遺伝子導入試薬

MultiFectam

Promega

©2008, Promega Corporation. All rights reserved.

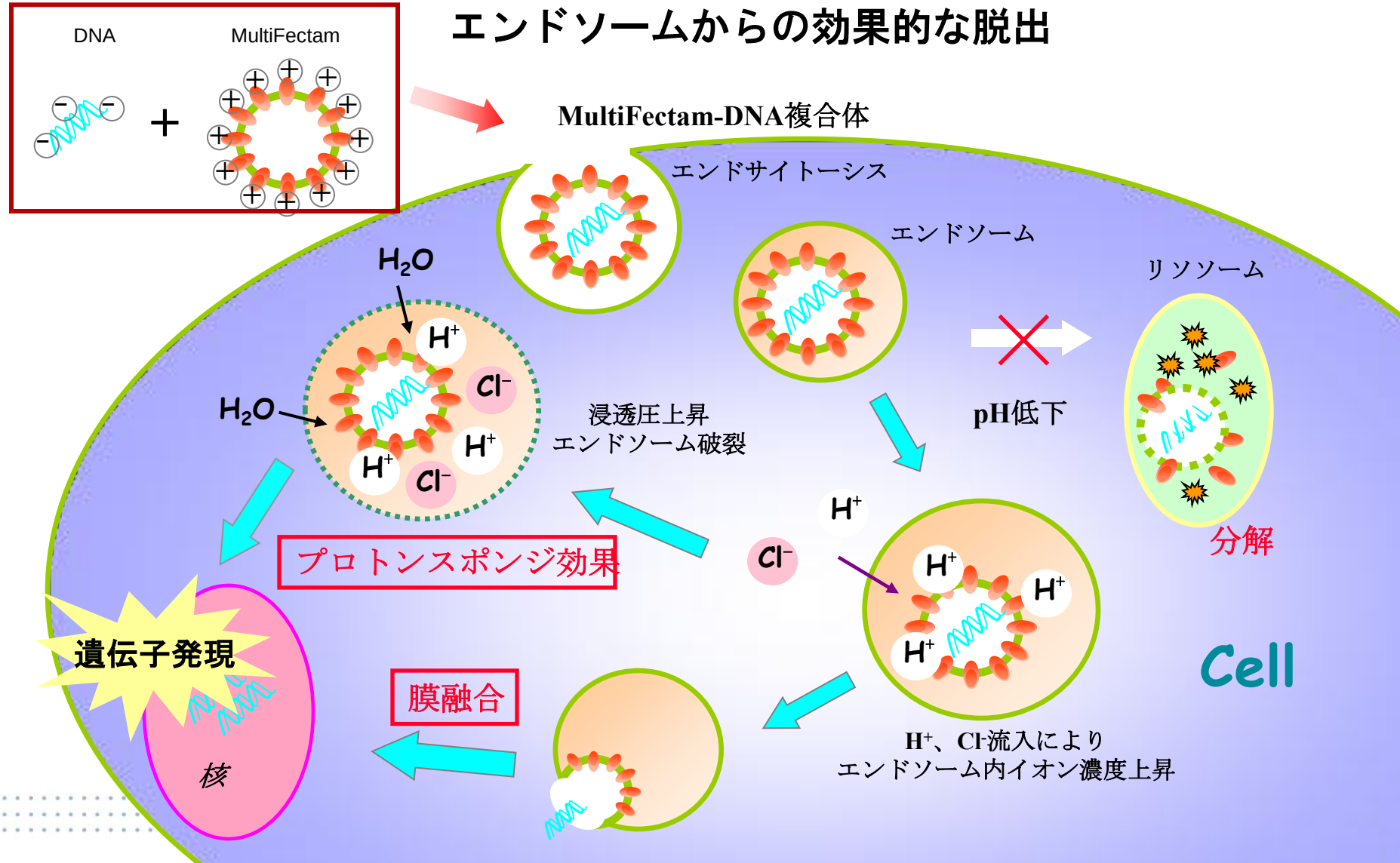
Outline

- 遺伝子導入試薬MultiFectamについてI
- 基礎データ
- 他社製品との比較
- 初代培養細胞への遺伝子導入
- siRNAの導入
- 特徴

Promega

遺伝子発現メカニズム

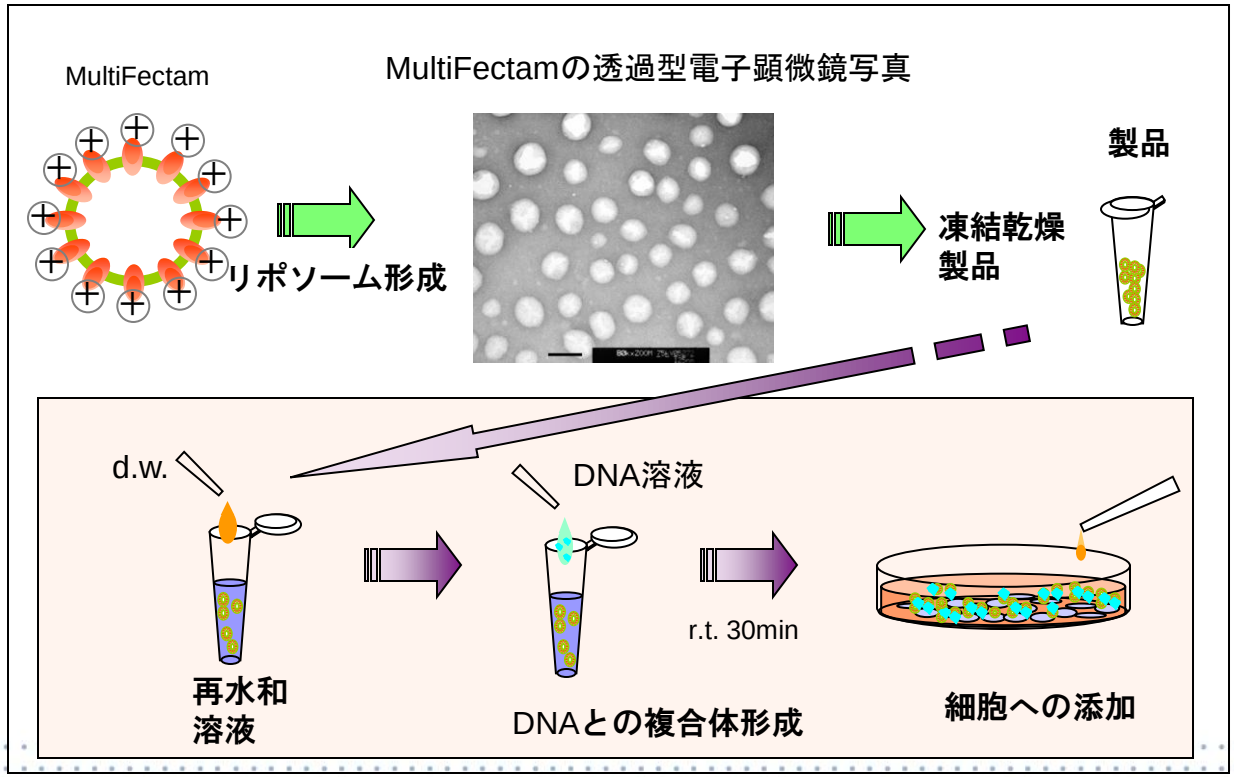
プロトンスポンジ効果と膜融合能の相乗効果による
エンドソームからの効果的な脱出

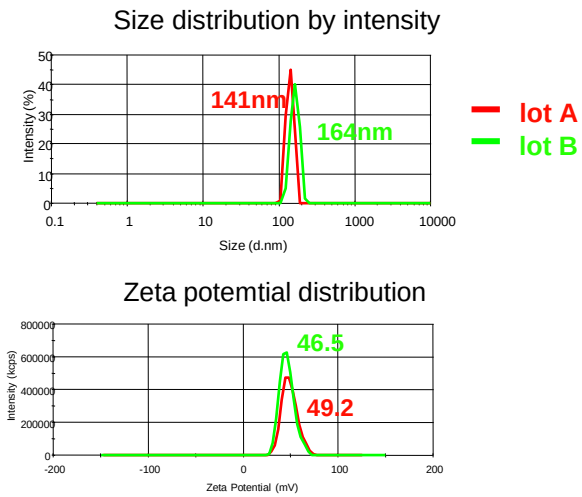


原理とプロトコル

原理: 本製品は、プラスミドDNAを様々な哺乳動物由来の培養細胞中へ効果的に導入できるトランスフェクション試薬です。本試薬は、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、静電気的相互作用によりDNA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、高い遺伝子発現効率が得られます。

