



SugarFect®は、多糖をベースに開発された安全で細胞毒性が低い *in vitro* 用の新規遺伝子導入試薬です。カチオン化した多糖は、アニオン性の核酸物質(プラスミド DNA など)とコンプレックスを形成し、これまでの細胞表面との静電的相互作用に加え、糖鎖認識レセプターを介して細胞へ遺伝子を導入するため、糖鎖認識レセプターをもつ細胞、特に幹細胞や肝細胞に細胞特異的な高い遺伝子導入効率を示します。

保存条件: 購入後は 4℃で保存してください。4℃保存の場合、試薬ラベルに記載されている有効期限内は安定です。
注意事項: 初めてご使用になる場合は以下の項目にご注意の上、最適条件をご検討ください。なお、このプロトコルは接着細胞に遺伝子を導入する為に書かれています。現時点では浮遊細胞に関するデータはありません。

細胞状態	対数増殖期の細胞をご使用ください。培養細胞は 60-70% コンフルエントの状態にあるものを、初代培養細胞はほぼコンフルエントの状態にあるものをご使用ください。
プラスミド DNA	純度の高いもの(Abs260nm/Abs280nm=1.7-1.9)をご使用ください。TE バッファーはコンプレックス作製、細胞への取り込みを阻害する場合がありますので、プラスミド DNA を PBS(-)で溶解することを推奨します。(使用濃度 = 100µg/ml)
SugarFect (カチオン化多糖)	使用する細胞種、プラスミドによって最適使用量が異なります。初めてご使用になる場合は SugarFect:DNA 比(N/P 比 [※])=1~3 の範囲で遺伝子導入を行い条件検討をしてください。(希釈方法は次ページにある表 1 を参照して下さい。) 通常は N/P 比=1~3 が最適です。希釈は滅菌済み超純水 (または 2 回蒸留水) で行って下さい。
遺伝子導入時に使用する培地	基本的には無血清培地中で遺伝子導入を行って下さい。(抗生物質入りの無血清培地も使用できます。) 本品は多糖-糖鎖認識レセプターとの相互作用に加えて、従来の細胞表面の負電荷との静電的相互作用も関係しているため、血清中の負電荷をもつタンパク (e.g. アルブミン) と相互作用して、血清存在下では遺伝子導入率が低下します。

※N/P 比 = (SugarFect 試薬のアミノ基モル数)/(プラスミド DNA のリン酸基モル数)

操作手順: このプロトコルは 12 ウェルプレートを使用して遺伝子導入実験を行う場合での条件を示します。その他の培養プレートでの使用条件は付録の表 2 を参考にして下さい。

実験を始める前に準備するもの

- 1) 滅菌済みの超純水 (または 2 回蒸留水)
- 2) PBS(-)(ダルベッコリン酸バッファー)
 - ▶ 成分組成は付録に記載してあります。
- 3) 無血清培地 (Opti-MEM でも可)
- 4) 増殖用培地
- 5) 滅菌済み 1.5 ml エッペンチューブ
- 6) 12-ウェルプレート

1. 遺伝子導入実験前日: 細胞の準備

- ▶ 細胞数をカウントする。ラット骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の場合は 5×10^4 cells/ml に増殖用培地(αMEM+15%FCS + 1%抗生物質)で調製し、1ml/well ずつ播種する。24 時間培養すると遺伝子導入時に細胞密度が 80%コンフルエントとなる。

※ HeLa や HepG2 の場合は 1.25×10^5 cells/ml に増殖用培地で調製し、1ml/well ずつ播種する。

2. 遺伝子導入実験当日

- 1) SugarFect-DNA のコンプレックス作製
 - ▶ SugarFect 試薬を滅菌済み超純水で最適 N/P 比に希釈する。
 - ▶ 滅菌済みエッペンチューブに 25µl のプラスミド DNA(100µg/ml)を加える。次に 25µl の最適 N/P 比に希釈された SugarFect 試薬を一滴ずつ滴下する。(混合量は 1 well 分です。)
 - ※ 加える順序を逆にすると導入効率に影響するので、必ずプラスミド DNA 溶液に SugarFect

試薬を加えてください。

- ▶ コンプレックス作製のためにチューブを適度にタッピング攪拌し、室温で 15 分間静置する。

2) 無血清培地に交換

- ▶ コンプレックス作製のため 15 分間静置中に、前日から培養している細胞の培地を吸引除去し、500µl/well の PBS(-)を加えて洗浄する。PBS(-)を吸引除去し、500µl/well ずつ無血清培地(αMEM+1%抗生物質)を加える。
- ※ HeLa や HepG2 等の樹立細胞株には無血清培地に Opti-MEM 使用も可。

3) 遺伝子導入(トランスフェクション)

