



Promega

Technical Bulletin

遺伝子導入試薬

MultiFectam

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS EIF1000, EIF,2000 and EIF5000.



www.promega.com

MultiFectam

製品マニュアルは弊社のウェブサイトでもご入手頂けます (www.promega.co.jp/lit/multifectam/)。最新バージョンについてはウェブサイトをご覧ください。製品の技術的なお問い合わせは prometec@jp.promega.com までお寄せください。

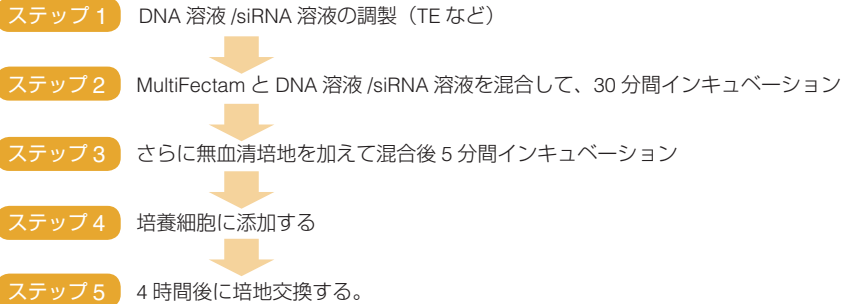
I. はじめに	1
II. 製品容量と保存	2
III. プロトコール	2
A. 細胞の準備	2
B. MultiFectam/ プラスミド DNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション	3
C. MultiFectam / siRNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション	4
D. MultiFectam / siRNA / プラスミド DNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション	4
IV. 参考文献	5
V. 関連製品	5

I. はじめに

本製品は、様々な哺乳動物由来の培養細胞中へプラスミド DNA や siRNA を効果的に導入できるトランスフェクション試薬です。本製品は、ポリアミドアミンデンドロンを極性基とするカチオン性脂質からなり、静電的相互作用により核酸と複合体を形成します。この複合体は、エンドサイトーシスにより細胞内のエンドソームに取り込まれます。その後、複合体は、ポリアミドアミンデンドロンにより誘起されるプロトンスポンジ効果^{注1} およびエンドソーム膜との疎水的相互作用により、効率よくエンドソームから細胞質へと放出される為、高い遺伝子導入効率を得られます (参考文献 1, 2)。

特長

- ・新しい細胞導入メカニズム。
- ・正常細胞を含む多くの細胞に対し、低毒性かつ高い遺伝子導入効率。
- ・血清存在下においても遺伝子導入が可能。
- ・操作が簡便。
- ・非ウイルス系遺伝子導入試薬。
- ・siRNA の導入も可能。



注 1: プロトンスポンジ効果とは、試薬のプロトン (H⁺) バッファリング効果によりエンドソーム内の pH 低下を抑制し、エンドソーム内に塩化物イオンを集積させ、浸透圧によってエンドソームを膨張、破裂させる効果のことです。遺伝子の発現 / siRNA の発現抑制のためには MultiFectam などのカチオン性ポリマーと核酸の複合体がエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれた後に、エンドソームから細胞質へ放出される必要があります。プロトンスポンジ効果によって、エンドソームが膨張、破裂することで効率よくエンドソームに取り込まれた核酸が細胞質に放出されるようになります。

II. 製品容量と保存

容量

Product	Size	Cat. #
MultiFectam (凍結乾燥品)	1.98mg (6 x 0.33mg)	ETF5000
	0.66mg (2 x 0.33mg)	ETF2000
	0.33mg (1 x 0.33mg)	ETF1000

MultiFectam 1.98mg は、24 ウェルプレート 20 枚分 (480well 分 : 240µg 相当の DNA)。
 siRNA の場合、24 ウェルプレート 18 枚分 (450well 分 : 9000pmol 相当の siRNA)

保存方法

- ・未溶解の MultiFectam は、冷蔵保存 (4° C) して下さい (-20° C でも保存可能)。
- ・溶解後は、冷蔵 (4° C) で 3 か月の保存が可能です。
 溶解後 3 か月以上保存する場合には、冷凍保存 (-20° C) して下さい^{注2}。
 注 2 : 冷凍保存 (-20°C) した場合、6 か月使用可能です。

III. プロトコール

以下のプロトコールは、24 ウェルプレート用です。ご利用のプレートに応じて試薬量は調節してください (表 1 参照)

A. 細胞の準備

- 接着細胞 : トランスフェクションする当日に 50 – 80% コンフルエントになるように、細胞を播種しておきます。培地(血清を含む^{注3})の量はトランスフェクション時には 500 µl にします。
- 浮遊細胞 : トランスフェクション当日に、500 µl の培地 (血清を含む^{注3}) に 0.5~1.5 × 10⁶ 個の細胞 (細胞種に依存) になるように播種します。