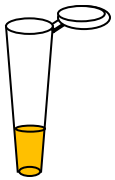
プロトコル:





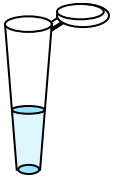
検出器機:Zetasizer Nano : ZS90
(MALVERN CO., LTD)

細胞への導入効率



MultiFectam＋ NBD

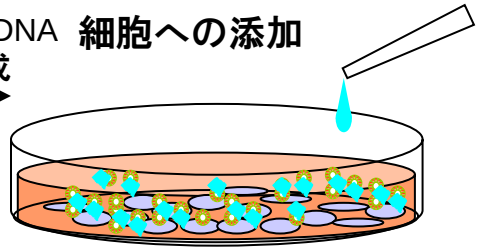
＋



DNA-Alexa Fluor 546

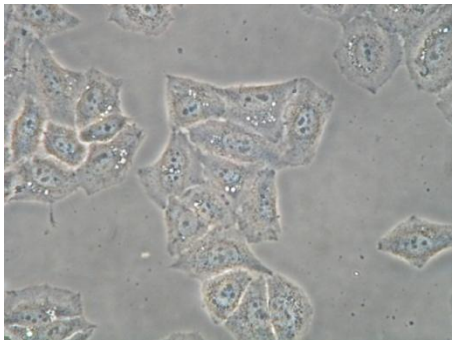
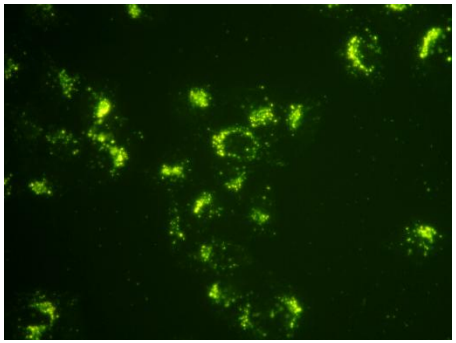
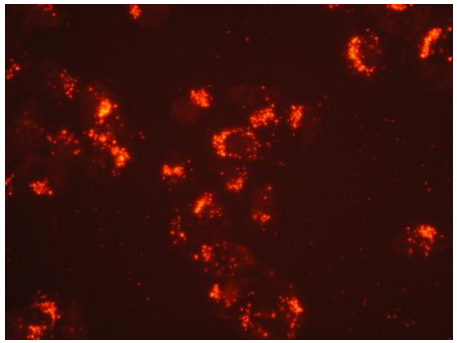
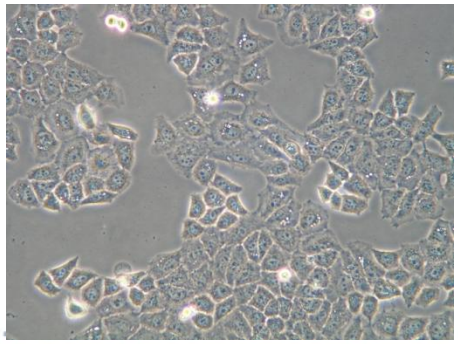
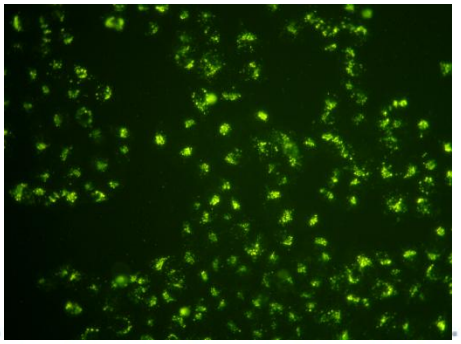
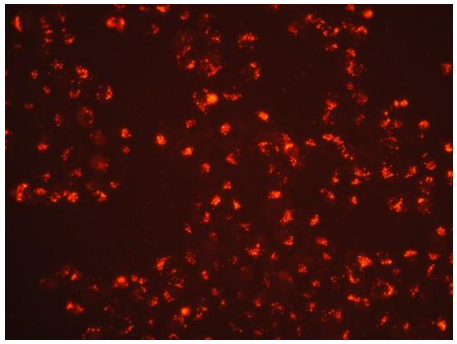
MultiFectam-DNA
複合体形成

