

## НОКДАУН ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Ю. В. Вяхирева<sup>1</sup>, А. Ю. Филатова<sup>1</sup>, И. А. Кривошеева<sup>1</sup>, М. Ю. Скоблов<sup>1,2,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Лаборатория функциональной геномики,  
Медико-генетический научный центр, Москва

<sup>2</sup> Лаборатория медицинских генетических технологий, отдел фундаментальных исследований НИМСИ,  
Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва

<sup>3</sup> Лаборатория функционального анализа генома,  
Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

РНК-интерференция активно используется для решения различных исследовательских задач в биологии и медицине, в частности, для исследования функции генов. Один из распространенных подходов — нокдаун генов с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК). Однако единого протокола для этого метода не существует, и данные, получаемые при использовании различных его вариаций, часто обладают низкой воспроизводимостью. В работе обсуждаются теоретические основы указанного метода и приводятся практические рекомендации для постановки экспериментов по нокдауну генов с siРНК.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, нокдаун, экспрессия генов

✉ **Для корреспонденции:** Скоблов Михаил Юрьевич  
ул. Москворечье, д. 1, Москва, 115478; mskoblov@gmail.com

**Статья получена:** 25.06.2017 **Статья принята к печати:** 28.06.2017

## SIRNA-MEDIATED GENE SILENCING

Vyakhireva JV<sup>1</sup>, Filatova, AYu<sup>1</sup>, Krivosheeva, IA<sup>1</sup>, Skoblov MYu<sup>1,2,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Laboratory of Functional Genomics,  
Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Medical and Genetic Technologies, Department of Basic Research of Research Institute for Medicine and Dentistry,  
Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Laboratory of Functional Analysis of the Genome,  
Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

RNA-interference enjoys a wide range of applications in medical and biological research. In particular, it is used to study functions of genes. One of the most popular approaches to this task is gene knockdown by small interfering RNA (siRNA). Currently there is no unified protocol for this method, which results in low reproducibility of experimental data. In the following article we outline the theoretical bases for this method and provide practical recommendations for its use in siRNA-mediated gene silencing experiments.

**Keywords:** RNA-interference, knockdown, gene expression

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail Skoblov  
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; mskoblov@gmail.com

**Received:** 25.06.2017 **Accepted:** 28.06.2017

В геноме человека насчитывается 19 817 белок-кодирующих генов и 15 787 генов длинных некодирующих РНК [1]. При этом примерно функции 40 % белок-кодирующих генов неизвестны. Длинные некодирующие РНК являются и вовсе неизученными: всего лишь около сотни из них хорошо исследованы экспериментально [2–5]. Одними из самых простых и эффективных подходов к изучению функции генов являются эксперименты по их оверэкспрессии и нокдауну, при которых исследуются вызываемые ими эффекты как на молекулярном, так и на клеточном уровне.

Подходы по оверэкспрессии генов возникли с развитием методов геномной инженерии и молекулярного клонирования. Разработано множество различных способов усилить экспрессию гена, как простых — через создание экс-

прессионных конструкций на основе плазмид, так и сложных — на основе индуцибельных систем, вирусных векторов и др. [6]. Подходы к подавлению экспрессии генов появились позже. Первым инструментом стали антисмысловые олигонуклеотиды [7, 8], которые, однако, сначала не были высокоэффективными. Революцией в молекулярной биологии стало открытие механизма РНК-интерференции — специфического посттранскрипционного подавления экспрессии гена, опосредованного малыми молекулами РНК, так называемыми эндогенными микроРНК (miRNA) и экзогенными малыми интерферирующими РНК (siРНК) [9]. Использование siРНК оказалось настолько простым и эффективным, что за короткое время нокдаун генов с их использованием стал применяться повсеместно — как

в фундаментальных исследованиях по установлению функции генов, так и в прикладных работах по разработке геноспецифических препаратов [10–14].

На сегодняшний день существует две стратегии нокдауна генов с использованием РНК-интерференции: 1) использование siРНК и 2) использование вектора, содержащего последовательность малых шпилечных РНК (shРНК) [15].

Малая интерферирующая РНК — это двуцепочечная молекула РНК длиной 20–25 нуклеотидов с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце каждой цепи. Попадая в клетку, она встраивается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), после чего происходит удаление из комплекса одной из цепей siРНК (цепи-спутницы, passenger strand). Оставшаяся цепь (ведущая, guide strand) связывается по принципу комплементарности со своей РНК-мишенью, и, если комплементарность полная, происходит разрезание целевой РНК, что приводит к деградации мРНК и снижению уровня экспрессии гена [16–18]. Малые шпилечные РНК — это короткие молекулы РНК, образующие шпилечную структуру. Стебель такой шпильки имеет длину 19–22 пар нуклеотидов, а петля — 4–11 нуклеотидов. shРНК является предшественником siРНК в клетке. Последовательность shРНК доставляется в клетки в составе экспрессионного бактериального или вирусного вектора.

По сравнению с siРНК shРНК имеют ряд преимуществ: более продолжительное воздействие на экспрессию гена-мишени; возможность интеграции вектора в геном и получение клеток, стабильно экспрессирующих shРНК; возможность создания индуцибельных систем нокдауна; возможность одновременной экспрессии с репортерным геном для контроля эффективности трансфекции и отбора трансфицированных клеток. С другой стороны, использование shРНК требует больших трудозатрат. Поэтому если по условиям эксперимента достаточно краткосрочного (5–7 дней) [19] снижения уровня экспрессии исследуемого гена, то следует использовать siРНК.

Однако сам нокдаун с помощью siРНК является многостадийным процессом, выполнение которого занимает около недели. Отсутствие стандартного протокола нокдауна и широкая доступность метода привели к тому, что в настоящее время публикуются данные, полученные в результате применения значительно различающихся методик. Более того, многие исследователи не указывают подробности проведения экспериментов [20–22], что, конечно, приводит к низкой воспроизводимости результатов. Качество работы на каждом этапе нокдауна может существенно влиять на результаты. Например, в статьях достаточно редко указывают эффективность трансфекции siРНК, а от этого зависит эффективность нокдауна и проявление последующих эффектов. В эксперименте большое значение имеют и количество трансфицируемых клеток, и уровень экспрессии целевого гена, не говоря уже о техниках выполнения базовых операций — выделении РНК, проведении реакции обратной транскрипции, проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» и др., выполняемых в разных лабораториях по-разному.

В данной работе рассматривается вся схема проведения нокдауна с помощью siРНК (рис. 1). Обсуждаются потенциальные сложности каждого этапа и пути их преодоления. Приводится пример методики, которая используется в лаборатории функциональной геномики Медико-генетического научного центра (Москва). Важно отметить, что для каждого этапа приведены контроли, которые не-

обходимы для оценки правильности выполнения методик. Мы надеемся, что данная методика станет опорой в постановке нокдауна новых, неизученных генов как для студента, так и для научного сотрудника, и приведет к получению качественных результатов для публикации в высоко цитируемых журналах.

## I. Дизайн эксперимента

### 1. Корректная постановка задачи

Перед началом работы по нокдауну интересующего гена в клеточной культуре необходимо проанализировать литературу и доступные в интернете баз данных, чтобы выбрать биологическую модель для исследования и определить нуклеотидную последовательность изучаемого гена.

*Подходящая биологическая модель.* Необходимо оценить уровень экспрессии исследуемого гена в предполагаемых клеточных культурах. Информацию об экспрессии генов в различных тканях и клеточных линиях можно найти



Рис. 1. Схема эксперимента по нокдауну

в таких базах данных, как FANTOM5, GTExPortal, BioGPS, Human Protein Atlas; данные RNA-seq — в геномном браузере UCSC. По возможности следует выбирать клеточную модель с достаточно высокой экспрессией исследуемого гена, т. к. нокдаун генов, изначально экспрессирующихся на очень низком уровне, может быть неэффективен. Кроме того, необходимо предварительно экспериментально оценить уровень экспрессии исследуемого гена в реально используемой биологической модели при помощи ПЦР в режиме «реального времени».

**Анализ последовательности гена.** siRNA должна взаимодействовать с уникальным участком гена. Поэтому перед тем, как осуществлять дизайн siRNA, необходимо понять, насколько последовательность мРНК анализируемого гена подходит для специфичного нокдауна. В этом вопросе могут помочь широко распространенные инструменты анализа нуклеотидных последовательностей, такие как BLAST и геномные браузеры (например, UCSC). С их помощью следует определить, имеет ли данный ген псевдогены или высокоомологичные паралоги; содержатся ли в последовательности повторы; сколько изоформ существует у этого гена.

2. Дизайн siRNA

При существующих на сегодняшний день подходах дизайн siRNA сводится к выбору оптимального сайта связывания с последовательностью РНК-мишени. Этот сайт связывания соответствует смысловой цепи siRNA. Антисмысловая цепь является комплементарной смысловой, и именно она образует стабильную связь с комплексом RISC. Не существует единого алгоритма для выбора наиболее эффективной последовательности siRNA [23, 24]. Доступные онлайн-программы, основанные на различных принципах подбора (эмпирические правила, данные BLAST, нейросети), могут давать различные результаты при анализе одной и той же последовательности РНК-мишени [16, 23, 25].

После анализа последовательности изучаемого гена программой пользователю выдается список siRNA, из которых необходимо выбрать 3–4 лучших. Ниже приведены основные правила дизайна siRNA.