- ▶ 無血清培地に交換後 50µl/well の SugarFect-DNA コンプレックスを加え、コンプレックス溶液が均一に行き渡るよう軽くプレートを振り、6 時間通常の培養条件(e.g. 37℃, 5%の CO₂ インキュベータ内)で培養する。

4) 遺伝子導入後の培地交換

- ▶ 遺伝子導入開始 6 時間後に無血清培地と SugarFect-DNA コンプレックスを吸引除去し、500µl/well の PBS(-)を加えて洗浄する。PBS(-)を吸引除去し、1ml/well の増殖用培地を加える。

5) 遺伝子発現解析時まで細胞培養

- ▶ 発現解析時まで通常の培養条件(e.g. 37℃, 5%の CO₂ インキュベータ内)で培養する。

3. 遺伝子発現解析

- ▶ 導入した遺伝子の機能・発現量を蛍光顕微鏡、リポーターアッセイ等で評価する

実験条件の最適化の為に

SugarFect 遺伝子導入試薬は、実験条件の最適化の為に滅菌済みの超純水で表1のように希釈し、プラスミド DNA(100 µg/ml)と一対一の比率(v/v)で混合(e.g. プラスミド DNA 25µl + SugarFect 希釈液 25µl)させて作製した SugarFect-DNA コンプレックスを用いて遺伝子導入の予備実験を行ってください。予備実験で一番良い導入率・発現率を示した SugarFect : DNA 比(N/P 比)を遺伝子導入実験にご使用ください。

表1 SugarFect の希釈方法

SugarFect の希釈			使用量(µl/well)及び相当する N/P 比		
SugarFect	滅菌済み超純水	Total Vol.	SugarFect 希釈液	DNA 溶液	相当する N/P 比
10 µl	90 µl	100 µl	25µl	25µl	= 1 : 1
20 µl	80 µl	100 µl	25µl	25µl	= 2 : 1
30 µl	70 µl	100 µl	25µl	25µl	= 3 : 1

付録

PBS(-) (ダルベッコリン酸バッファー) (成分組成) 9.6 g (1L) 中

塩化ナトリウム.....8,000 mg

塩化カリウム.....200 mg

リン酸一水素ナトリウム(無水).....1,150 mg

リン酸二水素ナトリウム(無水).....200 mg

上記の成分を蒸留水に溶解して、全量を 1,000 mL とし、121°Cで 15 分間加圧蒸気滅菌またはろ過滅菌する。

表2 培養プレートごとの使用量

培養容器	培養面積	細胞の播種	無血清培地	SugarFect-DNA コンプレックス 添加量	コンプレックス作製の為の SugarFect 希釈液と DNA 溶液の混 合量 (Vol./well)	
					SugarFect 希釈液	DNA 溶液 (DNA 量)
96 well	0.3 cm ² /well	100µl/well	50µl/well	10µl/well	5.0µl	5.0µl (0.5 µg)
24 well	1.9 cm ² /well	500µl/well	200µl/well	25µl/well	12.5µl	12.5µl (1.25µg)
12 well	3.8 cm ² /well	1ml/well	500µl/well	50µl/well	25.0µl	25.0µl (2.5 µg)
6 well	9.5 cm ² /well	2ml/well	1ml/well	100µl/well	50.0µl	50.0µl (5.0µg)
35 mm	8.0 cm ² /plate	2ml/well	1ml/plate	100µl/well	50.0µl	50.0µl (5.0µg)
60 mm	21.0 cm ² /plate	4ml/well	2ml/plate	300µl/well	150.0µl	150.0µl (15.0µg)
100 mm	55.0 cm ² /plate	10ml/well	6ml/plate	700µl/well	350.0µl	350.0µl (35.0µg)

表3 導入実績のある細胞

幹細胞	ラット骨髄由来間葉系幹細胞(MSC) ^{1,2} 、脂肪由来間葉系幹細胞、ES 細胞
がん細胞	HeLa、Hep G2 ³ 、T24 ⁴
その他	マクロファージ、ラット骨髄由来樹枝状細胞(DC)

引用文献

1. 城潤一郎・田畑泰彦 5. 多糖 原島秀吉・田畑泰彦 (編) ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法、技術、方法論の新たな展開 株式会社メディカルドゥ, 2006 pp. 50-55.

2. Okazaki A, Jo J. and Tabata Y. A reverse transfection technology to genetically engineer adult stem cells. Tissue Engineering 2007 13(2): 245-251.

3. Jo J, Ikai T, Okazaki A, et al. Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of spermine introduced. J. Control. Release 2007 118(3): 389-398.

4. Kanatani, I, Ikai T, Okazaki A, et al. Efficient gene transfer by pullulan-spermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms. J. Control Release 2006 116(1): 75-82.