細胞への添加



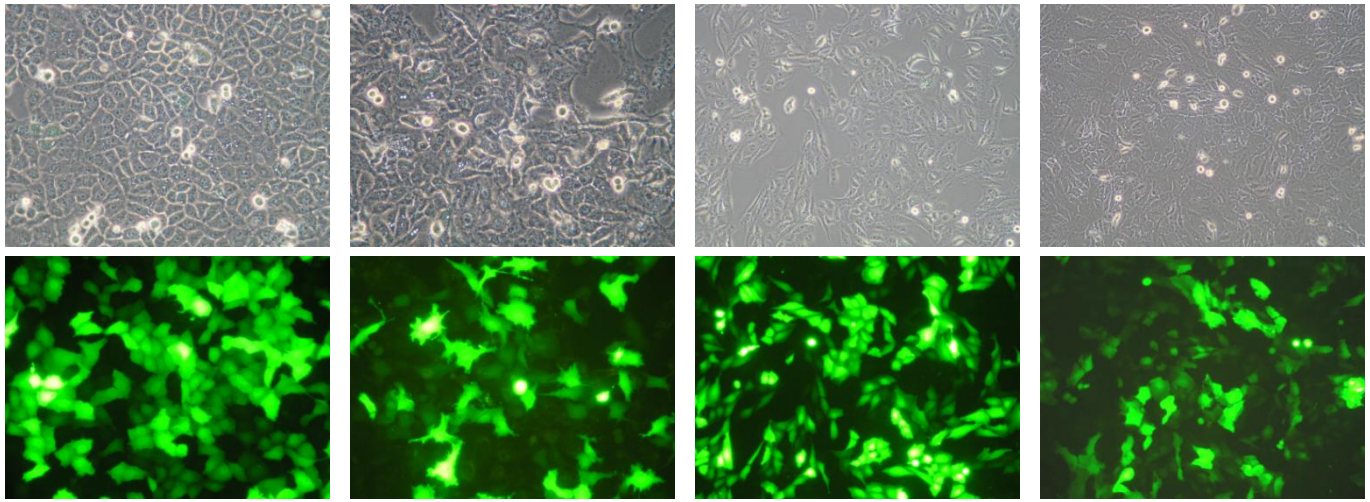
48 hr後、観察

HeLa-S3

	明視野	NBD標識MultiFectam	DNA-Alexa Fluor 546
400倍観察			
200倍観察			

様々な細胞株での遺伝子発現（GFP）

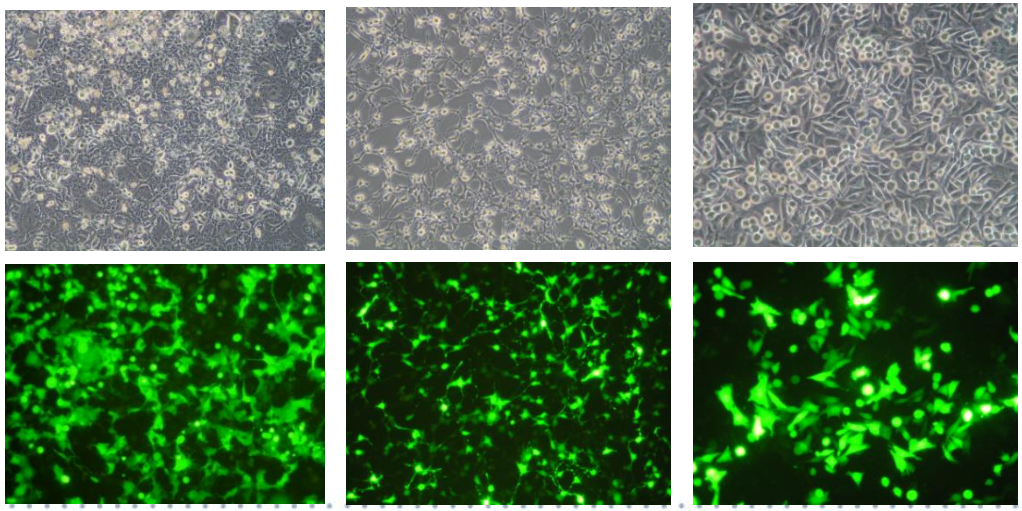
HeLa-S3　A549　U2OS　SKOV3



100倍観察：
COS7, K562, Jurkat, Balb3T3

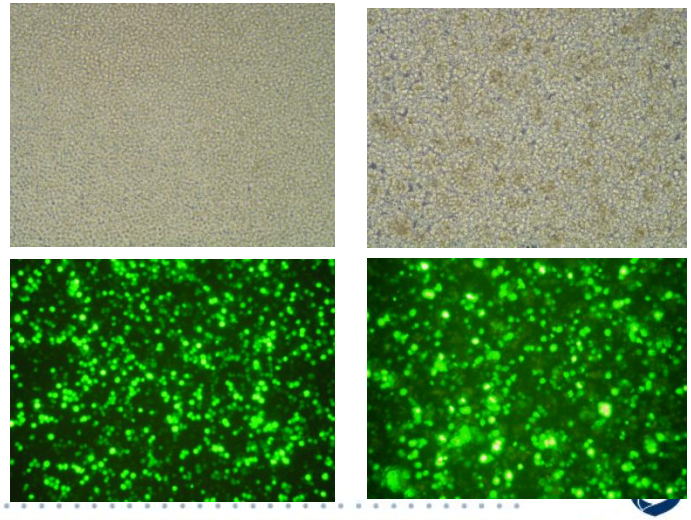
200倍観察：
その他

COS 7　Balb3T3　CHO



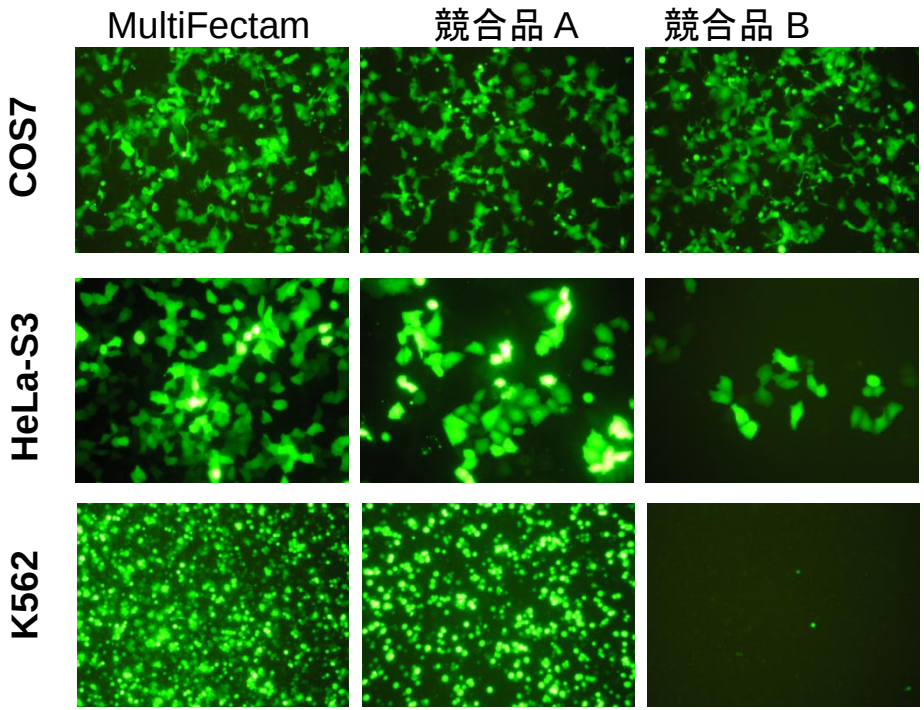
浮遊系

K562　Jurkat



他社製品との比較

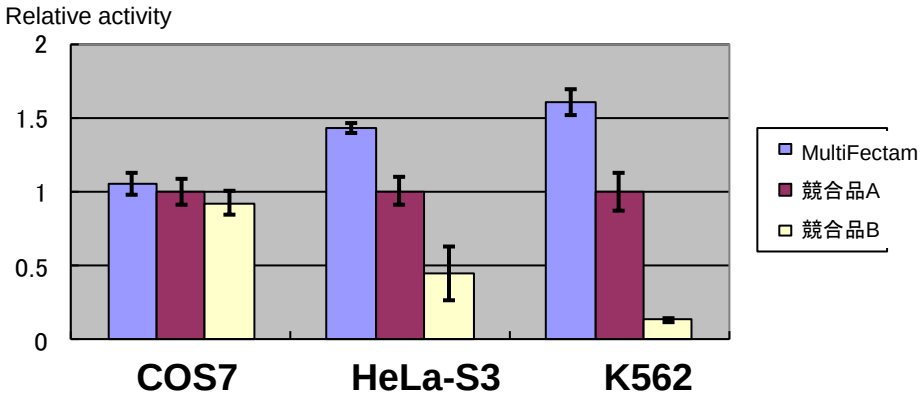
GFP発現



COS7: 100倍　HeLa-S3 : 200 倍
K562 : 100倍

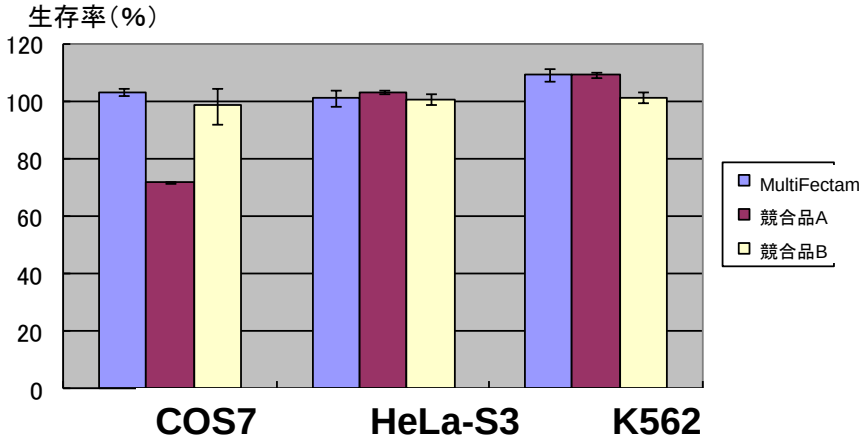
ルシフェラーゼ活性測定

48hr後

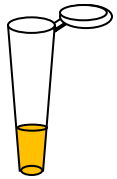


競合品Aの活性値を1とした（それぞれの推奨プロトコルに従った）

毒性評価 (WST-8)