1. Длина последовательности — 20–25 нуклеотидов (обычно — 21–23 нуклеотида).
2. Содержание G/C-нуклеотидов — 35–55 %.
3. 5'-конец антисмысловой цепи siRNA должен содержать больше A/U-нуклеотидов, т. к. известно, что с комплексом RISC эффективнее связывается та цепь siRNA, которая имеет менее термодинамически стабильный 5'-конец.
4. На 3'-конец каждой цепи siRNA должен быть добавлен неспаренный дезоксидинуклеотид dTdT. Это делается для увеличения стабильности дуплекса и эффективности загрузки siRNA в комплекс RISC.
5. siRNA должна быть специфичной. Это означает, что при анализе последовательности siRNA с помощью BLAST не должны обнаруживаться транскрипты других генов, полностью комплементарные выбранной siRNA.
6. Комплементарность siRNA с другими транскриптами не должна быть больше 16 нуклеотидов подряд.
7. siRNA должна подавлять экспрессию всех изоформ транскриптов выбранного гена, если по условиям эксперимента не стоит другая задача.
8. siRNA не должна иметь в своем составе повторов нуклеотидных мотивов и большого количества одинаковых нуклеотидов, идущих подряд (больше 3).
9. Существует ряд эмпирических правил, соблюдение которых позволяет увеличить эффективность работы siRNA. Например, необходимо стремиться к тому, чтобы последовательность siRNA содержала конкретные нуклеотиды в определенной позиции в соответствии с табл. 1. Более подробно ознакомиться с правилами дизайна siRNA можно в работе Lagana и соавт. [26]. Список некоторых программ по подбору siRNA, доступных на сегодняшний день, представлен в табл. 2.

**Таблица 1.** Правила позиционирования нуклеотидов в составе siRNA. AS — антисмысловая цепь siRNA, S — смысловая цепь siRNA. Серые клетки обозначают позиции нуклеотидов в последовательности siRNA (Lagana и соавт., [26])

AS	3'	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	5'
	G/T			G/C no A	C no A no G	no A			U no G	U no G		U	A			U no C				no C	U	A/U	
		G/C no U		A no C		no C	A/U	no C	U no G		A/U no C	no G		G/C no G	no G		A	no G			A/U no G no C	no C	G/T
S	5'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	3'

**Таблица 2.** Список наиболее известных программ по подбору siRNA

Программа	URL	Ссылка
OptiRNAi 2.0	<a href="http://rna.nci.nih.gov">http://rna.nci.nih.gov</a>	[27]
siDirect 2	<a href="http://sidirect2.rnai.jp">http://sidirect2.rnai.jp</a>	[28]
siRNA Scales	<a href="http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales">http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales</a>	[29]
siExplorer	<a href="http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/cgi/siexplorer.htm">http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/cgi/siexplorer.htm</a>	[30]
RFRCDDB-siRNA	<a href="http://www.bioinf.seu.edu.cn/siRNA/index.htm">http://www.bioinf.seu.edu.cn/siRNA/index.htm</a>	[31]
OligoWalk	<a href="http://rna.umc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi">http://rna.umc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi</a>	[32]
Sfold	<a href="http://sfold.wadsworth.org">http://sfold.wadsworth.org</a>	[33]
DSIR	<a href="http://biodev.cea.fr/DSIR/">http://biodev.cea.fr/DSIR/</a>	[34]
siRNA Scan	<a href="http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm">http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm</a>	[35]
RNAxs	<a href="http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAxs/RNAxs.cgi">http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAxs/RNAxs.cgi</a>	[36]
i-Score	<a href="http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html">http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html</a>	[37]

### 3. Необходимые контроли

*Контроль эффективности доставки siРНК в клетку.* Проводится при помощи неспецифической siРНК, меченной флуоресцентной меткой. Мы используем siРНК, меченную флуоресцентным красителем FAM на 5'-конце каждой цепи siFlu.

*Отрицательный контроль* для оценки специфичности нокдауна и вызываемых им побочных изменений в клетке. Таким контролем является неспецифическая siРНК, не влияющая на экспрессию генов в клетке. Многие фирмы-производители предоставляют готовые к использованию неспецифические siРНК (например, Negative control siRNA от Qiagen, Германия, или Silencer Negative Control от Invitrogen, США). Другим подходом к проведению отрицательного контроля является использование scramble siРНК. Такая siРНК имеет тот же нуклеотидный состав, что и целевая, но другую последовательность. Однако такой подход требует создания в каждом эксперименте нового контроля, для которого необходимо подтверждать отсутствие нецелевого эффекта, что является затруднительным при проведении большого количества экспериментов по нокдауну. Поэтому мы в своей работе используем неспецифическую siРНК, последовательность которой была получена из открытого источника — control siMax siRNAs [38].

*Положительный контроль* позволяет быть уверенным в правильности проведения эксперимента. Положительным контролем служат молекулы siРНК с подтвержденной высокой эффективностью нокдауна (> 70 %) хорошо детектируемых генов. Примером положительного контроля могут являться эффективные siРНК к генам p53, GAPDH, ламинам. Последовательность таких siРНК можно найти в литературе или воспользоваться коммерческими предложениями различных фирм.

*Контроли качества* проведения методик на всех этапах нокдауна: выделения РНК, обработки РНК ДНКазой I, получения кДНК, проведения ПЦР в режиме «реального времени». Постановка данных контролей будет описана в соответствующих разделах статьи.

## II. Доставка siРНК в клетки

Наиболее часто используемыми подходами к доставке siРНК в клетки являются химическая трансфекция и электропорация. Существует ряд методик химической трансфекции, но наиболее распространенной является липофекция — трансфекция с использованием катионных липосом [11, 39–41]. Достоинствами данной методики являются высокая воспроизводимость и простота исполнения при достаточно высокой эффективности. К недостаткам можно отнести то, что липофекция эффективна в отношении делящихся клеток и малоэффективна в отношении неделящихся, поэтому при работе с некоторыми «труднотрансфицируемыми» культурами клеток (медленно делящимися или первичными) ее эффективность может быть недостаточной. В таком случае оптимальной методикой может быть электропорация. Однако к ее минусам можно отнести высокий уровень клеточной гибели и большое количество варьируемых параметров, требующих оптимизации. Таким образом, при проведении эксперимента на наиболее распространенных, «легкотрансфицируемых» клеточных моделях оптимально использовать именно липофекцию. В настоящее время на рынке доступны различные реагенты для липофекции, самыми распространенными из них являются Lipofectamine (Invitrogen) и

Metafectene (Biontech, Германия). В нашей работе используется последний.

Принцип липофекции следующий. Во время инкубации siРНК с липидами в растворе образуются липосомы, внутрь которых попадает siРНК. При смешивании получившегося раствора с клетками происходит присоединение липосом к клеточной мембране и их объединение, в результате чего siРНК оказывается внутри клетки, имея возможность взаимодействовать с мРНК в цитоплазме.

### 1. Оптимизация проведения липофекции с siРНК

Эффективность липофекции зависит от многих параметров, которые могут варьироваться в зависимости от используемой клеточной культуры. Поэтому перед проведением нокдауна необходимо определить оптимальные условия трансфекции для наиболее эффективной доставки siРНК в клетки. Липофекция siРНК может проводиться в различных форматах (в планшетах с 6, 12, 24 или 96 лунками; в чашках диаметром 6 или 10 см) в зависимости от целей эксперимента. В нашей лаборатории для проведения нокдауна наиболее часто используемым форматом работы является планшет на 96 лунок, поэтому далее будет приведен пример оптимизации проведения нокдауна именно для этого формата. Параметры проведения оптимизации трансфекции для других форматов приведены в официальном протоколе производителя Metafectene [42]. Вне зависимости от формата эксперимента в первую очередь необходимо оптимизировать следующие параметры.

1. Соотношение количества siРНК/липосомы (мкг/мкл): от 1 : 1 до 1 : 8.

2. Абсолютное количество трансфицируемых комплексов (siРНК + липосомы). Для 96-луночного планшета количество siРНК может варьироваться от 0,04 до 0,3 мкг, а количество липосом — от 0,2 до 4 мкл.

3. Количество клеток. Для получения оптимальных результатов трансфекцию необходимо проводить на стадии логарифмического роста клеток. Оптимальной конfluентностью для проведения трансфекции является 30–60 % [42]. При этом количество клеток зависит от типа и размера клеток. Для 96-луночного планшета количество клеток обычно варьируется от  $5 \times 10^3$  до  $60 \times 10^3$ .

Кроме того, на эффективность липофекции влияют и другие параметры: 1) состояние клеток на момент трансфекции (должны быть здоровыми, активно делящимися); 2) наличие сыворотки в среде (для большинства культур трансфекция проходит эффективно при наличии 10 % сыворотки); 3) время инкубации с трансфицирующим комплексом (обычно составляет 3–6 ч, но может увеличиваться и до 72 ч); 4) в некоторых случаях увеличить эффективность трансфекции позволяет обработка клеток трансфицирующим раствором в течение часа после рассаживания.

Оценку эффективности липофекции клеток проводят по siРНК, меченной флуоресцентным красителем FAM (siFlu). При этом варьируют вышеописанные параметры. Кроме того, необходимо проводить контрольные эксперименты с липосомами без siРНК, а также оставлять необработанные клетки. Это необходимо как для определения токсического эффекта трансфицирующих агентов, так и для оценки эффективности трансфекции. Саму оценку проводят через 24 ч после проведения трансфекции, и определяют ее как долю клеток, содержащих флуоресцентную метку, от общего количества клеток. Также оценивается и токсичность трансфицирующих реагентов как

изменение общего количества клеток после трансфекции относительно необработанного контроля

Ниже приведен расчет (табл. 3) для проведения эксперимента по оптимизации условий трансфекции для 96-луночного формата. Подробный протокол проведения трансфекции см. в подразделе 3 «Протокол проведения липофекции».

