

細胞導入試薬

コード番号：160-0526-0, 160-0518-0

Prote-in Transfection Reagent

はじめに

本製品はタンパク質を様々な哺乳動物由来の培養細胞中へ効率的に導入できるトランスフェクション試薬です。本トランスフェクション試薬は CPP (Cell Penetrating Peptide) と疎水性に富んだ領域からなる 30 mer のポリペプチドで、タンパク質と疎水的に結合し細胞内に取り込まれます。また、本複合体は共有結合しないため、導入されたタンパク質は細胞内で機能を発揮することが確認されています。本製品は細胞毒性が低く、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法のように細胞膜に損傷を与えることなく目的タンパク質を細胞内に導入できるとともに、導入効率はそれらの方法と比較しても極めて良好です。

特長

1. 操作は簡単・迅速です。
2. 複合体形成に 1 時間、細胞に添加後 3 時間でタンパク質の細胞内導入が確認されています。
3. 本キット推奨使用濃度では、細胞毒性は確認されていません。
4. 付着細胞、浮遊細胞の両方に使用できます。
5. 培地中の血清の影響を受けません。
6. 高分子量のタンパク質(465 kDa β -galactosidase)まで効率的に細胞内に導入できます。

キットの内容

Prote-in 凍結乾燥品 : 0.05 mg (6 反応) \times 4
 β -galactosidase 465 kDa : 0.10 mg (4 反応) \times 1

反応数は接着系細胞、6 ウェル細胞培養プレートもしくは 35 mm ディッシュを用いた β -galactosidase の導入プロトコル例を基準にしています。

β -galactosidase を細胞内に導入する場合の実験条件の目安と 1 キットの反応数

プレート or ディッシュ	有効培養面積 (mm ²)	細胞数	培地量 (mL)	Prote-in 必要量	タンパク質溶液	細胞添加複合体溶液 (μ L)	1キット当たりの反応数
96ウェルプレート	32	0.01×10^6	0.05	0.25 μ g / 5 μ L	0.75 μ g / 5 μ L	10	800反応
48ウェルプレート	75	0.02×10^6	0.1	0.5 μ g / 10 μ L	1.5 μ g / 10 μ L	20	400反応
24ウェルプレート	200	0.05×10^6	0.25	1.25 μ g / 25 μ L	3.75 μ g / 25 μ L	50	160反応
12ウェルプレート	401	0.1×10^6	0.5	2.5 μ g / 50 μ L	7.5 μ g / 50 μ L	100	80反応
6ウェルプレート	962	0.3×10^6	1.5	7.5 μ g / 150 μ L	22.5 μ g / 150 μ L	300	24反応
35mm ディッシュ	962	0.3×10^6	1.5	7.5 μ g / 150 μ L	22.5 μ g / 150 μ L	300	24反応
60mm ディッシュ	2827	0.7×10^6	3.5	17.5 μ g / 350 μ L	52.5 μ g / 350 μ L	700	10反応
100mm ディッシュ	7854	2.0×10^6	10	50 μ g / 1000 μ L	150 μ g / 1000 μ L	2000	4反応

Prote-in 原液の調製および保存

凍結乾燥状態の Prote-in (0.05 mg) を 50 μ L の滅菌精製水、PBS(-) もしくは生理食塩水 (好ましくは生理食塩水) で溶解します。ピペッティングを数回行い完全に溶解して下さい。溶解後の Prote-in 原液の濃度は 1 μ g / μ L となります。溶解後は分注して -20°C で保管して下さい。

また、凍結融解は 2 回まで使用可能ですが、なるべく凍結融解を繰り返さないように注意して下さい。

β -galactosidase 原液の調製および保存

凍結乾燥状態の β -galactosidase 465 kDa (0.10 mg) を 66 μ L の滅菌精製水または PBS(-) 好ましくは生理食塩水で溶解します。ピペッティングを数回行い完全に溶解して下さい。溶解後の β -galactosidase 原液の濃度は 1.5 μ g / μ L となります。溶解後は分注して -20°C で保管して下さい。

また、凍結融解は 2 回まで使用可能ですが、なるべく凍結融解を繰り返さないように注意して下さい。

β -galactosidase の HeLa-S3 細胞内への導入例

(細胞の準備)

1. 6 ウェル細胞培養プレートに 3×10^5 cell / ウェル (1.5 mL 培地 / ウェル) となるように細胞を播く。
2. 37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養する。

(Prote-in の調製)

3. Prote-in 原液を滅菌精製水、PBS(-) もしくは生理食塩水 (好ましくは生理食塩水) で希釈して 7.5 μ g / 150 μ L の溶液とする。
4. β -galactosidase 原液を滅菌精製水、PBS(-) もしくは生理食塩水 (好ましくは生理食塩水) で希釈して 22.5 μ g / 150 μ L の溶液とする。
5. 3 の Prote-in 150 μ L と 4 の β -galactosidase 溶液 150 μ L を混合して、1 時間室温で静置する。

