

遺伝子を導入したい

使用製品

HilyMax

[H357]

I はじめに

細胞内へ遺伝子導入する方法の1つにリポフェクション法がある。本法による遺伝子導入は、簡便な操作で高い導入率を実現でき、更には低コストであるため、多岐にわたる動物細胞への遺伝子導入法として汎用されている。HilyMax(ハイリーマックス)は、新規に開発した陽イオン性合成脂質を使用したリポフェクション法による遺伝子導入試薬である(特許第4911416号)。増殖培地中の血清の影響を殆ど受けないため、遺伝子導入時の面倒な培地交換をする必要がなく、多岐にわたる細胞種へ高効率に遺伝子導入することができる(表1にHilyMaxによるDNA導入実績を示す)。またHilyMaxを用いて、siRNAを細胞内へ導入することにより、標的タンパクの発現抑制効果を確認することが出来る。さらには、siRNA及びpDNAを同時に遺伝子導入(コトランスフェクション)することも可能である。コトランスフェクション法では、標的タンパクを安定発現した細胞を必要としないため、簡便にsiRNAによるタンパク発現抑制効果を確認することが可能である。

II キット内容

HilyMax Reagent 1 tube
Lipoform Buffer 1.0 ml × 1

III 試薬調製並びに実験に必要なもの

1. 試薬調製

Lipoform Buffer 1.0 ml を HilyMax Reagent のチューブに添加し、ボルテックスにより 30 秒間攪拌し、HilyMax 溶液(リポソーム)を調製する。攪拌後は、チューブ底部のフィルム状の固体が消失したことを確認する。不溶物が残存している場合は、再度完全に溶解するまでボルテックスにより攪拌を行う。

2. キット以外に必要なもの

無血清培地、DNA、siRNA、増殖培地、細胞、炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、倒立顕微鏡(蛍光)、オートクレーブ、マイクロプレート、マイクロピペッター、マイクロチューブ

IV GFP 発現 pDNA の導入例(CHO 細胞)

HilyMax を用いて、CHO 細胞へ DNA(hsGFP) を導入し、発現した hsGFP を蛍光顕微鏡にて観察する方法を紹介する。(24 ウェルプレート使用)

1. 細胞の準備

遺伝子導入時に細胞密度が 80% になるよう調整した CHO 細胞懸濁液(0.8 × 10⁵ cells/well) をプレートへ播種し、CO₂ インキュベーターにて一晩培養する。