После проведения оптимизации условий трансфекции можно оценить, насколько они пригодны для выполнения нокдауна. Также эффективность трансфекции может дать примерное представление о том, какое изменение экспрессии гена-мишени можно будет обнаружить в дальнейшем с помощью ПЦР в режиме «реального времени» при различной эффективности нокдауна (рис. 2). Например, если эффективность трансфекции составила 75 % и исследователи предполагают, что эффективность нокдауна будет 40 %, то детектируемое значение  $\Delta\Delta Ct$  для гена-мишени составит менее 0,5 цикла, что в реальности может быть сложно достоверно определить с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Если же эффективность нокдауна будет равна 90 %, то  $\Delta\Delta Ct$  может достигать 1,5 цикла, а это можно детектировать с помощью ПЦР в режиме «реального времени».

2. Постановка трансфекции с siРНК к исследуемому гену

После проведения оптимизации условий трансфекции можно приступать к постановке эксперимента с целевой siРНК. Данный эксперимент необходимо ставить в нескольких биологических повторностях (от 5 до 7) для последующей корректной статистической обработки данных. И очень важно, чтобы в него входили следующие трансфекции:

- с siРНК, меченной флуоресцентной меткой (siFlu), для оценки эффективности трансфекции;
- с неспецифической siРНК (sicontrol);
- с siРНК к исследуемому гену;
- без siРНК.

В нашей работе трансфицированные клетки инкубировали до 120 ч для оценки эффекта нокдауна на различные клеточные показатели.

3. Протокол проведения липофекции

Ниже представлен протокол для проведения трансфекции клеточной линии НЕК293 с использованием реагента Metafectene [42].

Необходимые реактивы:

1. полная ростовая среда для клеточной культуры (в зависимости от используемой клеточной культуры),
2. натрий-фосфатный буфер (PBS),
3. реагент Metafectene,
4. растворы siРНК.

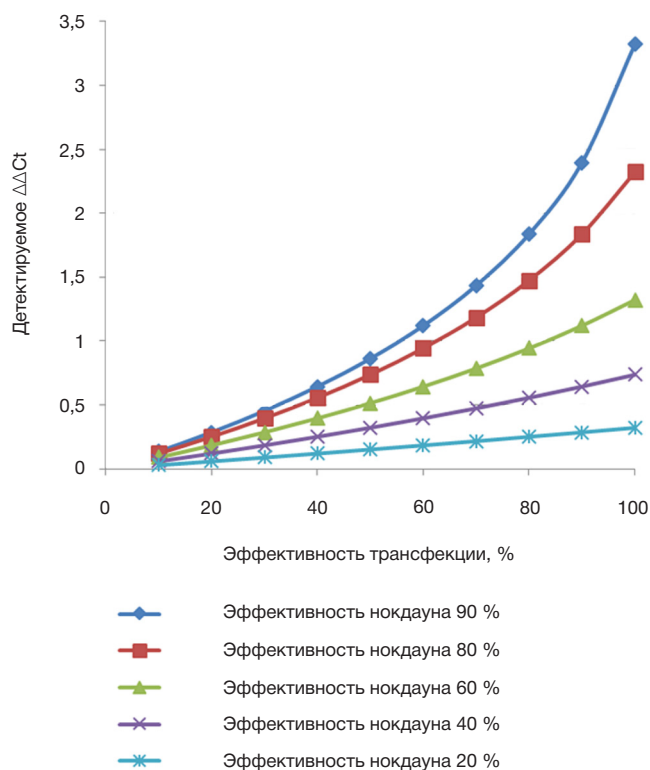


Рис. 2. График анализа значений детектируемых  $\Delta\Delta Ct$  для разных эффективностей трансфекции при различной эффективности нокдауна

Таблица 3. Схема проведения эксперимента по оптимизации трансфекции в 96-луночном формате

		10×10 <sup>3</sup> клеток/луночка				20×10 <sup>3</sup> клеток/луночка			
		siРНК	siРНК	siРНК	siРНК	siРНК	siРНК	siРНК	siРНК
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)
	Metafectene	0,1 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,1 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)
	Metafectene	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,6 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,6 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)
	Metafectene	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
Без siРНК	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл
siРНК : Metafectene	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-
Необработанный	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-
siРНК : Metafectene	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-

**Таблица 4.** Расчет количества siРНК и реагента Metafectene для разных видов планшетов на одну трансфекцию (протокол производителя Metafectene [42])

Размер планшета	6 лунок	24 лунки	96 лунок
Общий объем, мл	2,2	0,56	0,21
Объем суспензии клеток, мл	2,0	0,50	0,15
Раствор А (siРНК (30μМ) + буфер PBS, мкл) на 1 лунку	5,0 + 100,0	2,5 + 30,0	0,5 + 30,0
Раствор Б (липид + буфер PBS, мкл) на 1 лунку	5,0 + 100,0	2,5 + 30,0	0,4 + 30,0
Объем смеси растворов А и В (мкл) на 1 лунку	200,0	60,0	60
Количество клеток на 1 лунку ( $\cdot 10^4$ )	25	10	1

Необходимое оборудование:

- камера Горяева или проточный цитофлуориметр,
- ламинар для работы с эукариотами,
- CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Методика протокола для клеточной линии НЕК293 с siFlu представлена ниже.

1. Рассчитать количество реагентов, необходимых для трансфекции, исходя из планируемого числа реакций трансфекций (табл. 4).

2. Подготовить клетки для трансфекции: определить количество клеток в небольшой аликвоте, а далее довести клетки до необходимой концентрации в расчете на лунку планшета (например, для 96-луночного планшета на 25 лунок необходимо подготовить 4 мл суспензии с концентрацией клеток  $67 \times 10^3$  клеток/мл и внести в каждую лунку по 150 мкл этой суспензии).

3. Подготовить реагенты: разморозить siРНК, подготовить метафектен и пробирки.

4. Для каждого типа образцов приготовить растворы А и Б, используя объемы, указанные в табл. 2. *Примечание.* Раствор А можно пипетировать интенсивно, раствор Б — пипетировать один раз.

5. К раствору Б добавить раствор А и однократно пипетировать во избежание разрушения липосом. Инкубировать смесь 15 мин при комнатной температуре.

6. В это время посадить клетки в лунки планшета. Необходимо, кроме образцов с siРНК, подготовить лунки с образцами, куда будет добавлен только метафектен, и контрольные лунки с клетками, куда не будет добавлено никаких реагентов (необработанные клетки, контроль выживаемости вне зависимости от трансфекции).

7. По каплям добавить раствор А + Б в нужные лунки планшета. Помешать содержимое в лунках, покачивая планшет. Инкубировать 6 ч при 37 °С и содержании CO<sub>2</sub> 5 %.

8. Через 6 ч посмотреть на клетки под микроскопом. Если адгезионные клетки прикрепились к подложке, то аккуратно поменять среду из-за токсичности метафектена. Инкубировать 18 ч при 37 °С и содержании CO<sub>2</sub> 5 %.

9. Через 24 ч после трансфекции клетки из всех контрольных лунок промыть PBS, снять трипсином, затем инактивировать трипсин полной средой, открутить, ресуспендировать и посчитать на проточном цитометре для оценки эффективности липофекции и токсичности реактивов.

### III. Оценка эффективности нокдауна

#### 1. Выделение тотальной РНК из культур клеток

Следующим этапом проведения нокдауна является приготовление лизатов трансфицированных клеток и выделение из них РНК. Этот этап является очень важным при прове-

дении эксперимента, поскольку именно выделенная РНК будет служить основой для анализа ответа изучаемых генов. Существуют различные методы выделения РНК, основанные на разных принципах. Одним из первых появился метод выделения РНК в градиенте CsCl. Несмотря на то, что он позволяет получить очень качественный результат, сегодня его используют редко из-за трудоемкости и значительных затрат времени. Самый распространенный, простой и быстрый метод — это абсорбция на силикатных сорбентах. Для этого подхода выпускается множество различных наборов реагентов, но они довольно дороги и не всегда гарантируют хорошее качество выделения. Третий метод — выделение РНК фенол-хлороформной экстракцией. Этот метод является наиболее дешевым и качественным. На рынке доступен реагент TRIzol [43], позволяющий выделять РНК этим методом. Мы в своих экспериментах пользуемся классическим методом фенол-хлороформной экстракции [44, 45].

При выделении РНК существует достаточно большая вероятность ее контаминации РНКазой, которых много в окружающей среде. Поэтому выделение РНК должно происходить в чистой зоне, а используемые реагенты должны быть чистыми от РНКаз.

Для лизиса клеток используется гуанидин-тиоционатный буфер. Гуанидин тиоционат быстро проникает внутрь клеток и инактивирует РНКазы. Важно, чтоб перед лизисом трансфицированные клетки держали на холоде, а свежеприготовленные лизаты — во льду для предотвращения деградации РНК. После очистки образцов от дебриса лизаты следует поделить на две части, одну из которых можно хранить при -70 °С до полугода, а из другой части выделять РНК. Если в дальнейшем на каком-то этапе что-то не получится, можно взять материал из предыдущего шага, а не перерабатывать все сначала.