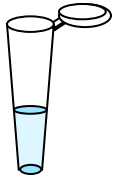


NHDF-ad (正常ヒト皮膚繊維芽細胞)へのDNA、MultiFectamの導入効率



MultiFectam＋ NBD

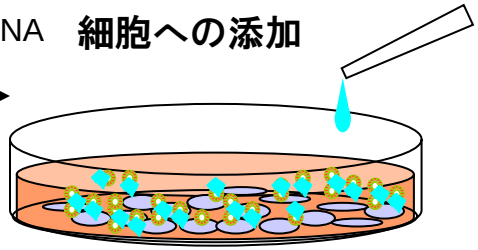
＋



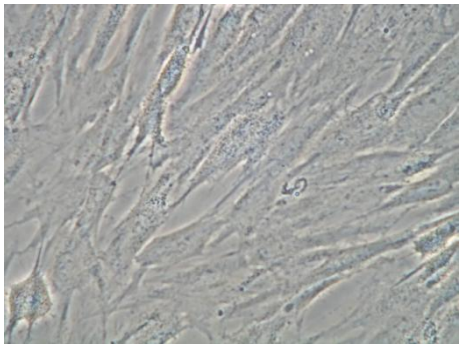
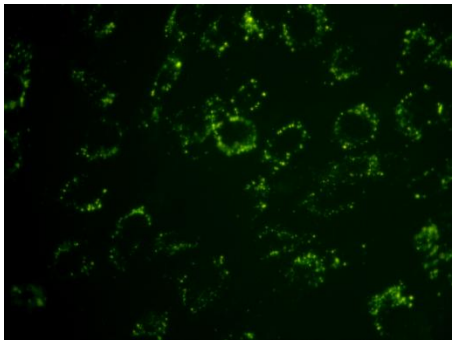
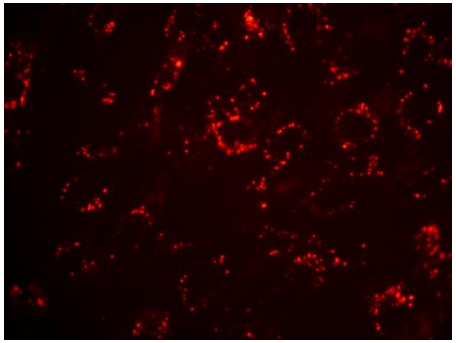
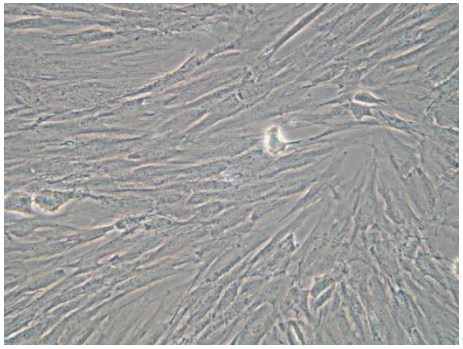
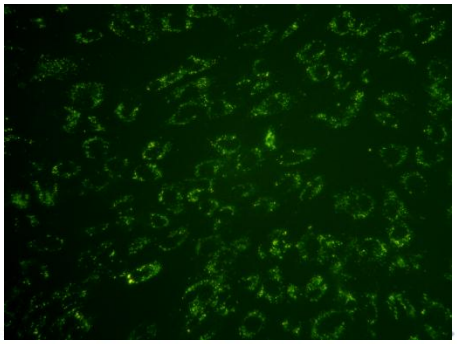
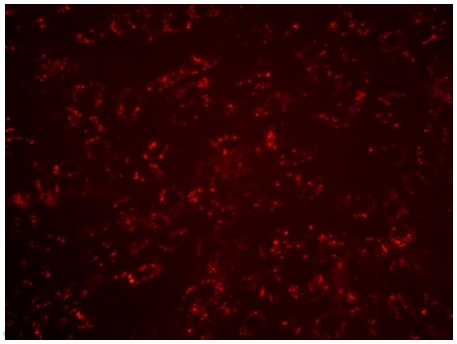
DNA-Alexa Fluor 546

