавляли трансфекционный агент к siRNA, смесь siRNA и агента инкубировали 15 минут при комнатной температуре, после чего по каплям добавляли ее к клеткам. Через 4 часа половину среды с трансфекционными комплексами заменяли на стандартную среду для клеток, через 12 часов меняли всю среду на полную DMEM с 10% FCS. Эффективность нокдауна оценивали на 48 часов после начала эксперимента.

Таблица 2. Подбор оптимального соотношения siRNA и трансфецирующего агента на примере *Metafecten*. **Жирным** шрифтом выделена оптимальная концентрация для 6-луночного планшета. Данная концентрация реагента и siRNA использовалась для всех протестированных реагентов.

	эппендорф №1		эппендорф №2	
	siRNA (100пкмоль/мкл)	Optimem	Трансф. агент	Optimem
1	0,16 мкл	40 мкл	0,8 мкл	40 мкл
2	0,32 мкл	80 мкл	1,6 мкл	80 мкл
3	0,8 мкл	200 мкл	4 мкл	0,2 мл

4	0,9 мкл	230 мкл	4,7 мкл	230 мкл
5	2 мкл	0,5 мл	10 мкл	0,5 мл
6	6 мкл	1,3 мл	30 мкл	1,3 мл

Результаты

Снижение уровня экспрессии доказывали на уровне мРНК (ПЦР в реальном времени). Каждое измерение проводили в трипликате. Данные ПЦР в реальном времени нормализовали по 2 генам (GAPDH и HPRT1), относительное нормализованное количество кДНК рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$. Для каждого si ставили 2 биологических повтора.

Также проводили анализ экспрессии белков методом иммуноблоттинга.

RT PCR

Metafecten	control Bax	siBax	siScrambled	
		6.774	1.000	3.495
		5.196	1.274	3.790
	среднее	5.985	1.137	3.642
	control Bak	siBak	siScrambled	
		8.582	0.174	6.058
		7.514	0.126	5.191
	среднее	8.048	0.150	5.625
	control Bim	siBim	siScrambled	
		7.707	0.669	5.189
		5.646	0.830	8.269
	среднее	6.677	0.750	6.729
G40 2203312p	control Bax	siBax	siScrambled	
		8.397	1.00	7.192
		5.177	0.46	5.076
		6.787	0.729	6.134
	control Bak	siBak	siScrambled	
		2.863	0.914	4.803
		3.138	1.004	3.741
		3.000	0.959	4.272
	control Bim	siBim	siScrambled	
		1.420	0.265	2.104
		1.259	0.337	1.328
		1.340	0.301	1.716
G40e 2204182e	control Bax	siBax	siScrambled	
		4.113	0.233	5.281
		6.614	0.781	5.022
		5.364	0.507	5.151

control Bak	siBak	siScrambled
3.514	1.298	6.557
4.662	0.978	5.563
4.088	1.138	6.060

control Bim	siBim	siScrambled
4.073	0.575	4.424
2.027	0.244	3.668
3.050	0.409	4.046

Иммуноблоттинг

Лизис клеток через 48 ч после трансфекции siRNA

Белки проявляли антителами:

- Антитело к альфа тубулину anti alpha tubulin ab15246, abcam;
- Антитело к Bim (C34C5) Rabbit 2933S, разведение 1:1000
- Второе антитело anti-rabbit hrp-linked, 7074v cell signaling