При фенол-хлороформной экстракции происходит разделение фенольной и водной фаз, при этом в верхней водной фазе остаются нуклеиновые кислоты, а белки частично уходят в фенольную фазу, частично — остаются в интерфазе. Чтобы разделить ДНК и РНК, применяют кислый фенол с рН 4,4, т. к. только в этом случае РНК стабильна, тогда как ДНК частично уходит в органическую фазу и интерфазу вместе с белками.

Необходимые реагенты:

- кислый фенол, насыщенный цитратным буфером (рН 4,4),
  - хлороформ,
  - этиловый спирт 96 % и 70 %,
  - гуанидин тиоционат буфер (ГТБ): 4 М гуанидин тиоционат, 25 мМ цитрат Na рН 7,0, 0,5 % N-лауроилсаркозин Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол (добавлять перед использованием),
  - натрий-фосфатный буфер PBS,
  - вода, чистая от РНКаз.
- Необходимое оборудование:

1. генератор ультразвука,
2. центрифуга с охлаждением,
3. камера для электрофореза.

Ниже представлен полный протокол [44, 45] выделения РНК из культур клеток.

1. Достать пробирки, охладить их (на ледяной бане), подписать.

2. Адгезионные клетки в лунках отмыть от среды (насосом убрать среду, аккуратно залить холодным PBS, так же убрать PBS). Суспензионные клетки ресуспендировать в каждой лунке, далее центрифугировать на 1,5 кгpm 1 мин, отобрать среду, промыть раствором PBS.

3. Залить клетки 1 мл ГТБ, полученный лизат как можно быстрее перенести в охлажденные пробирки. Интенсивно провортексировать клетки.

4. Провести гомогенизацию клеток. *Примечание.* Гомогенизацию можно проводить пропуском лизата через стерильную иглу шприца, однако этот метод не является достаточно эффективным. Более качественным методом является ультразвуковая гомогенизация на холоде. Мы используем ультразвук мощностью 130 Вт в течение 30 с для гомогенизации [46].

5. После гомогенизации еще раз провортексировать образцы.

6. Центрифугировать лизаты на 10 000 g при 4 °С 5–20 мин для осаждения дебриса, который может мешать выделению РНК.

7. Супернатант перенести в чистые пробирки (переносить следует аккуратно, т. к. осадок не закреплен на дне пробирки).

8. Для каждого образца объем лизата разделить на две равные части: одна — для непосредственно выделения, вторая — запасная (убирается на хранение при –70 °С).

9. К 500 мкл лизата добавить 1/10 объема (50 мкл), 2 М ацетата натрия рН 4,2. Мягко перемешать.

10. Далее к лизатам добавить равный объем (500 мкл) кислого фенола, мягко смешать, инкубировать 5 мин при комнатной температуре (для полного растворения нуклеобелковых комплексов).

11. Добавить 1/5 объема хлороформа (100 мкл), интенсивно провортексировать.

12. Центрифугировать 20 мин при 10 000 g.

13. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку, стараясь не задеть и не забрать интерфазное кольцо.

14. Дополнительно, при наличии большого белкового интерфазного кольца, повторить фенол-хлороформную экстракцию несколько раз, пока интерфазное кольцо совсем не исчезнет. *Примечание.* Объем верхней фазы уменьшается с каждым центрифугированием, поэтому к нему следует добавлять недостающее до 500 мкл количество ГТБ.

15. К верхней фазе добавить равный объем смеси кислого раствора фенол : хлороформ (1 : 1, заранее смешать, т. к. при смешивании выделяется вода и объем меняется, 500 мкл). Интенсивно вортексировать, центрифугировать 10 мин при 10 000 g.

16. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку.

17. К верхней фазе добавить один объем хлороформа (500 мкл), интенсивно вортексировать, центрифугировать 10 мин при 10 000 g. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку.

18. К верхней фазе добавить 2,5 объема 96 % этилового спирта (1 250 мкл). Также для лучшей визуализации

осадка после центрифугирования можно добавить соосаждители (например, гликоген).

19. Инкубировать при –20 °С не менее 1 ч, затем можно оставить на ночь при –20 °С (осаждение нуклеиновых кислот).

20. Центрифугировать 20 мин при 10 000 g при +4 °С.

21. Супернатант слить, осадок промыть холодным 70 % этиловым спиртом. Постараться, чтобы спирт протек по стенке пробирки со всех сторон для очистки от солей, которые могут ингибировать ферментативные реакции. Центрифугировать 10 мин при 10 000 g при +4 °С.

22. Осадок подсушить на воздухе под ламинаром (оставить открытые пробирки на несколько минут, пока не испарятся последние капли и осадок, если он виден, не станет прозрачным), растворить в воде, не содержащей нуклеаз.

23. Проверить качество выделения РНК с помощью электрофореза. Если осадок был достаточно хорошо виден, то лучше наносить на электрофорез один образец дважды в разных количествах, например 1 и 5 мкл.

24. После электрофореза в 1 % агарозном геле цельная РНК должна выглядеть на геле как две мажорные полосы, соответствующие 18S и 28S рРНК, причем 28S бенд должен быть интенсивнее 18S примерно в 2 раза (рис. 3). На протяжении всей дорожки, от самого верха до самого низа, должен быть виден слабый шмер — это и есть высокомолекулярная мРНК. Важно, чтобы внизу геля не было бенда, который свидетельствует о деградации РНК. Если внизу присутствует бенд сильной интенсивности, то лучше выделить РНК заново, еще раз уделив внимание всем выше перечисленным шагам. Другой важной особенностью хорошего выделения является отсутствие геномной ДНК, которая «бежит» чуть выше полосы ДНК-маркера, соответствующей длине 10 тыс. п. н. При ее наличии также лучше выделить РНК заново, обращая внимание на буферизацию фенола и аккуратный отбор водной фазы.

Качество и количество полученной РНК можно оценить инструментально на спектрофотометре. Количество РНК определяется значением поглощения при 260 нм. Дополнительные измерения при 240 и 280 нм дадут исследователю представление о чистоте образца от белков. Она определяется подсчетом отношения значений поглощений 260/280, которое может колебаться от 0,5 до 2,0. Чем чище РНК от белков, тем ближе показатель к 2,0. Отношение значений

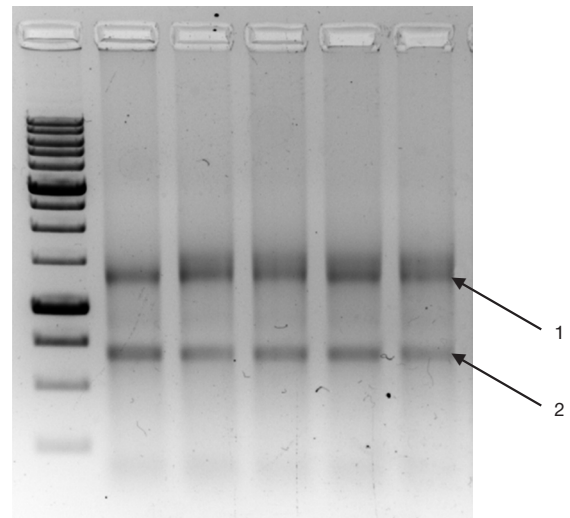


Рис. 3. Пример электрофореза качественно выделенных из лизата РНК. 1 — полоса, соответствующая 28S рРНК, 2 — полоса, соответствующая 18S рРНК

260/230 показывает чистоту РНК от органических примесей, в частности, от фенола, его солей и других солей, используемых при выделении РНК. В идеальном случае это значение также должно быть около 2,0. Если все же при выделении образец РНК оказался недостаточно чистым, его можно попробовать очистить дополнительным осаждением РНК спиртом.

Выделенную РНК необходимо хранить при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  и перед использованием размораживать на ледяной бане.

## 2. Обработка образцов РНК ДНКазой I

Контаминация ДНК в образцах РНК часто приводит к различным проблемам на этапе проведения ПЦР в режиме «реального времени»: образованию неспецифичных продуктов. Также необходимо подбирать разноэзонные праймеры для амплификации целевых генов, дабы избежать вклада геномной ДНК в результат реакции при амплификации кДНК. Поэтому оптимально использование РНК без примесей геномной ДНК. Практика показывает, что даже коммерческие наборы реагентов для выделения РНК не гарантируют получения РНК, свободной от ДНК. Для очистки РНК от нее образцы обрабатываются ДНКазой I.

Важно отметить, что на данном этапе мы советуем не обрабатывать ДНКазой I весь образец РНК, а работать с его частью. Таким образом, в случае ошибок или непредвиденных обстоятельств всегда можно вернуться на шаг назад.

Проведение реакции с ДНКазой I — несложная операция [47]: к аликвоте РНК необходимо добавить реакционный буфер и непосредственно фермент того же производителя. ДНКазу I нельзя вортиксировать, иначе она теряет свою активность. Инкубация с ферментом длится минимум 1 ч. Этого времени в большинстве случаев достаточно, чтобы хорошо очистить РНК от ДНК. Инактивация ДНКазы I происходит посредством добавления в смесь ЭДТА для хелатирования ионов  $\text{Mg}^{2+}$  и нагревания смеси до  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Необходимые реагенты:

1. буфер для работы ДНКазы I с  $\text{Mg}^{2+}$ ,
2. ЭДТА 50 мМ,
3. вода, чистая от РНКаз.