表 1 HilyMax によるプラスミド DNA 導入実績

細胞名	由来	細胞名	由来	細胞名	由来
293	ヒト 腎臓	HEK293FT	ヒト 胎児腎細胞	MG63	ヒト 骨肉種
293T	ヒト 胎児腎臓	HEK293T	ヒト 胎児腎細胞	MKN	ヒト 胃
3T3-L1	マウス 胚	HeLa	ヒト 子宮頸癌	NB1	ヒト 神経芽細胞腫
A172	ヒト グリア芽腫	HeLaS3	ヒト 子宮頸癌	Neuro2a	マウス 神経系
A549	ヒト 肺上皮癌	HepG2	ヒト 肝臓 胆嚢	NIH3T3	マウス 胎仔
AGS	ヒト 胃上皮	HFL-1	ヒト 胎児 肺	PA-1	ヒト テラトカルシノーマ
ASPC1	ヒト 膵臓	HHStcC	ヒト 肝星細胞	PanC1	ヒト 膵臓癌
BmN	カイコ 卵巣	HT29	ヒト 結腸癌	PC12	ラット 副腎髄質
C2C12	マウス 骨芽	Human hepatic Stellate	ヒト 肝臓	PC3	ヒト 前立腺癌
Caco2	ヒト 腸管上皮	JHH-4	ヒト 肝臓, 胆嚢癌	Primary Osteoblast	初代骨芽細胞
CEF	ニワトリ 胚	Jurkat	ヒト 白血病性 T 細胞	RBL2H3	ラット 血球・リンパ系
CHO	チャイニーズハムスター 卵巣	K562	ヒト 血球・リンパ系	Sf9	ヤトウガ
CHO-S	チャイニーズハムスター 卵巣(浮遊)	KINGS1	ヒト グリア細胞	S2	シヨウジョウバエ
COS1	アフリカミドリサル 腎臓	L	マウス 線維芽	SHSY-5Y	ヒト 神経芽
COS7	アフリカミドリサル 腎臓	L6	ラット 筋組織	T98G	ヒト 脳グリオブラストーマ
COV	ニワトリ 卵巣	L929	ラット 繊維芽	U937	ヒト 単球性白血球
DT40	ニワトリ 血球・リンパ系	LMHI	ニワトリ 肝臓癌	UtSMC	ヒト 子宮平滑筋
DU145	ヒト 前立腺癌細胞	LNCap	ヒト 前立腺癌	Vero	アフリカミドリザル 腎臓
ECPC4		MC3T3-E1	マウス 骨芽細胞	VSMC	ラット 血管平滑筋
END-D	マウス 血管内皮	MCAS	ヒト 卵巣癌	マウス胎児海馬初代培養細胞	マウス 胎児海馬
H1395	ヒト 肺癌	MCF7	ヒト 乳癌	耳下腺腺房細胞初代培養	耳下腺腺房細胞
HaCaT	ヒト 皮膚角化細胞	MDCK	イヌ 腎臓		
HC	ヒト 胎児肝臓	Mesenchymal cell	ヒト 間葉系幹		
HEK293	ヒト 胎児腎臓	MEF	マウス 胎児由来線維芽細胞		

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

2. DNA-HilyMax 複合体の調製



- 1) 無血清培地 30 μ l をマイクロチューブに用意する。
- 2) DNA(hsGFP) 1.0 μ g を添加、ピペッティングにより混合する。
- 3) HilyMax 溶液 5 μ l を添加、ピペッティングにより混合する。
- 4) 室温にて 15 分間静置する。

3. 細胞への添加

インキュベーション後の DNA-HilyMax 複合体を 1. で準備した CHO 細胞へ添加し、プレートを穏やかに振とうする。

4. 細胞の培養

CO₂ インキュベーターにて細胞を 24 時間培養する。

5. 遺伝子導入評価

GFP 発現活性を蛍光顕微鏡下で観察する。

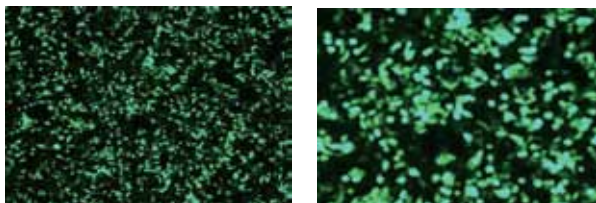


図 1 hsGFP を発現させた CHO 細胞の蛍光顕微鏡像 (B 励起)

V siRNA 導入例 (CHO 細胞)

GFP を安定発現した CHO 細胞へ、HilyMax を用いて GFP 特異的な siRNA (siRNA-GFP) をトランスフェクションし、GFP の発現抑制効果について確認する方法を紹介する。

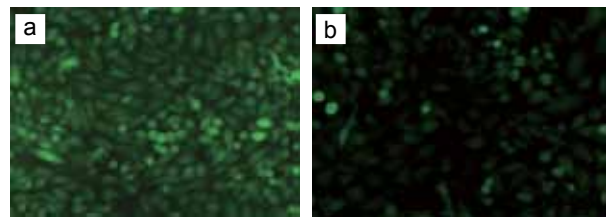
(24 ウェルプレート使用)

1. 細胞の準備

遺伝子導入時に細胞密度が 50% になるよう調整した GFP 安定発現 CHO 細胞の懸濁液 (0.5 \times 10⁵ cells/well) を 24 ウェルプレートへ播種し、CO₂ インキュベーターにて一晩培養する。