B. MultiFectam/ プラスミド DNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション

1. MultiFectam に 1 ml の滅菌水（室温）を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合します。溶解後の試薬は、4℃もしくは -20℃で保存してください。
2. 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーに、0.5µg のプラスミド DNA を添加し、0.5µg/25µl となるよう調製します^{注4}。
3. 調製した 25µl のプラスミド DNA 溶液に、12.5µl の MultiFectam を加え、ボルテックスでよく混合し、室温で 30 分間インキュベートします。（MultiFectam / プラスミド DNA 複合体形成）。
4. さらに 12.5µl の Opti-MEM® I Reduced Serum Medium（Invitrogen, #31985-062）、または無血清培地を添加し、よく混合し、室温で 5 分間静置します^{注5}。
5. 1 ウェルあたり 50 µl の MultiFectam / プラスミド DNA 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを揺らして混合します。毒性が確認される場合は、1 ウェル当たりの添加量を減らす、もしくは表 2 にしたがって MultiFectam とプラスミド DNA の混合比率・添加量の検討を行ってください。
6. 37℃、5%CO₂ 下で細胞を 4 時間インキュベートし、新しい増殖培地に交換してください^{注6}。
7. 24 - 96 時間後に目的遺伝子の発現がみられます。

表 1. 様々な細胞培養フォーマットにおけるトランスフェクションスケール

	Growth Area*	培地量 (ml)	MultiFectam (µl)	DNA -Tris 溶液 DNA / total volume	Opti-MEM® (µl)	1 ウェルあたりの 添加量 (µl)
96-well	0.32 cm ²	0.1	2.5	0.1 µg / 5.0 µl	2.5	10
48-well	0.82 cm ²	0.2	5.0	0.2 µg / 10.0 µl	5.0	20
24-well	1.88 cm ²	0.5	12.5	0.5 µg / 25.0 µl	12.5	50
12-well	3.83 cm ²	1.0	25.0	1.0 µg / 50.0 µl	25.0	100
6-well	9.4 cm ²	2.5	62.5	2.5 µg / 125 µl	62.5	250
35 mm	8.0 cm ²	2.0	50.0	2.0 µg / 100 µl	50.0	200
60 mm	21 cm ²	5.0	125	5.0 µg / 250 µl	125	500
100 mm	55 cm ²	10.0	250	10 µg / 500 µl	250	1000

* Corning® culture dishes のデータによります。

MultiFectam とプラスミド DNA 溶液との最適混合比率・添加量は、細胞種および実験条件により異なることがあります。表 2 に記載している混合比率、添加量の検討もお勧めします^{注8}。

表 2. MultiFectam とプラスミド DNA-Tris 溶液の混合比率と添加量

混合比	MultiFectam	DNA -Tris 溶液 DNA / total volume	Opti-MEM®	1 ウェルあたりの添加量
A *1	16.7 µl	0.5 µg / 20.8 µl	12.5 µl	50 - 100 µl *4
B *2	12.5 µl	0.5 µg / 25.0 µl	12.5 µl	50 - 100 µl *4
C *3	8.4 µl	0.5 µg / 29.1 µl	12.5 µl	20 - 50 µl

A *1: 高発現が期待できますが、毒性がみられることがあります。添加量を少なくすることをお勧めいたします。

B *2: 多くの細胞種において最適な条件です（標準法）。

C *3: 低毒性の条件ですが、発現がやや低いことがあります。添加量を増やすことをお勧めいたします。

*4: 毒性がみられない場合、添加量を増やすことでより多くの発現がみられることがあります。

C. MultiFectam / siRNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション

1. MultiFectam に 750 μ l の滅菌水 (室温) を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合します。溶解後の試薬は、4°C もしくは -20°C で保存してください。
2. siRNA を Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Invitrogen) もしくは無血清培地で希釈し、終濃度 1.0 pmol/ μ l の siRNA 溶液を調製します^{注7}。
3. 調製した siRNA 溶液 20 μ l (20 pmol) に MultiFectam 10 μ l を加え、タッピングでよく混合し、室温で 30 分間インキュベートします。(MultiFectam /siRNA 複合体形成)。
4. 1 ウェルあたり 30 μ l の MultiFectam /siRNA 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを揺らして混合します。
5. 37°C、5% CO₂ 下で細胞を 4 時間インキュベートし、新しい増殖培地に交換してください^{注6}。
6. 24~120 時間後に標的遺伝子発現のノックダウン効果がみられます。

表 3. 様々な細胞培養フォーマットにおけるトランスフェクションスケール

	Growth Area*	培地量 (ml)	MultiFectam (μ l)	siRNA 溶液 siRNA / total volume	1ウェルあたりの 添加量 (μ l)
96-well	0.32 cm ²	0.1	2	4 pmol / 4 μ l	6
48-well	0.82 cm ²	0.2	4	8 pmol / 8 μ l	12
24-well	1.88 cm²	0.5	10	20 pmol / 20 μl	30
12-well	3.83 cm ²	1.0	20	40 pmol / 40 μ l	60
6-well	9.4 cm ²	2.5	50	100 pmol / 100 μ l	150
35 mm	8.0 cm ²	2.0	40	80 pmol / 80 μ l	120
60 mm	21 cm ²	5.0	100	200 pmol / 200 μ l	300