Необходимое оборудование: термостат.

Нами используется следующий протокол.

1. РНК разморозить на ледяной бане.
2. Отбрать аликвоту РНК (2–3 мкг) и довести ее объем до 8 мкл водой, чистой от РНКаз.
3. Добавить 1 мкл 10х реакционного буфера для ДНКазы I, провортиксировать.
4. Добавить 1 мкл фермента, сбросить капли вниз (не вортиксировать).
5. Инкубировать 1 ч при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
6. Добавить 1 мкл 50 мМ ЭДТА и инкубировать 10 мин при  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3. Контроль очистки образцов РНК от примесей ДНК

Для проверки успешности работы ДНКазы необходимо оценить оставшееся количество ДНК в образце. Для этого проводится реакция ПЦР в режиме «реального времени» с парой праймеров, отжигающихся на геномной ДНК. В качестве контрольного образца в реакцию также нужно взять образец РНК до обработки ДНКазой I и геномную ДНК. Получаемое значение  $C_t$  с образца, обработанного

ферментом, должно быть больше значений  $C_t$ , полученных с образцов РНК до обработки ДНКазой I и геномной ДНК. Если значение  $C_t$  больше 37 циклов, то можно считать обработку успешной. При таком значении геномная ДНК не будет вносить значимого вклада в экспрессионный анализ.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5х): рабочий буфер для полимеразы (5х),  $\text{MgCl}_2$  (12,5 мМ), смесь 4 дезоксирибонуклеотидов (1 мМ каждого).

3. Taq-полимераза,

4. краситель EvaGreen,

5. для ПЦР-участка гена HPRT1 использовали следующие праймеры:

HPRT f3 — ACCACCGTGTGTTAGAAAAGTA,

HPRT r3 — AGGGAAGCTGCTGACAAAGATT.

Необходимое оборудование:

1. амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени»,

2. камера для электрофореза.

Для постановки контрольной ПЦР мы используем праймеры к гену *HPRT1*, амплифицирующие фрагмент геномной ДНК, по следующему протоколу &

1. На каждый образец готовится ПЦР-смесь:

- ПЦР-буфер (5х) — 4 мкл,
- праймеры (2,5  $\mu\text{M}$ ) — 2 мкл каждого,
- EvaGreen (20х) — 1 мкл,
- Taq-полимераза (5 ед./мкл) — 0,25 мкл,
- вода — 9,75 мкл,
- матрица — 1 мкл,

2. Амплификация проходит по следующему температурному профилю:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 1 мин; 40 циклов:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 10 с,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 10 с,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 10 с; флуоресценция снимается одновременно с элонгацией; кривая плавления — с  $60$  до  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  с шагом в  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

3. Анализ полученных кривых амплификаций, полученные значения  $C_t$ .

Также важно отметить, что после обработки образцов РНК ДНКазой необходимо проконтролировать качество РНК с помощью электрофореза, как было описано выше.

## 4. Получение кДНК с помощью реакции обратной транскрипции

Данный этап также является несложным по исполнению, однако он очень важен для последующего анализа, поскольку при неэффективном прохождении обратной транскрипции при экспрессионном анализе могут быть получены данные, не соответствующие реальному ответу клеток на воздействие.

На сегодняшний день существует два основных способа получения кДНК — с помощью случайных гексануклеотидов и с помощью так называемого oligo-dT-праймера. Случайные гексануклеотиды могут отжигаться в любых местах на молекулах РНК, поэтому в результате получается библиотека фрагментов кДНК, соответствующих всем последовательностям РНК. Oligo-dT-праймер отжигается на поли-А-хвост мРНК, поэтому в результате получается библиотека полиаденилированных РНК. Выбор праймеров для обратной транскрипции (ОТ) зависит от природы изучаемого гена и имеющихся праймеров для его амплификации. Использование случайных гексануклеотидов позволяет получить кДНК, в которой представлены все участки РНК, что позволит использовать праймеры, подобранные



на любую часть транскрипта. Хотя 5'-концы у таких библиотек представлены большим числом фрагментов синтетизированных кДНК. И напротив, oligo-dT-праймер позволяет более эффективно получать фрагменты кДНК, соответствующие 3'-концам РНК [48]. Кроме того, библиотека будет обогащена полиаденилированными мРНК. Поэтому в зависимости от длины мРНК гена и того места, куда подобраны праймеры для дальнейшей амплификации, экспериментатор сам выбирает подходящий для него вариант.

Протокол обратной транскрипции включает 3 этапа: двух- или трехстадийный отжиг праймеров на РНК, саму реакцию обратной транскрипции и ее инактивацию.

Необходимые реагенты:

1. обратная транскриптаза,
2. буфер для работы обратной транскриптазы,
3. дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs),
4. MgCl<sub>2</sub> 25 mM,
5. вода, чистая от нуклеаз.

Необходимое оборудование: термостат и ледяная баня.

Протокол реакции обратной транскрипции по [49] представлен ниже.

1. Перед началом работы подготовить термостат на 70 °С, ледяную баню.

2. Рассчитать компоненты реакционной смеси, исходя из концентрации РНК (табл. 5). Конечный объем реакции должен быть равен 10–30 мкл. Если получилось так, что РНК — низкой концентрации и объем смеси больше, то лучше в разумных пределах снизить количество РНК на реакцию, но не увеличивать объем реакции.

3. К объему, содержащему 1 мкг РНК, добавить 10 пмоль праймера oligo-dT (5'-(T)<sub>25</sub>VN-3') или 100 пмоль рандомных гексануклеотидов.

4. Инкубировать 3 мин при 70 °С.

5. Быстро перенести в ледяную баню на 3 мин.

6. Приготовить и добавить к РНК реакционную смесь.

7. Инкубировать 2 мин при 42 °С (не обязательный шаг).

8. Добавить 1 мкл ImProm-II Reverse Transcriptase (200 ед.).

9. Инкубировать 15 мин при 20 °С (шаг только для случайных гексануклеотидов).

10. Инкубировать 1,5 ч при 42 °С (работа обратной транскриптазы).

11. Инактивировать ревертазу: 70 °С, 20 мин.

12. Разбавить кДНК в 10–20 раз водой для ПЦР.

### 5. Контроль качества полученной кДНК

Несмотря на то, что реакция обратной транскрипции достаточно простая, порой кДНК может не получаться, при том, что все характеристики использованной в реакции РНК могут быть хорошими. Это может происходить из-за следующих распространенных ошибок: недостаточной от-

чистки РНК при фенольной экстракции; плохой промывки осадка РНК после высаживания от солей; недосушивания осадка РНК после высаживания и растворения ее со следами спирта. Именно по этим причинам очень важно после ОТ проверять качество полученной кДНК с помощью ПЦР в режиме «реального времени».

Для этого на полученной кДНК ставится пробная ПЦР в режиме «реального времени» на праймерах к гену «домашнего хозяйства», например *B2M* или *HPRT1*. Но при этом необходимо ставить реакции с отрицательным и положительным контролями — с водой и контрольной кДНК соответственно. В результате такой пробной амплификации по полученным значениям Ct можно оценить успешность прохождения обратной транскрипции на исследуемых образцах РНК. В идеальном случае значения Ct для всех образцов должны находиться в пределах одного цикла. Если значение Ct опытного образца отличается от остальных более чем на 4 цикла, то такая кДНК непригодна для дальнейшего анализа. В каких-то случаях необходимо провести дополнительную очистку РНК путем повторного осаждения ее спиртом.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5x): рабочий буфер для полимеразы (5x), MgCl<sub>2</sub> (12,5 mM), смесь 4 дезоксинуклеотидов (1 mM каждого).

3. Taq-полимераза,

4. краситель EvaGreen (или SybrGreen),

5. для ПЦР участка гена *HPRT1* использовали следующие праймеры:

HPRT f4 — TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT,

HPRT r4 — AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG.

Необходимое оборудование: амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Для постановки пробной ПЦР мы используем праймеры к генам «домашнего хозяйства», например *B2M* и *HPRT1*.

Протокол оценки качества полученной кДНК с использование гена *HPRT1* — ниже.

1. На каждый образец кДНК готовится следующая ПЦР-смесь:

- ПЦР-смесь (5x) — 4 мкл,
- праймеры (2,5 μM) — 2 мкл каждого,
- EvaGreen (20x) — 1 мкл,
- Taq-полимераза (5 ед./мкл) — 0,25 мкл,
- вода — 0,75 мкл,
- матрица — 10 мкл.

2. Амплификация проходит по следующему температурному профилю: 95 °С — 1 минута; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 60 °С — 10 с; 72 °С — 10 с (снятие флуоресценции происходило на шаге элонгации); кривая плавления с 60 до 95 °С с шагом в 0,3 °С.

Таблица 5. Расчет смеси для постановки реакции обратной транскрипции

Компонент	Концентрация стокового раствора	Объем на 1 реакцию (20 мкл)
РНК	–	0,5–1,0 мкг
Праймер	10 μM (oligo-dT)	1 мкл
	100 μM (случайные гексанулеотиды)	1 мкл
ImProm-II™ Reaction Buffer	5x	4 мкл
Смесь dNTPs	2mM (каждого)	2 мкл
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2 мкл
ImProm-II Reverse Transcriptase	200 ед/мкл	1 мкл
Вода, не содержащая нуклеаз (MQ)	–	До 20 мкл

3. Анализ полученных кривых амплификаций, получение значений  $C_t$ .