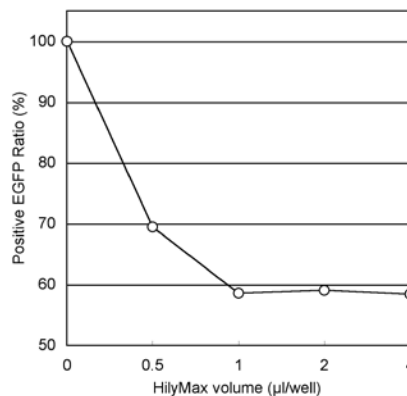
2. DNA-siRNA-HilyMax 複合体の調製

- 1) 無血清培地 30 μ l をマイクロチューブに用意する。
- 2) 上記培地に siRNA-GFP (Control siRNA duplex, Jellyfish GFP, NIPPON GENE CO., LTD.) 10 pmol を添加し、ピペッティングにより混合する。
- 3) 上記 siRNA 溶液に、HilyMax 溶液 0.5 ~ 4.0 μ l を添加し、ピペッティングにより混合する。
- 4) 室温にて 15 分間静置する。



a) GFP 発現 CHO 細胞 (control)
b) siRNA:10 pmol, HilyMax:1 μ l

図 2 GFP 発現 CHO 細胞に siRNA-GFP を導入したときの蛍光顕微鏡像



HilyMax を用いて siRNA-GFP を導入することにより、顕著な GFP 発現抑制効果を確認することができた。

図 3 siRNA 導入による GFP ノックダウン効果

3. 細胞への添加

インキュベーション後の siRNA-HilyMax 複合体を 1. で準備した細胞へ添加し、プレートを穏やかに振とうする。

4. 細胞の培養

CO₂ インキュベーターにて、細胞を 24 時間培養する。

5. 遺伝子導入評価

細胞内で発現した GFP を蛍光顕微鏡下で観察後、フローサイトメトリーにて、siRNA による GFP 発現抑制効果を確認する。

VI siRNA 導入例 (HeLa 細胞) (コトランスフェクション法)

siRNA と DNA を HilyMax により同時に細胞へトランスフェクションし、siRNA による目的タンパクの発現抑制効果を確認する方法をコトランスフェクション法という。コトランスフェクション法は、標的タンパクを安定発現する細胞を必要としないため、簡便に siRNA の能力を評価することが可能である。

ここでは Luciferase 発現 DNA と Luciferase 特異的な siRNA (siRNA-Luciferase) を HilyMax によりコトランスフェクションした際の、siRNA による Luciferase 発現の抑制効果を確認する方法を紹介する。(24 ウェルプレート使用)

コトランスフェクションを行う際は、DNA のみを導入した時のタンパク発現量と、DNA と Luciferase 非特異的な siRNA (siRNA-control) を導入した時のタンパク発現量が同等である必要がある。さらに、これらのタンパク発現量と、siRNA-Luciferase を導入した時のタンパク発現量を比較し、タンパク発現抑制効果を確認する。

1. 細胞の準備

遺伝子導入時に細胞密度が50%になるよう増殖用培地で調整したHeLa細胞懸濁液0.5 mlを24ウェルプレートへ播種し、CO₂インキュベーターにて一晩培養する。

2. DNA-siRNA-HilyMax 複合体の調製

- 1) 抗生物質を含まない無血清培地 30 μl を別途容器に用意する。
- 2) 無血清培地に、DNA(Luciferase Reporter VectorspGL3, Promega)1 μg を添加する。
- 3) 上記 DNA 溶液に、siRNA-control(siCONTROL Non-Targeting siRNA #1, DHARMACON)、siRNA-Luciferase(anti-lucsiRNA-1, DHARMACON) をそれぞれのチューブに 10 pmol ずつ添加し、ピペティングにより混合する。
- 4) 上記 DNA-siRNA 溶液に、HilyMax 溶液 3 ~ 7 μl を添加し、ピペティングにより混合する。
- 5) 室温にて 15 分間静置する。