*Corning[®] culture dishes のデータによります。

D. MultiFectam / siRNA / プラスミド DNA 複合体形成および細胞へのトランスフェクション

1. MultiFectam に 750 μ l の滅菌水 (室温) を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合します。溶解後の試薬は、4°C もしくは -20°C で保存してください。
2. 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーに、0.2 μ g のプラスミド DNA、10 pmol の siRNA を添加し、11.75 μ l となるよう調製します^{注4}。
3. 調整した 11.75 μ l の DNA、siRNA-Tris 溶液に MultiFectam 8.75 μ l を加え、タッピングでよく混合し、室温で 25 分間インキュベートします (MultiFectam /siRNA / プラスミド DNA 複合体形成)。
4. さらに 14.5 μ l の Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Invitrogen, #31985-062)、または無血清培地を添加し、よく混合し、室温で 5 分間静置します^{注5}。
5. 1 ウェルあたり 35 μ l の MultiFectam /siRNA / プラスミド DNA 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを揺らして混合します。
6. 37°C、5% CO₂ 下で細胞を 4 時間インキュベートし、新しい増殖培地に交換してください^{注6}。
7. 24~120 時間後に標的遺伝子発現のノックダウン効果がみられます。

表 4. 様々な細胞培養フォーマットにおけるトランスフェクションスケール

Growth Area*	培地量 (ml)	MultiFectam (μl)	siRNA/DNA-Tris 溶液 siRNA/DNA/total volume	Opti-MEM® (μl)	1ウェルあたりの 添加量 (μl)	
96-well	0.32 cm ²	0.1	1.75	2pmol/0.04μg/2.35μl	2.9	7
			2.75	4pmol/0.04μg/4.08μl	4.8	11.63
48-well	0.82 cm ²	0.2	3.5	4pmol/0.08μg/4.7μl	5.8	14
			5.5	8pmol/0.08μg/8.16μl	9.6	23.26
24-well	1.88 cm ²	0.5	8.75	10pmol/0.2μg/11.75μl	14.5	35
			13.75	20pmol/0.2μg/20.4μl	24	58.15
12-well	3.83 cm ²	1	17.5	20pmol/0.4μg/23.5μl	29	70
			27.5	40pmol/0.4μg/40.8μl	48	116.3
6-well	9.4 cm ²	2.5	43.75	50pmol/1μg/58.75μl	72.5	175
			68.75	100pmol/1μg/102μl	120	290.75
35 mm	8 cm ²	2	35	40pmol/0.8μg/47μl	58	140
			55	80pmol/0.8μg/81.6μl	96	232.6
60 mm	21 cm ²	5	87.5	100pmol/2μg/117.5μl	145	350
			137.5	200pmol/2μg/204μl	240	581.5

* Corning® culture dishes のデータによります。

MultiFectam と siRNA 溶液との最適混合比率・添加量は、細胞種および実験条件により異なることがあります。混合比率、添加量の検討もお勧めします注⁸。

注 3：血清を含む培地と無血清培地を使った場合の導入効果に大きな違いは認められません。

注 4：DNA を溶解する溶液として 20mM Tris-HCl (pH7.4) 以外に TE (Tris/EDTA) も利用可能です。

注 5：OPTI-MEM® 培地の替わりに PBS を使用すると毒性が強くと認められるケースがあります。

注 6：培地を交換したほうが細胞に対するダメージは少なくなります。そのため、交換することを推奨しています。

注 7：siRNA を TE もしくは滅菌水で溶解して使用することも可能です。10-20pmol/μl の濃度の siRNA 溶液は、1 pmol/μl になるように RNase フリーの TE や Opti-MEM® などの無血清培地で希釈してご利用ください。

注 8：細胞によって最適な混合比が異なります。表 2 にあるような、いくつかの混合比をお試しいただき最適な混合比を決定してください。

IV. 参考文献

1. T.Takahashi, K.Kono, T.Itoh, N.Emi, T.Takagishi: Synthesis of novel cationic lipids and their transfection activity. *Bioconjugate Chem.*, **14**, 764-773 (2003).
2. T.Takahashi, A.Harada, N.Emi, K.Kondo: Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance. *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1160-1165 (2005).

<特許>

特許第 4305615 「ポリアミドアミンデンドロンを含む遺伝子導入組成物」

V. 関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	定価 (¥)
トランスフェクション試薬			
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311	55,000
	5X1ml	E2312	220,000
FuGENE® 6 Transfection Reagent	1ml	E2691	55,000
	5X1ml	E2692	220,000



プロメガ株式会社

東京都中央区日本橋大伝馬町 14-15
TEL: 03-3669-7981 FAX: 03-3669-7982



www.promega.com