MultiFectam-DNA
複合体形成

細胞への添加



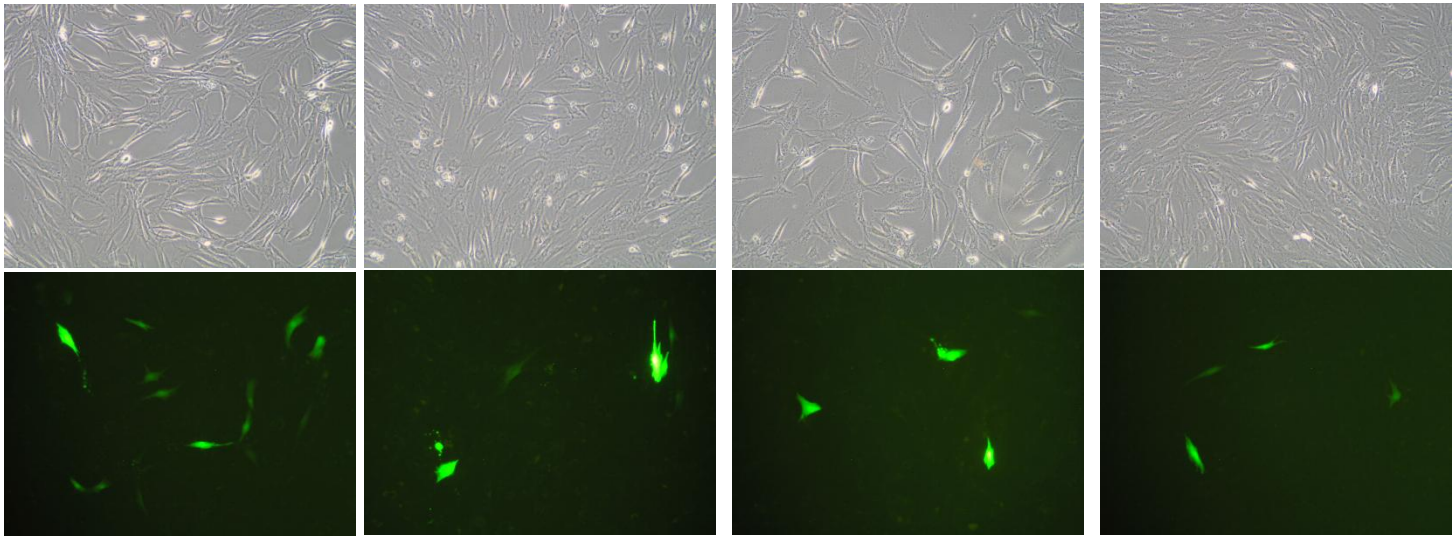
48 hr後、観察

	明視野	NBD標識MultiFectam	DNA-Alexa Fluor 546
400倍観察			
200倍観察			

他社製品との比較（活性： NHDF-ad細胞 ）

GFP発現

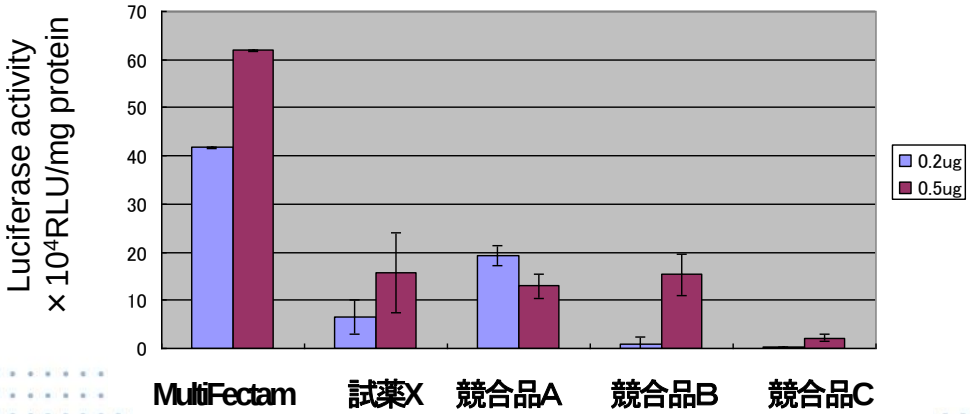
MultiFectam 0.2ug　　競合品A　0.2ug　　競合品B　0.2ug　　競合品C　1ug



48hr後

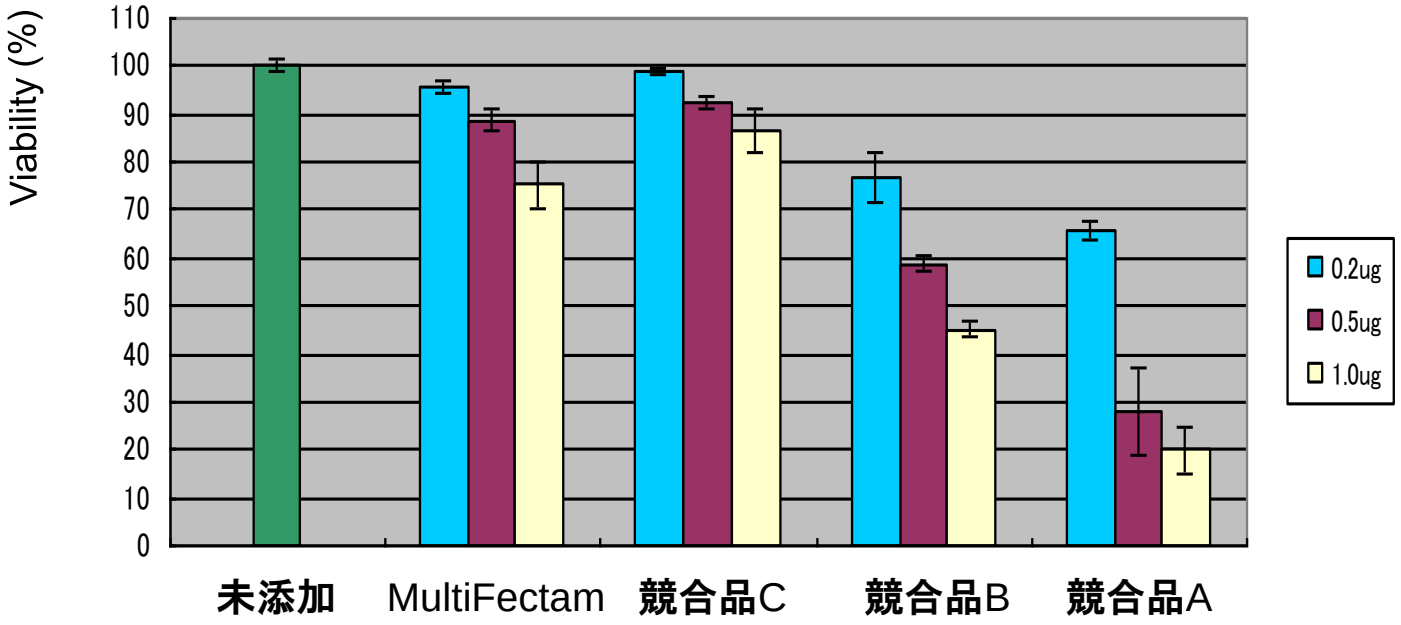
100倍

ルシフェラーゼ活性測定



他社製品との比較（毒性評価：NHDF-ad細胞）

トランスフェクションから48hr後、WST-8により測定
未添加を100%とした



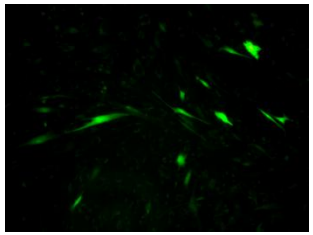
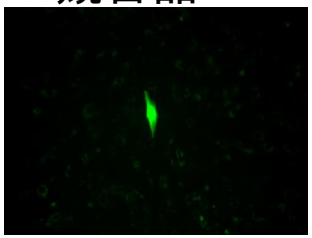
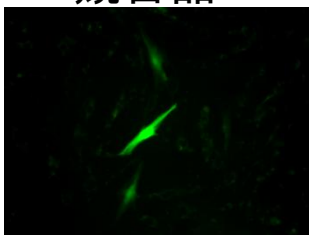
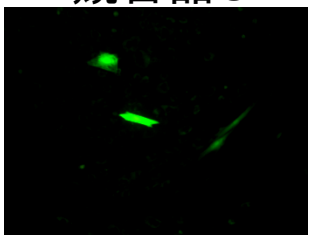
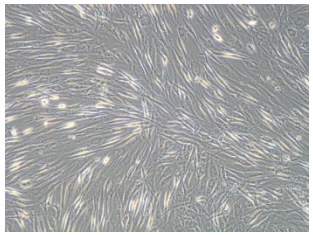
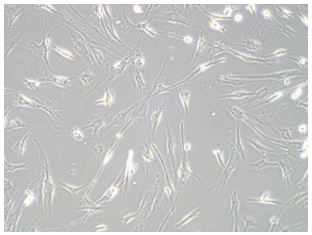
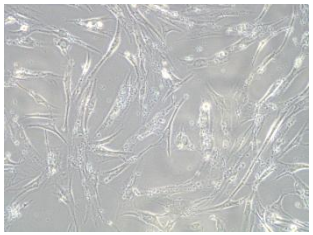
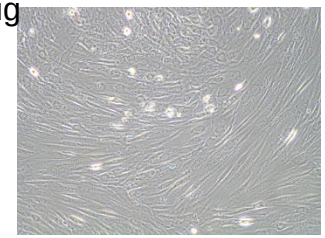
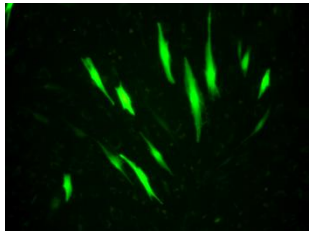
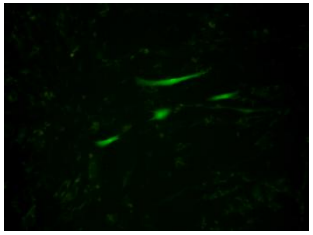
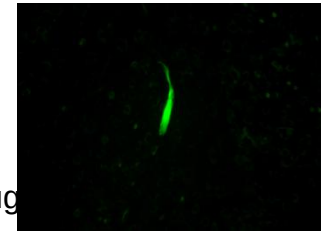
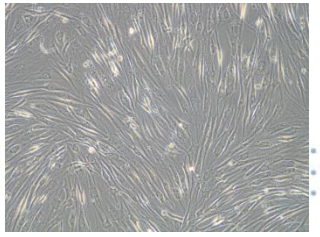
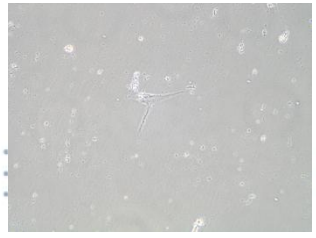
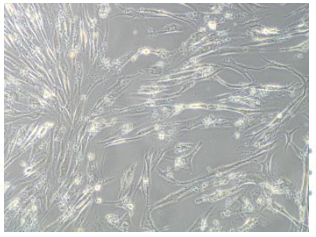
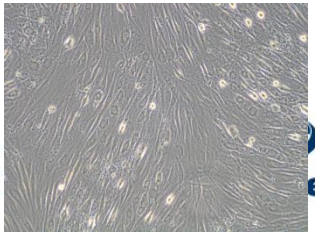
複数回トランスフェクション （NHDF-ad細胞）
[非ウイルス性ベクターを用いて、iPS細胞を作製する際に行われる]