3. 細胞への添加

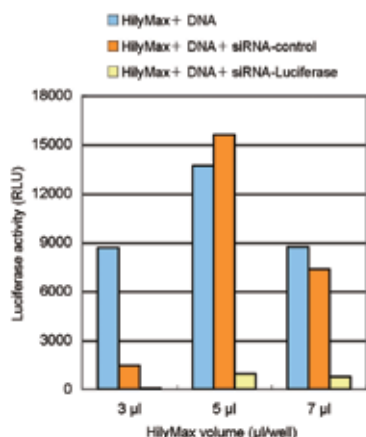
インキュベーション後の DNA-siRNA-HilyMax 複合体を 1. で準備した細胞へ添加し、プレートを穏やかに振とうする。

4. 細胞の培養

CO₂インキュベーターにて、細胞を 24 時間培養する。

5. 遺伝子導入評価

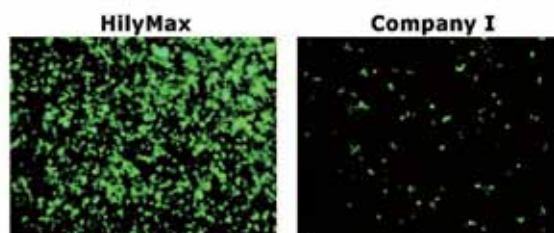
発現した Luciferase 活性を測定する。



HilyMax 5 μl 及び 7 μl の条件で、DNA のみと DNA + siRNA-control を導入した細胞の Luciferase 活性が同等であった。また同条件下で siRNA-Luciferase を導入した細胞では、顕著な Luciferase 活性の低下がみられた。これにより siRNA-Luciferase の Luciferase 発現抑制効果を確認することができた。

図 4 siRNA-Luciferase 導入による抑制効果

VII GFP 発現の pDNA の導入例 (S2 細胞)



- Culture Condition
- Cell : S2(Schneider 2) cell, 200,000 cells/well
 - Media : Schneider's Drosophila medium with 10% FCS
 - Antibiotics : 50 units Penicillin/ml, 20 μg Streptomycin/ml
 - Microplate : 24-well plate
- Transfection Condition
- Vector : 1 μg/well [pAct Gal4(6 kb), pUAS-mCD8::GFP(10 kb)]
 - Reagent : 5 μl/well
 - DNA-HilyMax 複合体の調製用培地 (添加剤) : Schneider's Drosophila medium (without serum and antibiotics)
 - 遺伝子導入後の培地交換 : 有 (4 時間後)
- * 培地交換を行っていただくことで、導入効率の向上が認められます。

図 5 昆虫細胞 (S2 cell) における導入事例 (データ提供 : Max Planck Institute of Neurobiology, Dr. Takashi Suzuki)

VIII 注意事項

- 1) 購入後は、0 ~ 5°C で保存してください。Lipoform Buffer にてリボソーム溶液を調製後は、-20°C で保存してください。調製後 6 ヶ月間安定です。リボソーム溶液を頻繁に使用する際は、0 ~ 5°C 保存も可能です。0 ~ 5°C で、1 ヶ月間安定です。
- 2) 凍結した HilyMax を融解後は、必ずボルテックス又はピペティングにより、良く混合してご使用下さい。HilyMax は、20 回の凍結融解を繰り返しても、導入能に変化がないことを確認しております。また凍結融解の繰り返しの避けたい場合は、滅菌済みチューブへ HilyMax を小分けして、ご使用下さい。
- 3) 使用する細胞種および細胞の状態により、最適な遺伝子導入条件が異なります。初めて HilyMax を使用する際は、最適な遺伝子導入条件 (細胞密度、DNA 量、siRNA 量、HilyMax 量) を確認する必要があります。

ホームページに細胞種毎プロトコルを掲載いたしております。是非そちらもご覧ください。

<http://www.dojindo.co.jp/whatsnewsj/newpro/hilymax.html>

HilyMax 同仁 検索

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料