

ユーザーインストラクション: LNP-mRNA (in vitro用)

脂質ナノ粒子(LNP)は、新たに治療薬として登場したメッセンジャーRNA (mRNA)を導入するための有望な輸送媒体です。市販のトランスフェクション試薬で送達されるIVT mRNAと比較して、LNPカプセル化mRNA (LNPmRNA)は in vitroでより高い遺伝子発現レベルを示す可能性があります(図1)。

保存と取り扱い

1. LNP-mRNA製剤の長期安定性は、保存条件に影響を受けます。当社製品はスクロース(凍結保護剤)を添加し、ドライアイス出荷しております。受け取り後は-80°Cで保存してください。
2. 凍結融解の繰り返しは避けてください。融解したLNP-mRNAを室温で保管できるのは1時間までです。
3. RNAの取扱いは決められたエリアで行うことをお勧めします。
4. 作業前にRNase不活化剤で実験台やピペットマンを除染してください。
5. RNAを取り扱う際は、常にきれいな手袋とRNaseフリーのチップ、チューブ、試薬を使用してください。

トランスフェクション用細胞の準備

一般的に細胞はトランスフェクションの前日にプレートにまきます。一般的なガイドラインでは、目的の細胞はトランスフェクション時に40~80%コンフルエントになるようにします。表1に推奨される細胞播種密度を示します。

表1. 培養器により推奨される細胞の播種密度

培養器	表面積 (cm ²)*	1ウェルごとの接着細胞数**	1ウェルごとの浮遊細胞数**
96-ウェルプレート	0.32	7.5×10 ³ - 2.5×10 ⁴	2.5×10 ⁴
24-ウェルプレート	1.9	4.0×10 ⁴ - 1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵
12-ウェルプレート	3.8	8.0×10 ⁴ - 1.5×10 ⁵	1.5×10 ⁵
6-ウェルプレート/35 mmディッシュ	9.5/9	1.5×10 ⁵ - 4.0×10 ⁵	4.0×10 ⁵
60 mmディッシュ/フラスコ 25 cm ²	21/25	2.0×10 ⁵ - 8.5×10 ⁵	1.6×10 ⁶
100 mmディッシュ/フラスコ 75 cm ²	55/75	1.0×10 ⁶ - 4.0×10 ⁶	4.0×10 ⁶

注意:

* 表面積のサイズはコーニングのディスポーザブル培養器に基づいています。

** 目的の細胞の大きさや増殖時間によって調整してください。

融解手順

1. LNP-mRNA は冷蔵庫(2°C~8°C)または氷上で解凍してください。溶解した LNP-mRNA は無色からわずかに白色です。
2. LNP-mRNA が溶けたら、バイアルを静かに数回転倒させて下さい。振とうしたり、ボルテックスをかけたりしないでください。
3. LNP-mRNAは氷上に立て、各ウェルの細胞に添加する際にLNP-mRNAの濃度が均一になるように、ステップ2を毎回繰り返してください。

希釈手順

1. 通常、LNP-mRNA製品の標準濃度は200ug/mlであるため、希釈する必要はありません。12ウェルプレートで増殖させた60~80%コンフルエントの細胞にLNP-mRNAを導入する場合、1ウェルあたりの推奨量は0.5~1ugです。
2. 希釈が必要な場合は、LNP-mRNA を別の培養皿または滅菌遠心チューブに入れ、完全培地で希釈してください。
3. 細胞処理に先立ち、ディッシュを静かに振るかチューブを数回転倒させ、希釈液を毎回適切に混合します。振とうやボルテックスは避けてください。

細胞へのトランスフェクション例

次に示すのは293T細胞にEGFP IVT-mRNA または LNP-mRNA をトランスフェクションするプロトコールの一例です(図1)。プロトコールで使用しているIVT-mRNA、LNP-mRNA、トランスフェクション試薬の量は、12ウェルプレートでの1ウェルあたりの量を示しています。それぞれの実験設定に基づいた条件検討(最適化)を行うことを強くお勧めします。