GFP発現

1day → 3day → 5day → 7day

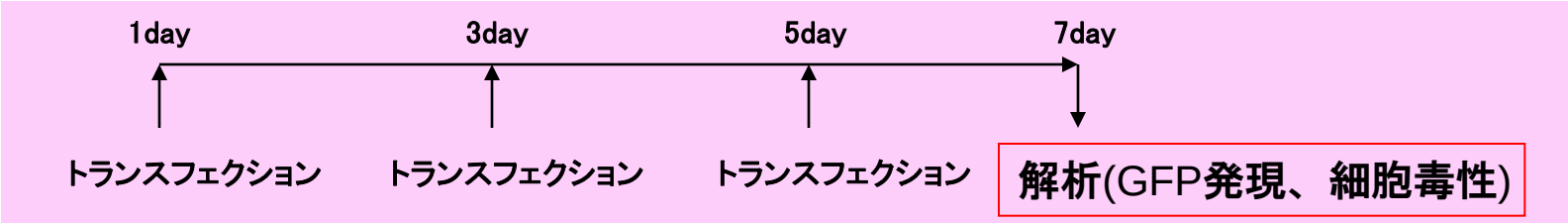
トランスフェクション　トランスフェクション　トランスフェクション　解析(GFP発現、細胞毒性)