4. Для гена *HPRT1* значения  $C_t$  должны соответствовать контрольной кДНК (как правило, около 25 циклов). Если полученные значения  $C_t$  для исследуемых кДНК примерно совпадают с контрольными, значит, эту кДНК можно использовать в дальнейших экспериментах.

#### б. Оценка эффективности нокдауна с помощью ПЦР в режиме «реального времени»

Известно, что эффективность полимеразной цепной реакции зависит от различных факторов, в том числе и концентрации матрицы. Поэтому перед тем как измерять изменение экспрессии генов, необходимо выровнять концентрацию кДНК-образцов. Выравнивание производится разбавлением кДНК водой согласно полученным значениям  $C_t$  с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Необходимо, чтобы максимальная разница между образцами кДНК была не больше одного цикла. Тогда получаемый разброс данных при конечном подсчете будет минимальным.

После выравнивания количества кДНК можно приступить к непосредственному анализу экспрессии генов с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Экспрессия генов-мишеней оценивается относительно генов домашнего хозяйства. Согласно рекомендациям The MIQE Guidelines [50], для нормализации экспрессионных данных необходимо использовать несколько референсных генов — три или более. Чем больше их будет взято в эксперимент, тем качественнее и объективнее будет проведена оценка изменения экспрессии целевых генов. Важно отметить, что референсные гены имеют различные уровни экспрессии, поэтому брать в эксперимент слабо- и высокоэкспрессирующиеся референсные гены было бы ошибкой. В наших исследованиях для нормализации экспрессионных данных мы используем следующие гены: *HPRT1*, *TFRC*, *B2M*, *TBP*.

ПЦР в режиме «реального времени» необходимо проводить в 3 или более технических повторностях для каждого образца кДНК. Сами реакции могут проходить как с участием интеркалирующего красителя, так и TaqMan-зондов. Безусловно, последние более удобны для работы, т. к. характеризуются высокой специфичностью ПЦР. Однако стоимость зондов несравнимо выше, и, если не предполагается ставить большого количества экспериментов, интеркалирующие красители являются хорошей альтернативой [51].

При использовании любой системы ПЦР в режиме «реального времени» (как с интеркалирующими красителями, так и с TaqMan-зондами) необходимо предварительно подобрать оптимальные условия их работы для контрольных образцов кДНК, поскольку на этапе ПЦР в режиме «реального времени» возможны ошибки, сопряженные с неадекватной работой праймеров.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5x): рабочий буфер для полимеразы (5x),  $MgCl_2$  (12,5 mM), смесь 4 дезоксирибонуклеотидов (1 mM каждого).
5. Taq-полимераза,
6. краситель EvaGreen.

Необходимое оборудование: амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Выше мы уже описывали расчеты реакционной смеси для ПЦР в режиме «реального времени». Для большинства амплифицируемых локусов мы используем следующий температурный профиль: 95 °C — 1 мин; 40 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 10 с, 72 °C — 10 с (снятие флуоресценции происходило на шаге элонгации); кривая плавления с 60 до 95 °C с шагом в 0,3 °C.

После окончания реакции ПЦР в режиме «реального времени» необходимо проанализировать полученные данные, первым делом — кривые плавления, чтобы убедиться, что амплификация прошла специфично и без образования праймеров-димеров. Далее необходимо сравнить технические повторности для каждого образца. Если повторности отличаются между собой более, чем на 0,3 цикла, то необходимо повторить реакцию ПЦР, тщательно соблюдая протокол. Для анализа данных берут средние  $C_t$  из технических повторностей.

После этого можно приступить к подсчету относительных уровней экспрессии исследуемых генов. Значения для референсных генов необходимо усреднить, вычислив для них среднее геометрическое [52]. Дальнейшие расчеты ведутся по методу  $\Delta\Delta C_t$ :

1. вычислить среднее геометрическое для генов «домашнего хозяйства»  $C_t(ref)$ ,
2. вычислить  $\Delta C_t = C_t(целевого\ гена) - C_t(ref)$ ,
3. вычислить среднее значение  $\Delta C_t(med)$  и стандартное отклонение SD,
4. вычислить  $\Delta\Delta C_t$  по формуле:  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(целевого\ гена) - \Delta C_t(med)_{контрольная}$ ,
5. для получения относительного уровня экспрессии необходимо полученное значение подставить в формулу:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,
6. для *si*control значение из п. 5 должно быть равно 1.

Полученное значение является отражением того, насколько изменился уровень экспрессии целевого гена в образцах, обработанных целевой *si*РНК, относительно контрольных образцов, обработанных неспецифической *si*РНК. Далее необходимо вычислить границы погрешности и оценить статистическую достоверность полученных изменений. Значения доверительного интервала вычисляются по формуле  $2^{-(\Delta\Delta C_t \pm SD)}$ , где  $\Delta\Delta C_t$  — это значение, полученное в п. 4 для изучаемого гена в образцах с таргетной *si*РНК по отношению к контрольным образцам, SD — стандартное отклонение значения  $\Delta C_t$  между биологическими повторностями для таргетной *si*РНК. Соответственно, значения ошибок будут вычисляться как разница между максимальным или минимальным значением доверительного

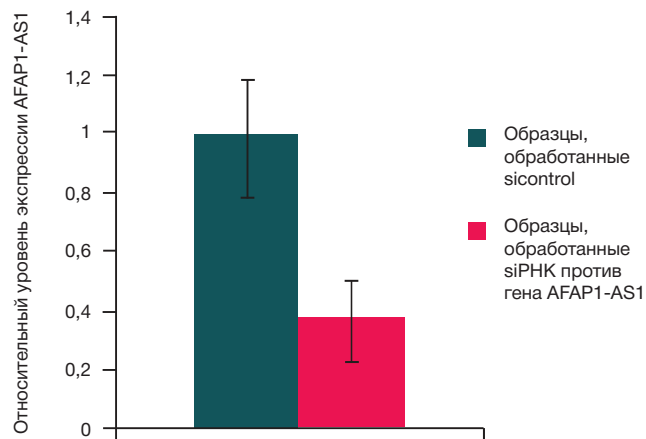


Рис. 4. Пример гистограммы, составляемой по итогам анализа результатов ПЦР в режиме «реального времени»

интервала и полученным  $\Delta\Delta Ct$ . По итогам вычислений строят гистограммы, на которых откладывают полученные значения ошибок (рис. 4).

Для оценки статистической значимости полученных данных чаще всего используются непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни.

#### IV. Анализ эффекта нокдауна на клеточной культуре

В зависимости от цели эксперимента после проведения нокдауна целевого гена можно проводить измерения различных показателей как на молекулярно-биологическом (влияние на экспрессию других генов), так и на клеточном уровне. Влияние нокдауна конкретного гена на жизнедеятельность клеток может быть проанализировано при помощи различных клеточных тестов, оценивающих уровень пролиферации, апоптоза, миграции клеток, построения кривых роста, анализа клеточного цикла.

Одним из самых распространенных параметров жизнедеятельности клетки, измеряемый во многих подобных исследованиях, является анализ жизнеспособности (cell viability assay). Он позволяет оценить количество живых клеток исследуемом образце и тем самым определить скорость пролиферации или выживаемость клеток после какого-либо воздействия на них. Существует несколько разных подходов для исследования жизнеспособности клеток: использование различных тетразолиевых красителей (MTT, MTS, XTT, WST-1), резазурина, протеазных маркеров жизнеспособности (GF-AFC), измерение уровня АТФ и др. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки. Но все же на сегодняшний день самым распространенным методом исследования клеточной жизнеспособности является метод, основанный на восстановлении тетразолиевых красителя MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Данный метод является наиболее дешевым и простым, хотя по чувствительности уступает некоторым другим методикам, поэтому его часто используют для первичного скрининга [53].

Принцип метода основан на том, что живые клетки способны восстанавливать MTT до формазана (окрашенного нерастворимого в воде вещества с максимальным значением поглощения при 570 нм), количество которого в конечном счете и регистрируется в эксперименте. MTT является коммерчески доступным реагентом, в нашей работе используется MTT, поставляемый фирмой «ПанЭко» (Россия) в виде сухого вещества.

Если целью эксперимента является определение влияния нокдауна гена на жизнеспособность клеток, то обычно ее измеряют в образцах, обработанных контрольной siРНК и целевой siРНК. Каждый образец в отдельном эксперименте измеряется минимум в 5 биологических повторностях. Кроме того, измерение жизнеспособности необходимо в течение некоторого времени, через различные временные промежутки, например один раз в сутки в течение 5 дней (временные точки могут варьировать в зависимости от цели эксперимента). Таким образом, каждый эксперимент, начиная с трансфекции, должен быть продублирован такое количество раз, которое соответствует количеству временных точек, т. к. в процессе MTT-теста исследуемые клетки погибают.

Ниже описано проведение MTT-теста (по [53, 54] с изменениями).

Необходимые реактивы:

1. рабочий раствор MTT в натрий-фосфатном буфере (PBS) pH 7,4 с концентрацией 5 мг/мл. Раствор необхо-

димо простерилизовать через фильтр с порами 0,2 мкм. Хранить раствор MTT необходимо в защищенном от света месте в замороженном состоянии — до 6 мес., при +4 °C — не более 2 нед.,

2. растворитель DMSO (диметилсульфоксид), 100 %.

Необходимое оборудование:

1. планшетный ридер, способный измерять оптическую плотность при длинах волн 570 и 670 нм,

2. качалка для плашек (опционально).