参考文献

1. Jo J, Nagaya N, Miyahara Y, et al. Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. Tissue Engineering 2007 13(2): 313-322.

MedGEL

info@medgel.jp

株式会社メドジェル

本社： 〒612-8043 京都市伏見区本材木町 668-3

TEL : 075-621-3179 FAX : 075-203-6729

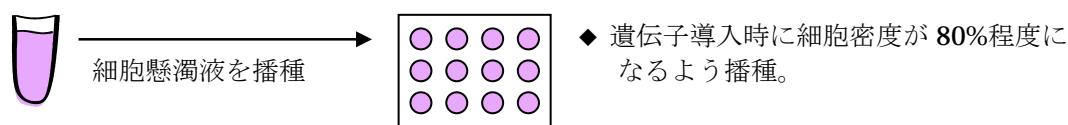
彩都ラボ：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15

TEL : 072-641-6690 FAX : 072-641-1016

SugarFect[®] 遺伝子導入実験手順

1. 遺伝子導入実験前日：細胞の準備

1) セルカウント&細胞の播種



24 時間培養

2. 遺伝子導入実験当日

1) SugarFect と DNA のコンプレックス作製

① プラスミド DNA 溶液を加える

(PBS(-)に溶解)

プラスミド DNA
(100 µg/ml)

② SugarFect 試薬を滅菌済み超純水で希釈する

滅菌済み超純水で最適
N/P 比に希釈

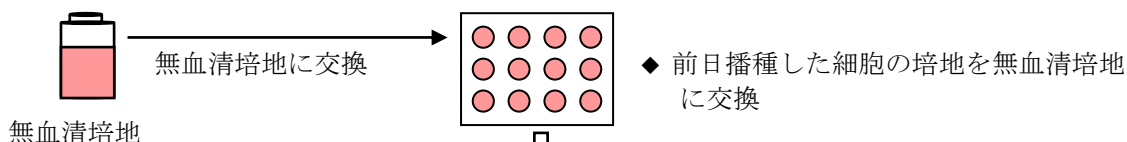
SugarFect

③ プラスミド DNA 溶液に、同分量(v/v)の最適 N/P 比に希釈された SugarFect 試薬を滴下する

④ SugarFect-DNA コンプレックス作製： チューブを適度にタッピングして攪拌

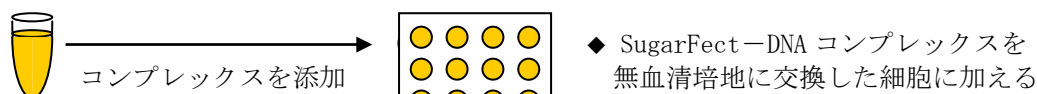
コンプレックス作製の為室温で 15 分間静置中に 2)へ

2) 無血清培地 (e.g. Opti-MEM) に交換



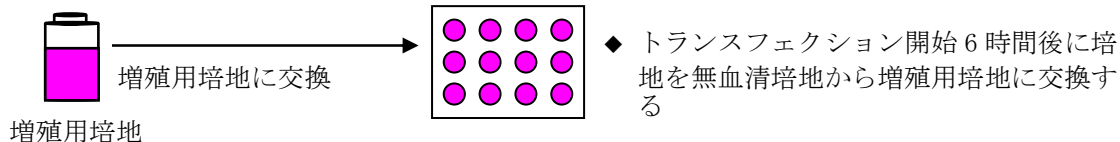
無血清培地に交換直後

3) トランスフェクション(遺伝子導入)



6 時間通常の培養条件で細胞を培養

4) トランスフェクション後培地交換



5) 細胞培養

遺伝子発現解析時まで通常の培養条件で細胞を培養する (e.g. 24 時間)

3. 遺伝子発現解析：導入した遺伝子の機能・発現量の解析

◆ e.g. ルシフェラーゼアッセイ、蛍光顕微鏡下での観察

Substrate-mediated transfection (Subfection[®]法)

幹細胞、初代細胞に適した新規リバーストランスフェクション法 ver.6

Subfection 法はメドジェル独自のコーティング溶液と細胞接着因子を用いた新しい遺伝子導入方法です。通常の遺伝子導入方法と異なり、遺伝子導入試薬をコートしたプレートに細胞を播種しますので、遺伝子導入前に細胞を播種しておく必要がありません。また血清存在下での遺伝子導入が可能です。

* 本プロトコルをお試しいただく場合には、あらかじめ細胞接着因子(プロネクチン wako #639-02771 あるいはフィブロネクチン wako #306-13403)をご用意ください。

操作手順: このプロトコルは 12 ウェルプレートを使用して遺伝子導入実験を行う場合での条件を示します。その他の培養プレートでの使用条件はもう 1 枚のプロトコル付録の表 2 を参考にしてください。