7day

	MultiFectam	競合品A	競合品B	競合品C
DNA= 0.5ug		0.2ug 	0.5ug 	0.5ug 
				
DNA= 1.0ug		1.0ug	1.0ug 	1.0ug 
				

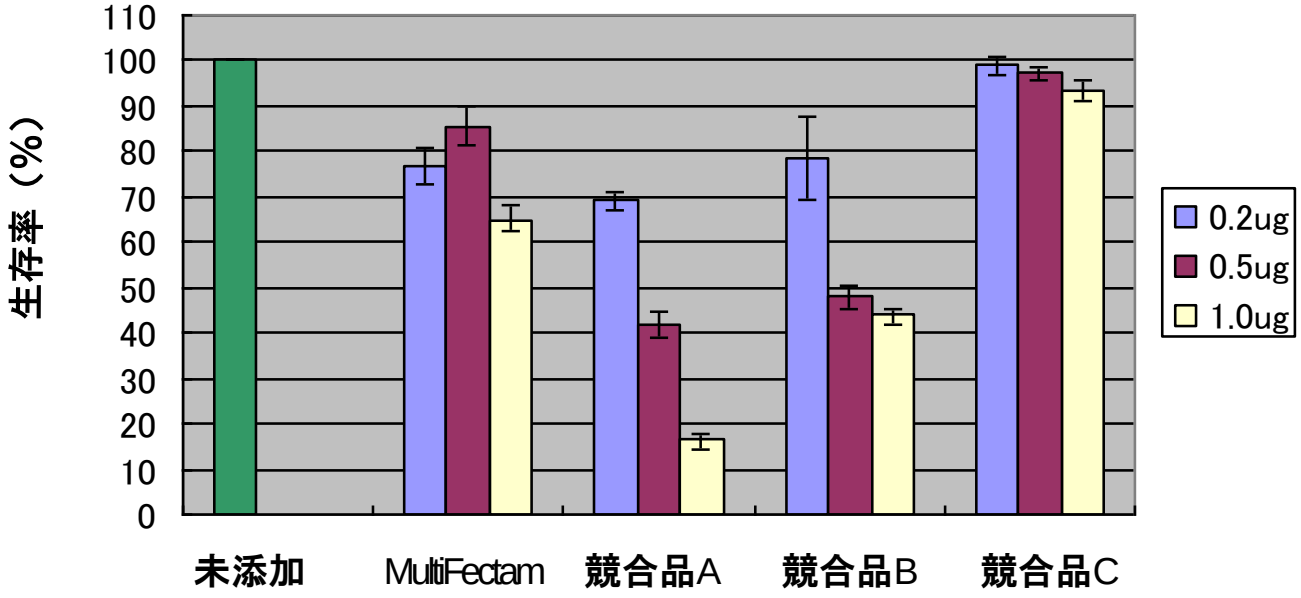
100倍

複数回トランスフェクション（NHDF-ad細胞）



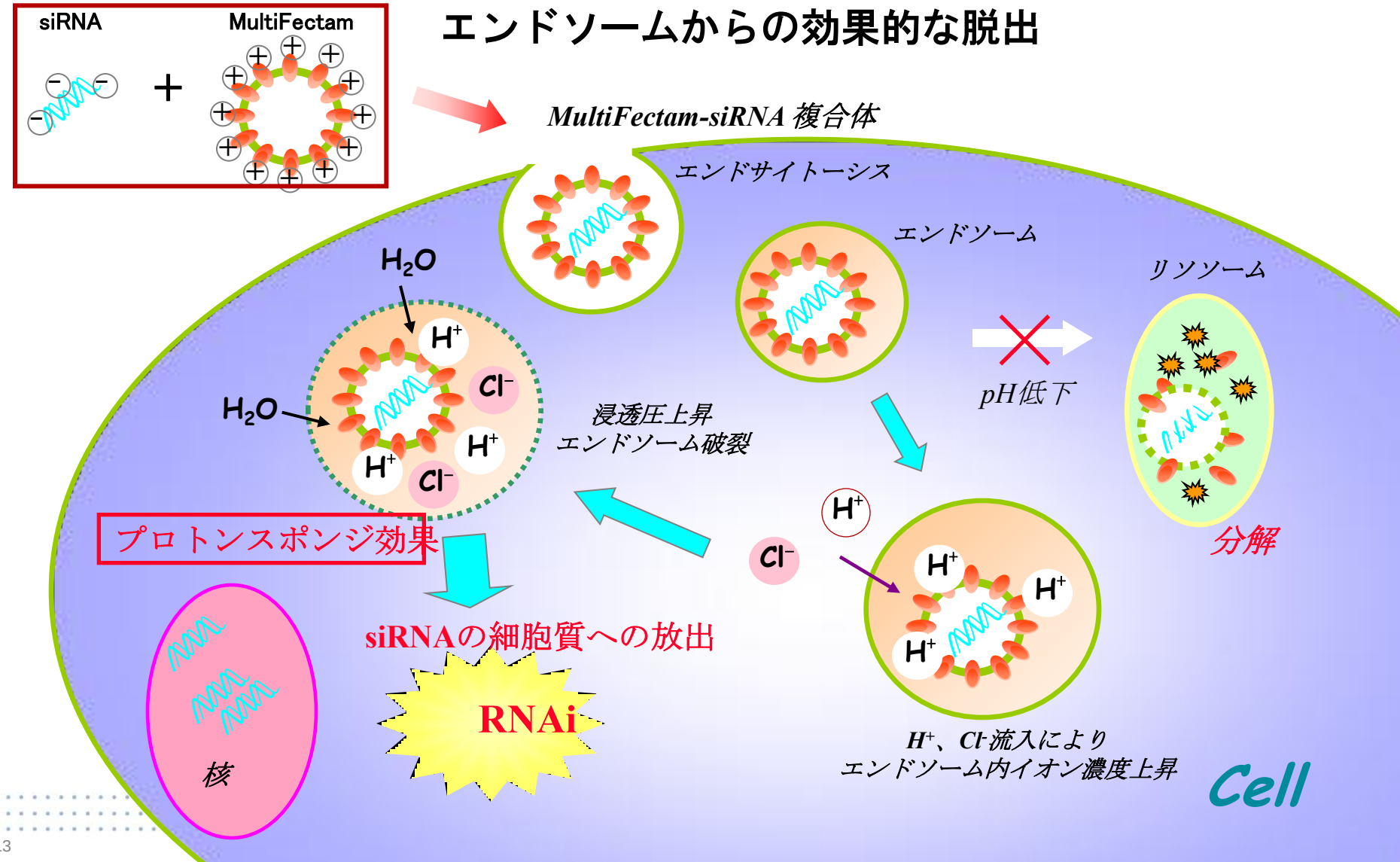
7day

細胞毒性（WST-8)



siRNA導入メカニズム

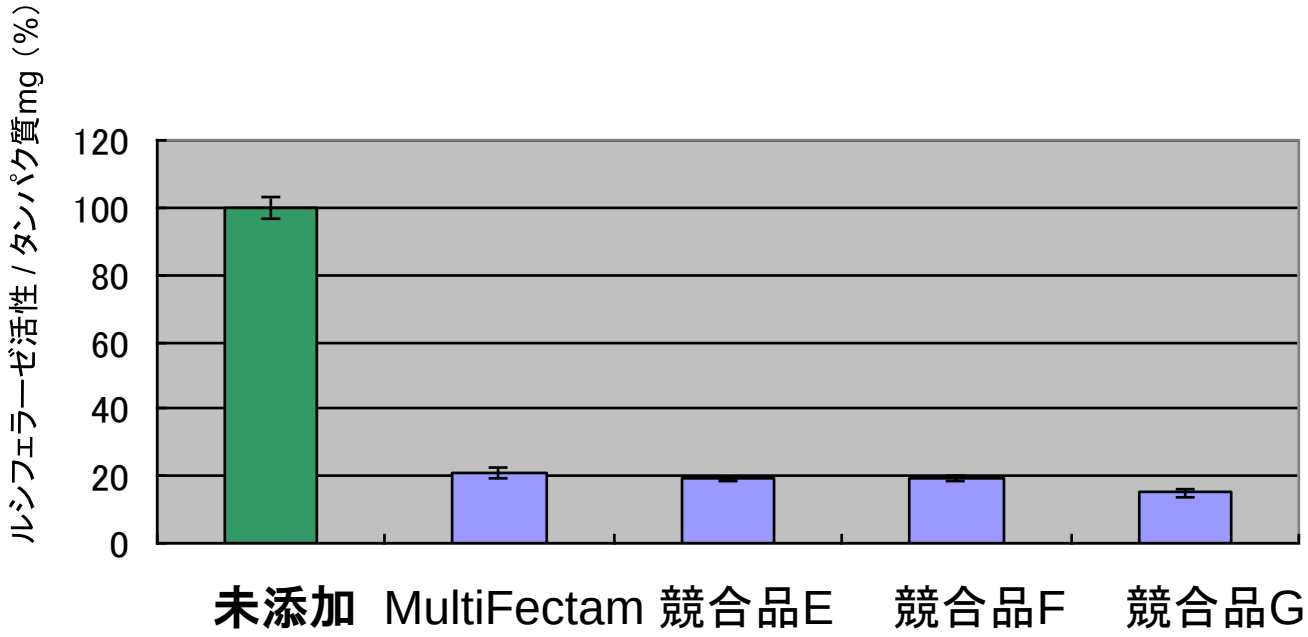
プロトンスポンジ効果と**膜融合能**の**相乗効果**による
エンドソームからの効果的な脱出



他社製品との比較（ルシフェラーゼ活性）

細胞：ルシフェラーゼ定常発現細胞（HeLa-S3）
siRNA：ルシフェラーゼsiRNA 20pmol / 24well

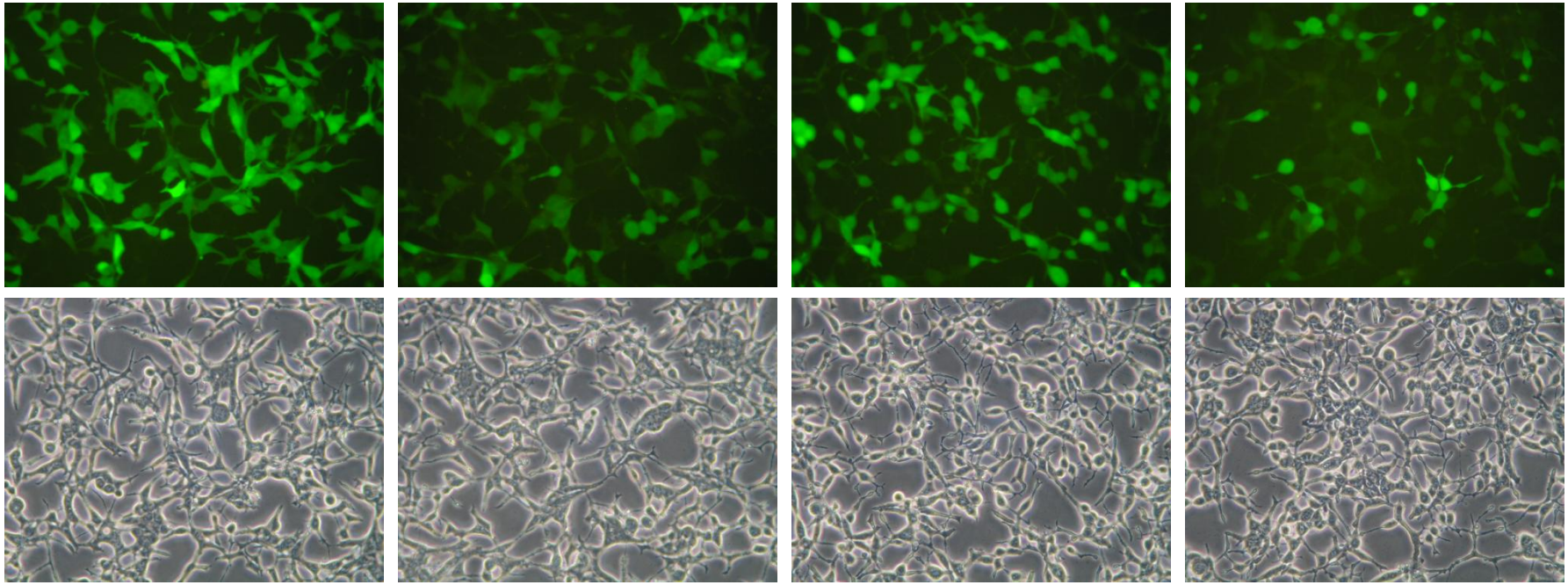
未添加の細胞の活性を100%とした



他社製品との比較（ＧＦＰ発現）

(GFP siRNA 20pmol/48well plate, LNCap細胞(GFP-luc^{+}定常発現株), 48hr後)