Протокол проведения теста:

1. Для проведения MTT-теста трансфекцию проводят в плоскостном 96-луночном планшете.

2. После смены среды объем свежезаливаемой полной среды должен составлять 150 мкл/луночка. *Примечание.* Кроме того, необходимо подготовить контрольные луночки без клеток, но со средой (далее — пустые луночки), в количестве, равном количеству биологических повторов в эксперименте, и проводить с ними все дальнейшие манипуляции в точности, как с образцами.

3. В каждую луночку с исследуемой культурой добавить 20 мкл рабочего раствора MTT (5 мг/мл). Мягко пипетировать.

4. Инкубировать 3–4 ч при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>.

5. Удалить среду и слегка подсушить ячейки.

6. Растворить образованный формазан в 200 мкл DMSO. Желательно использовать качалку для плашек в течение 10 мин при комнатной температуре для быстрого и равномерного растворения продукта.

7. С помощью плашечного ридера измерить оптическую плотность растворов в каждой исследуемой луночке при 570 нм и фоновые значения — при 670 нм.

Анализ полученных результатов

1. Для каждой луночки необходимо определить исправленную оптическую плотность ( $D_{испр}$ ), вычисляемую как  $D(570\text{ нм}) - D(670\text{ нм})$ , где  $D$  — оптическая плотность.

2. Далее для каждой луночки с клетками: из  $D_{испр}$  необходимо вычесть среднее  $D_{испр}$  пустых лунок.

3. Полученные значения оптической плотности необходимо усреднить по каждому образцу и определить стандартное отклонение для каждого значения.

4. Построить график зависимости полученных значений от времени после трансфекции для различных образцов (рис. 5).

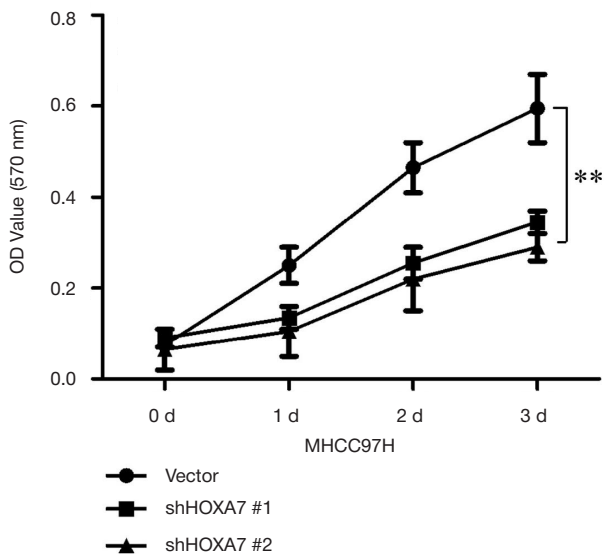


Рис. 5. Пример результатов MTT-теста при нокдауне гена *HOXA7* (Tang и соавт. [55])

## ВЫВОДЫ

Проведение нокдауна с помощью siРНК — это сложная и многостадийная процедура. На каждом этапе проведения есть свои подводные камни, о которых надо знать и учи-

тывать их, чтобы получить качественный результат. Непонимание или несоблюдение всех правил может привести к ошибкам на разных стадиях эксперимента и получению не соответствующих действительности результатов или их неправильной интерпретации.

## Литература

- Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Feb; 21 (2): 198–206. DOI: 10.1038/nsmb.2764.
- Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinius B et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun.* 2015 Jul 24; 6: 7743. DOI: 10.1038/ncomms8743.
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003 Jun; 34 (2): 157–65. DOI: 10.1038/ng1157.
- Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* 2010 Jun 11; 38 (5): 662–74. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
- Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 2012 Mar; 190 (3): 841–54. DOI: 10.1534/genetics.111.136911.
- Skoblov MYu. Prospects of technologies of antisense therapy. *Mol Biol (Mosk).* 2009; 43 (6): 917–29.
- Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan; 75 (1): 280–4.
- Марахонов А. В., Баранова А. В., Скоблов М. Ю. РНК-интерференция: фундаментальные и прикладные аспекты. *Медицинская генетика.* 2008; 7 (10): 44–56.
- Glebova K, Reznik ON, Reznik AO, Mehta R, Galkin A, Baranova A et al. Technology in Kidney Transplantation: Current Status and Future Potential. *BioDrugs.* 2014 Aug; 28 (4): 345–61. DOI: 10.1007/s40259-014-0087-0.
- Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov M. Therapeutic siRNAs and nonviral systems for their delivery. *Mol Biol (Mosk).* 2012 May–Jun; 46 (3): 371–86.
- Филатова А. Ю., Скоблов М. Ю. Использование siРНК в терапии кардиоваскулярных заболеваний. *Клиническая и экспериментальная хирургия.* 2014; (4): 12–9.
- Вяхирева Ю. В., Зернов Н. В., Марахонов А. В., Гуськова А. А., Скоблов М. Ю. Современные подходы к лечению миодистрофий. *Медицинская генетика.* 2016; 15 (10): 3–16.
- Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Mar; 169 (6): 774–89. DOI: 10.1007/s12010-013-0098-1.
- O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *Mater Methods.* 2013; 3: 197. DOI: 10.13070/mm.en.3.197.
- Chaudhary A, Srivastava S, Garg S. Development of a software tool and criteria evaluation for efficient design of small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7; 404 (1): 313–20. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.114.
- Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan; 9 (1): 57–67. DOI: 10.1038/nrd3010.
- Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science.* 2002 May 17; 296 (5571): 1270–3. DOI: 10.1126/science.1069132.
- Applied Biosystems Inc. Reduced siRNA Concentrations Lead to Fewer Off-Target Effects. *TechNotes.* 2008; 15 (2): 13–5.
- Zhang J, Wu Q, Wang Z, Zhang Y, Zhang G, Fu J et al. Knockdown of PSF1 expression inhibits cell proliferation in lung cancer cells in vitro. *Tumour Biol.* 2014 Nov 15; 36 (3): 2163–8. DOI: 10.1007/s13277-014-2826-8.
- Yu D, Makkar G, Dong T, Strickland DK, Sarkar R, Monahan TS. MARCKS Signaling Differentially Regulates Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Proliferation through a KIS-, p27kip1-Dependent Mechanism. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0141397. DOI: 10.1371/journal.pone.0141397.
- Huang XH, Jian WH, Wu ZF, Zhao J, Wang H, Li W et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncotarget.* 2014 Jul; 5 (14): 5570–80. DOI: 10.18632/oncotarget.2141.
- Takasaki S. Selecting effective siRNA target sequences by using Bayes' theorem. *Comput Biol Chem.* 2009 Oct; 33 (5): 368–72. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2009.07.009.
- Gorodkin J, Ruzzo WL, editors. *RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods.* Vol. 1097. New York: Springer Science+Business Media; 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-709-9\_1.
- Takasaki S. Methods for selecting effective siRNA target sequences using a variety of statistical and analytical techniques. *Methods Mol Biol.* 2013; 942: 17–55.
- Lagana A, Veneziano D, Russo F, Pulvirenti A, Giugno R, Croce MC et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol Biol.* 2015; 1269: 393–412.
- Cui W, Ning J, Nail UP, Duncan MK. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed.* 2004 Jul; 75 (1): 67–73. DOI: 10.1016/j.cmpb.2003.09.002.
- Naito Y, Yoshimura J, Morisita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics.* 2009 Nov 30; 10: 392. DOI: 10.1186/1471-2105-10-392.
- Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, Moore B, Saetrom P, Ogurtsov AY et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res.* 2007 Apr 10; 35 (8): e63. DOI: 10.1093/nar/gkm088.
- Katoh T, Suzuki T. Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan 26; 35 (4): e27. DOI: 10.1093/nar/gkl1120.
- Jiang P, Wu H, Da Y, Sang F, Wei J, Sun X et al. RFRADB-siRNA: improved design of siRNAs by random forest regression model coupled with database searching. *Comput Methods Programs Biomed.* 2007 Sep; 87 (3): 230–8. DOI: 10.1016/j.cmpb.2007.06.001.
- Lu ZJ, Mathews DH. OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1; 36 (Web Server issue): W104–8. DOI: 10.1093/nar/gkn250.
- Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1; 32 (Web Server issue): W135–41. DOI: 10.1093/nar/gkh449.
- Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics.* 2006 Nov 30; 7: 520. DOI: 10.1186/1471-2105-7-520.
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol.* 2006 Oct; 142 (2): 429–40. DOI: 10.1104/pp.106.083295.

36. Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J et al. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2008 May; 26 (5): 578–83. DOI: 10.1038/nbt1404.
37. Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M et al. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35 (18): e123. DOI: 10.1093/nar/gkm699.
38. Eurofins Genomics. siMAX siRNA - The RNA Interfering Molecule, siRNA Controls, Non Specific Control 47% GC [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/custom-rna-oligos/simax-sirna.aspx>
39. Zirzow AC, Skoblov M, Patanarut A, Smith C, Fisher A, Chandhoke V et al. Nanoscale «DNA baskets» for the Delivery of siRNA. In: Herold KE, Vossoughi J, Bentley WE, editors. *IFMBE Proceedings: 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC 2010; 2010 Apr 30–May 2; College Park, Maryland, USA.* Berlin. Heidelberg: Springer; 2010. p. 130–3.
40. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Nonviral delivery systems for small interfering RNAs. *Mol Biol (Mosk).* 2012; 46 (3): 349–61.
41. Марахонов А. В., Сержанова В. А., Скоблов М. Ю., Баранова А. В. Разработка системы тестирования средств доставки мРНК. *Медицинская генетика.* 2010; 9 (12): 12–5.
42. Biontix Laboratories. Metafectene Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [http://www.n-genetics.com/file/Manual\\_METAFACTENE\\_en.pdf](http://www.n-genetics.com/file/Manual_METAFACTENE_en.pdf)
43. Invitrogen. TRIzol™ Reagent User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162 (1): 156–9.
45. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
46. Diagenode. Bioruptor User Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/Bioruptor\\_Manual.pdf](http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/Bioruptor_Manual.pdf)
47. Thermo Fischer Scientific Inc. DNase I RNase free User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000\\_DNase\\_I\\_RNasefree\\_1UuL\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf)
48. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem.* 2004 Mar; 50 (3): 509–15. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
49. Promega. Improm II Reverse Transcription System Protocol [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/improm-ii-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr; 55 (4): 611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
51. Gurvich OL, Skoblov M. Real-time PCR and multiplex approaches. *Methods Mol Biol.* 2011; 784: 1–13. DOI: 10.1007/978-1-61779-289-2\_1.
52. LifeTechnologies. Real-time PCR handbook [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
53. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al. *Cell Viability Assays.* In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al., editors. *Assay Guidance Manual.* Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
54. Promega. Technical Bulletin CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-non-radioactive-cell-proliferation-assay-protocol.pdf>
55. Tang B, Qi G, Sun X, Tang F, Yuan S, Wang Z et al. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail. *Mol Cancer.* 2016 Sep 6; 15 (1): 57. DOI: 10.1186/s12943-016-0540-4.

## References

1. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
2. Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Feb; 21 (2): 198–206. DOI: 10.1038/nsmb.2764.
3. Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinius B et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun.* 2015 Jul 24; 6: 7743. DOI: 10.1038/ncomms8743.
4. Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003 Jun; 34 (2): 157–65. DOI: 10.1038/ng1157.
5. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* 2010 Jun 11; 38 (5): 662–74. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
6. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 2012 Mar; 190 (3): 841–54. DOI: 10.1534/genetics.111.136911.
7. Skoblov MYu. Prospects of technologies of antisense therapy. *Mol Biol (Mosk).* 2009; 43 (6): 917–29.
8. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan; 75 (1): 280–4.
9. Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. [RNA interference: fundamentals and applications]. *Medical Genetics.* 2008; 7 (10): 44–56. Russian.
10. Glebova K, Reznik ON, Reznik AO, Mehta R, Galkin A, Baranova A et al. Technology in Kidney Transplantation: Current Status and Future Potential. *BioDrugs.* 2014 Aug; 28 (4): 345–61. DOI: 10.1077/s40259-014-0087-0.
11. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Therapeutic siRNAs and nonviral systems for their delivery. *Mol Biol (Mosk).* 2012 May–Jun; 46 (3): 371–86.
12. Filatova AYU, Skoblov MYu. [Use of siRNA in cardiovascular diseases therapy]. *Clinical and Experimental Surgery.* 2014; (4): 12–9. Russian.
13. Vyakhireva JV, Zernov NV, Marakhonov AV, Guskova AA, Skoblov MYu. [Current approaches for treatment of muscular dystrophies]. *Medical Genetics.* 2016; 15 (10): 3–16. Russian.
14. Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Mar; 169 (6): 774–89. DOI: 10.1007/s12010-013-0098-1.
15. O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *Mater Methods.* 2013; 3: 197. DOI: 10.13070/mm.en.3.197.
16. Chaudhary A, Srivastava S, Garg S. Development of a software tool and criteria evaluation for efficient design of small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7; 404 (1): 313–20. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.114.
17. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan; 9 (1): 57–67. DOI: 10.1038/nrd3010.

18. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. 2002 May 17; 296 (5571): 1270–3. DOI: 10.1126/science.1069132.
19. Applied Biosystems Inc. Reduced siRNA Concentrations Lead to Fewer Off-Target Effects. *TechNotes*. 2008; 15 (2): 13–5.
20. Zhang J, Wu Q, Wang Z, Zhang Y, Zhang G, Fu J et al. Knockdown of PSF1 expression inhibits cell proliferation in lung cancer cells in vitro. *Tumour Biol*. 2014 Nov 15; 36 (3): 2163–8. DOI: 10.1007/s13277-014-2826-8.
21. Yu D, Makkar G, Dong T, Strickland DK, Sarkar R, Monahan TS MARCKS Signaling Differentially Regulates Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Proliferation through a KIS-, p27kip1-Dependent Mechanism. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0141397. DOI: 10.1371/journal.pone.0141397.
22. Huang XH, Jian WH, Wu ZF, Zhao J, Wang H, Li W et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncotarget*. 2014 Jul; 5 (14): 5570–80. DOI: 10.18632/oncotarget.2141.
23. Takasaki S. Selecting effective siRNA target sequences by using Bayes' theorem. *Comput Biol Chem*. 2009 Oct; 33 (5): 368–72. DOI: 10.1016/j.cmpbiolchem.2009.07.009.
24. Gorodkin J, Ruzzo WL, editors. RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods. Vol. 1097. New York: Springer Science+Business Media; 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-709-9\_1.
25. Takasaki S. Methods for selecting effective siRNA target sequences using a variety of statistical and analytical techniques. *Methods Mol Biol*. 2013; 942: 17–55.
26. Lagana A, Veneziano D, Russo F, Pulvirenti A, Giugno R, Croce MC et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol Biol*. 2015; 1269: 393–412.
27. Cui W, Ning J, Nail UP, Duncan MK. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed*. 2004 Jul; 75 (1): 67–73. DOI: 10.1016/j.cmpb.2003.09.002.
28. Naito Y, Yoshimura J, Morisita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009 Nov 30; 10: 392. DOI: 10.1186/1471-2105-10-392.
29. Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, Moore B, Saetrom P, Ogurtsov AY et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res*. 2007 Apr 10; 35 (8): e63. DOI: 10.1093/nar/gkm088.
30. Katoh T, Suzuki T. Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan 26; 35 (4): e27. DOI: 10.1093/nar/gkl1120.
31. Jiang P, Wu H, Da Y, Sang F, Wei J, Sun X et al. RFRCD-B-siRNA: improved design of siRNAs by random forest regression model coupled with database searching. *Comput Methods Programs Biomed*. 2007 Sep; 87 (3): 230–8. DOI: 10.1016/j.cmpb.2007.06.001.
32. Lu ZJ, Mathews DH. OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul 1; 36 (Web Server issue): W104–8. DOI: 10.1093/nar/gkn250.
33. Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1; 32 (Web Server issue): W135–41. DOI: 10.1093/nar/gkh449.
34. Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics*. 2006 Nov 30; 7: 520. DOI: 10.1186/1471-2105-7-520.
35. Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol*. 2006 Oct; 142 (2): 429–40. DOI: 10.1104/pp.106.083295.
36. Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J et al. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2008 May; 26 (5): 578–83. DOI: 10.1038/nbt1404.
37. Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M et al. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35 (18): e123. DOI: 10.1093/nar/gkm699.
38. Eurofins Genomics. siMAX siRNA - The RNA Interfering Molecule, siRNA Controls, Non Specific Control 47% GC [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/custom-rna-oligos/simax-sirna.aspx>
39. Zirzow AC, Skoblov M, Patanarut A, Smith C, Fisher A, Chandhoke V et al. Nanoscale «DNA baskets» for the Delivery of siRNA. In: Herold KE, Vossoughi J, Bentley WE, editors. IFMBE Proceedings: 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC 2010; 2010 Apr 30–May 2; College Park, Maryland, USA. Berlin. Heidelberg: Springer; 2010. p. 130–3.
40. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Nonviral delivery systems for small interfering RNAs. *Mol Biol (Mosk)*. 2012; 46 (3): 349–61.
41. Marakhonov AV, Serzhanova VA, Skoblov MYu, Baranova AV. [Developing the system for testing siRNA delivery]. *Medical Genetics*. 2010; 9 (12): 12–5. Russian.
42. Biontix Laboratories. Metafectene Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [http://www.n-genetics.com/file/Manual\\_METAFACTENE\\_en.pdf](http://www.n-genetics.com/file/Manual_METAFACTENE_en.pdf)
43. Invitrogen. TRIZOL™ Reagent User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr; 162 (1): 156–9.
45. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
46. Diagenode. Bioruptor User Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/BioruptorManual.pdf>
47. Thermo Fischer Scientific Inc. DNase I RNase free User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000\\_DNase\\_I\\_RNasefree\\_1UuL\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf)
48. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*. 2004 Mar; 50 (3): 509–15. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
49. Promega. Improm II Reverse Transcription System Protocol [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/improm-ii-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr; 55 (4): 611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
51. Gurvich OL, Skoblov M. Real-time PCR and multiplex approaches. *Methods Mol Biol*. 2011; 784: 1–13. DOI: 10.1007/978-1-61779-289-2\_1.
52. LifeTechnologies. Real-time PCR handbook [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
53. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
54. Promega. Technical Bulletin CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-non-radioactive-cell-proliferation-assay-protocol.pdf>
55. Tang B, Qi G, Sun X, Tang F, Yuan S, Wang Z et al. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail. *Mol Cancer*. 2016 Sep 6; 15 (1): 57. DOI: 10.1186/s12943-016-0540-4.