1. 12-ウェルプレートに細胞を1ウェル当たり 1.0×10^5 細胞ずつまきます。
2. トランスフェクション当日に培養メEDIUMを替えます*。(以降、IVT mRNAの場合は3~5、LNP-mRNAは6へ)
3. EGFP IVT mRNA 1 ugをトランスフェクションバッファー 100 ul ので希釈します。
4. トランスフェクション試薬をボルテックスまたは転倒混和で5秒間混合します。
5. トランスフェクション試薬 2 ul を mRNA/トランスフェクションバッファー(3. で作製したもの)に添加し、ピペティングで混和します。(トランスフェクションマスターミックス)
6. LNP-mRNA を解凍し、混和させます(融解手順参照)。
7. トランスフェクションマスターミックスまたは必要量のLNP-mRNA(希釈手順参照)を培養液中に添加します **。
8. プレートを軽く揺らし、マスターミックスまたはLNP-mRNAが拡散するようにします。
9. 6~72 時間後にEGFP発現を確認します***。

注意:

*トランスフェクション試薬のマニュアルを参照し、血清や抗生物質存在下で使用できることを確認してください。

**LNP-mRNA は培養中の細胞の培養液に直接添加できますが、細胞に添加する前に培養液と先に混合することも可能です。

***IVT mRNA (in vitro 発現用) はトランスフェクション後早くも6時間から検出可能で、タンパク質の発現は一過性です。タンパク質の発現のピークは細胞の種類やmRNA修飾によって異なるため、注意が必要です。48-72 時間後に強いタンパク質発現が検出されないこともございます。よって、実験ごとに幅広い時間帯で遺伝子発現を注意深く観察することをお勧めします。

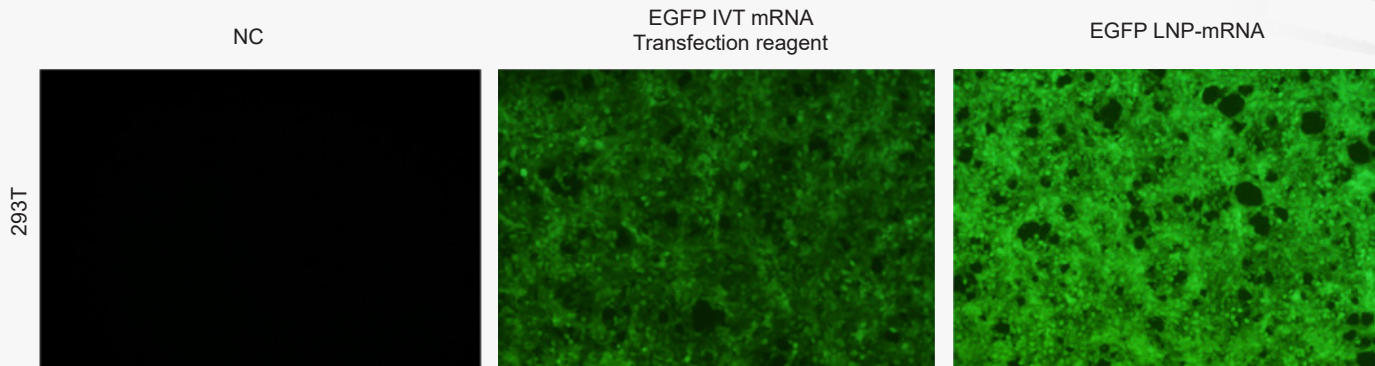


図 1. EGFP mRNAの細胞での発現レベルの比較。1 μ g のEGFP mRNAを約60%コンフルエントの293T細胞にトランスフェクションし、24時間後に撮影した蛍光画像。LNP-カプセル化mRNA (右図) は市販のトランスフェクション試薬を用いて導入したEGFP mRNA (中図) よりも高い発現レベルを示していた。