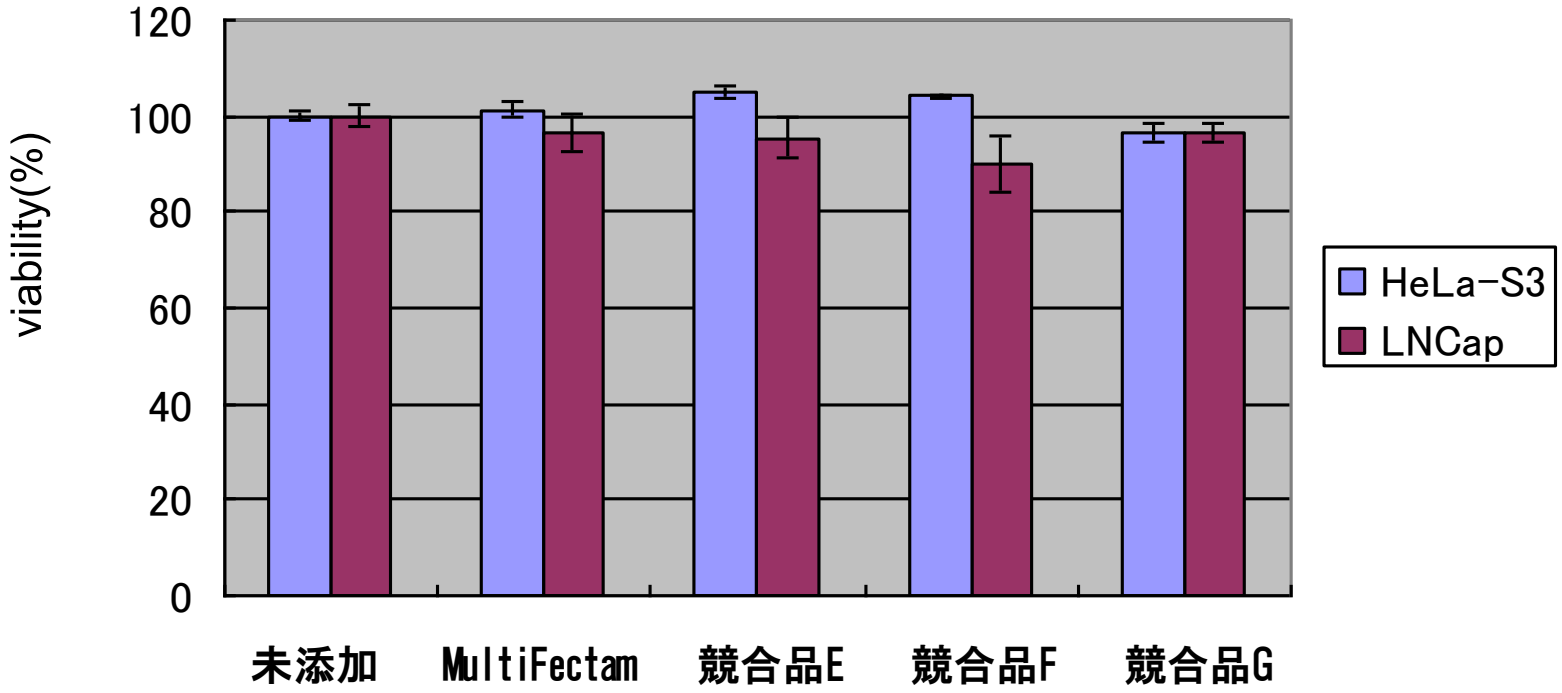
未添加	MultiFectam	競合品E	競合品G



×200

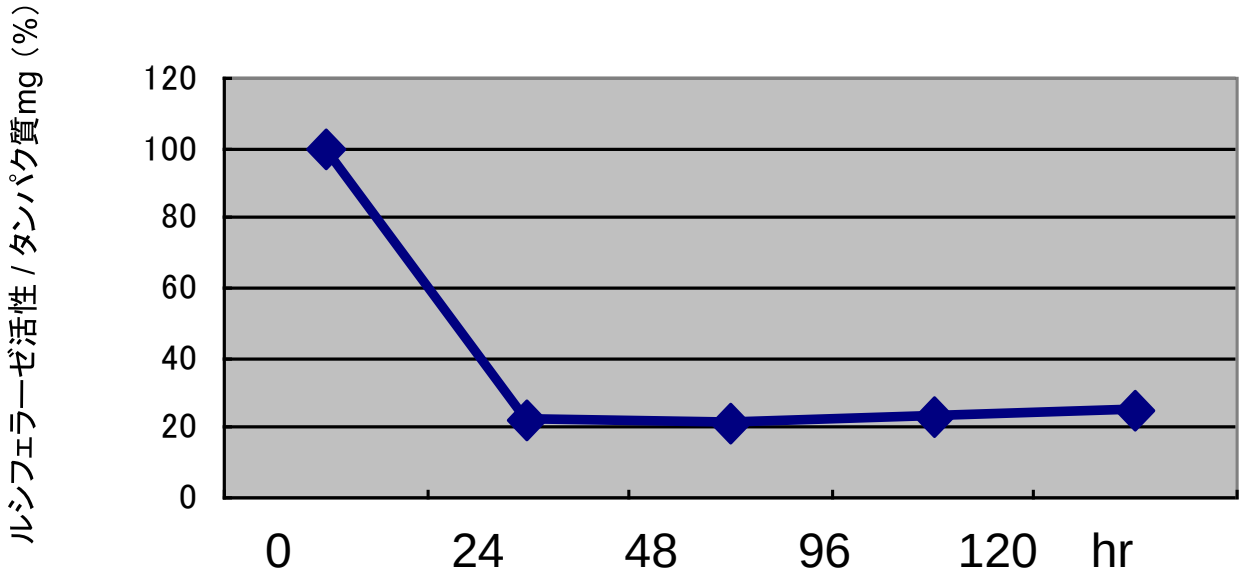
他社製品との比較（細胞毒性）

WST-8により、細胞毒性を評価した
未処理の細胞を100%とする
HeLa-S3,LNCap細胞について評価を行った



ノックダウン効果の経時的データ（持続性）

細胞：ルシフェラーゼ定常発現細胞（HeLa-S3）
siRNA：ルシフェラーゼsiRNA 20pmol / 24well
未処理の細胞の活性を100%とした



MultiFectamの特徴

高い発現効率

・ 多くの細胞種で、高い発現効率を有することを確認

浮遊細胞、正常細胞でも高い発現効率

株化細胞　：　COS7, HeLa-S3, A549, U2OS, SKOV3, CHO, Balb3T3, K562, Jurkat
初代培養細胞　：　NHDF-ad

・ 他社製品と比べ、同等以上の発現効率

低毒性

・発現効率が高い条件において、80%以上の細胞生存率

siRNA にも使用可能

・他社製品と同等のノックダウン効果を有する

1）　新規メカニズム

プロトンスポンジ効果＋膜融合による効率的なエンドソームからの脱出

2）　血清・抗生物質存在下でも導入可能

3）　生物由来成分を含まない（非ウイルス系ベクター）

4）　操作が簡便

Promega