実験を始める前に準備するもの

- 1) 細胞接着因子
(プロネクチンあるいはフィブロネクチン)
- 2) 滅菌済みの超純水
- 3) PBS(-) (成分組成は付録に記載)
- 4) 増殖用培地
- 5) 滅菌済み 1.5 ml エッペンチューブ
- 6) 12-ウェルプレート

1) コーティング溶液の作製と塗布

- ▶ ReagentA は使用前に 37°C で温めておく
- ▶ コーティング溶液を 1 ウェルあたり下記の表に従って調整する。

ReagentA	20 μ l
細胞接着因子 (1mg/ml)	40 μ l
PBS(-)	340 μ l
合計	400 μ l

- ▶ 12 ウェルプレートにコーティング溶液を入れ、37°C で 1.5 時間静置する。

2) SugarFect-DNA のコンプレックス作製

- ▶ 表 1 に従って SugarFect 試薬を滅菌済み超純水で希釈する。
- ▶ 滅菌済みエッペンチューブに 25 μ l のプラスミド DNA(100 μ g/ml) を入れる。次に 25 μ l の希釈済み SugarFect 試薬を一滴ずつ滴下する。(混合量は 1 well 分です。)
※ 加える順序を逆にすると導入効率に影響します。必ずプラスミド DNA 溶液に SugarFect 試薬を加えてください。
- ▶ チューブを軽くタッピング攪拌し、室温で 15 分間静置する。

3) SugarFect-DNA コンプレックスのコーティング

- ▶ 12 ウェルプレートからコーティング溶液を吸引除

去し、500 μ l/well の PBS(-) を加えて洗浄する。

- ▶ 作製した SugarFect-DNA コンプレックス溶液に 350 μ l の PBS(-) を加え希釈する。
- ▶ プレート中の PBS(-) を吸引除去し、希釈した SugarFect-DNA コンプレックス溶液を加え、37°C で 30 分間静置する。

4) 細胞の播種

- ▶ プレートから SugarFect-DNA コンプレックス溶液を吸引除去し、播種後 50~60%コンフルエントになるように細胞を播種する。

5) 細胞の培養

- ▶ 通常の培養条件 (e. g. 37°C, 5%の CO₂ インキュベータ内) で培養する。

6) 遺伝子発現解析

導入した遺伝子の機能・発現量を蛍光顕微鏡、リポーターアッセイ等で評価する。

(参考) 幹細胞で Subfection を行う場合は N/P 比=3 が標準となります。以下の表に従って SugarFect-DNA コンプレックスを調整してください。

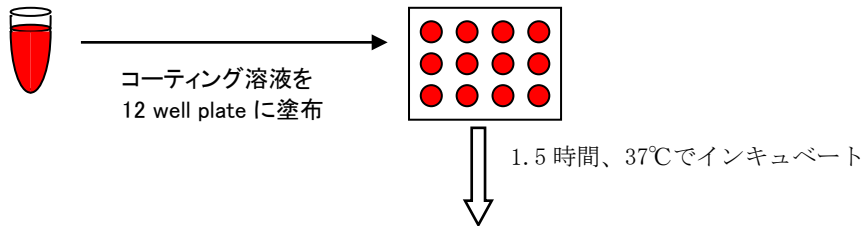
(N/P 比=3 の場合 total 50 μ l/well)

SugarFect	7.5 μ l
滅菌済み超純水	17.5 μ l
DNA 溶液 (100 μ g/ml)	25 μ l

備考

- ・ 従来の遺伝子導入法のプロトコルも参照してください。
- ・ コーティングする際に、well が完全に乾かないように注意してください。
- ・ 培地は、増殖用培地を使用してください。無血清培地を使用する必要はありません。
- ・ このプロトコルは開発中のものです。予告なく変更になる可能性があります。

コーティング溶液の作製と塗布



SugarFect-DNA のコンプレックス作製と塗布

①プラスミド DNA 溶液を加える



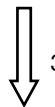
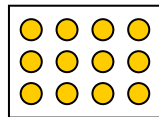
②滅菌済み超純水で SugarFect を希釈



③希釈した SugarFect をプラスミド DNA に滴下、
タッピングし、15 分間静置しコンプレックスを作製



④コンプレックスを希釈し、12 well plate に塗布



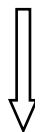
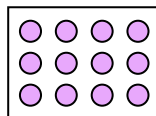
30 分間、37°C でインキュベート

細胞の播種

セルカウント & 細胞の播種



細胞懸濁液を播種



通常の培養条件で培養
(e.g. 37°C、5%の CO₂ インキュベータ内)

遺伝子発現解析

e.g. ルシフェラーゼアッセイ、蛍光顕微鏡下での観察