(細胞への導入)

6. 2 の培養細胞に 5 の複合体溶液 300 μ L を添加する
7. 37°C, 5% CO₂ 下で 3 時間培養する。
8. PBS(-) で 3 回洗浄する。

(観察、測定、検出)

9. 固定液を各ウェルに 1.5 mL 添加して 5 分間室温で静置する。
10. PBS(-) で 2 回洗浄する。
11. 染色液を各ウェルに 1.5 mL 添加する。
12. 37°C で 1 時間以上静置する。
13. PBS(-) で 2 回洗浄する。
14. PBS(-) を各ウェルに 1.5 mL 添加する。
15. 顕微鏡で観察する。

(試薬)

固定液

2%ホルムアルデヒド
 0.2%グルタルアルデヒド
 in PBS

染色液

4 mM フェリシアン化カリウム
 4 mM フェロシアン化カリウム
 2 mM 塩化マグネシウム
 1 mg/mL X-gal(DMSO)
 in PBS

注意事項

1. 細胞内導入効率は、タンパク質や細胞株によって変わります。Prote-in とタンパク質の混合時の濃度は、あらかじめ実験に用いる細胞株とタンパク質でご検討下さい。
2. 疎水性度が著しく低いタンパク質では、導入効率が低下することがあります。

Protein とタンパク質溶液の混合濃度の検討例

タンパク質溶液 15, 22.5, 30 μ g/150 μ L の各濃度に対し、Protein 1.5, 3.0, 7.5, 15 μ g/150 μ L を混合し細胞への導入効率を確認する。

* 6 ウェルプレート の 1 ウェル及び 35 mm ディッシュ の 1 枚分に相当します。

各種細胞での Protein と β -galactosidase 溶液の混合濃度例

	Protein (μ g/150 μ L)	β -galactosidase (μ g/150 μ L)
(接着系細胞)		
HeLa-S3	3.75~15.0	10.8~22.5
WiDr	3.75~15.0	22.5
Balb3T3	3.75~15.0	10.8~22.5
(浮遊系細胞)		
P3U1	7.5~37.5	10.8~22.5
P388	15.0	22.5
Jurkat	15.0~37.5	22.5

β -galactosidase の導入が確認されている細胞

HeLa-S3 (ヒト子宮癌細胞)、WiDr (ヒト大腸癌細胞)、HepG2 (ヒト肝臓癌細胞)、MCF-7 (ヒト乳癌細胞)、Balb3T3 (マウス繊維芽細胞)、B16 (マウスメラノーマ細胞)、SVT2 (SV40 トランスフォームマウス 3T3 細胞)、A10 (ラット平滑筋細胞)、K562 (ヒト白血球細胞)、Jurkat (ヒト T 細胞白血病細胞)、HL60 (ヒト白血球細胞)、P388 (マウス白血病細胞)、P3U1 (マウスミエローマ細胞)

トラブルシューティング

1. Protein とタンパク質溶液を混合したとき又は混合後 1 時間静置したときに沈殿物が認められる。

原因 : 複合体形成反応時のタンパク質濃度あるいは Protein の濃度が高すぎる可能性があります。

解決策 : 本添付書記載の「Protein とタンパク質溶液の混合濃度の検討例」に従って、最適なタンパク質濃度および Protein 濃度を設定して下さい。

2. 導入効率が低いまたは導入されない。

原因 : 複合体形成時のタンパク質濃度あるいは Protein の濃度の設定が適切でない可能性があります。

解決策 1 : 本添付書記載の「Protein とタンパク質溶液の混合濃度の検討例」に従って、最適なタンパク質濃度および Protein 濃度を設定して下さい。

解決策 2 : Protein とタンパク質複合体溶液の細胞添加量を増加させると改善されることがあります。

保管方法

遮光下、 -20°C で保管

特許

特許出願済

尚、本技術は、U. S. Patent No.6,841,535 アクティブモティーブ社からのライセンスを受けています。

参考文献

Eisaku Kondo, Masao Seto, Kazuhiro Yoshikawa, Tadashi Yoshino : High efficient delivery of p16 antitumor peptide into aggressive leukemia/lymphoma cells using a novel transporter system. Mol. Cancer Ther., 3(12),1623-1630 (2004).

Eisaku Kondo, Takehiro Tanaka, Takayoshi Miyake, Tomotsugu Ichikawa, Masahiko Hirai, Masaki Adachi, Kazuhiro Yoshikawa, Koichi Ichimura, Nobuya Ohara, Akiyoshi Moriwaki, Isao Date, Ryuzo Ueda, and Tadashi Yoshino : Potent synergy of dual antitumor peptides for growth suppression of human glioblastoma cell lines. Mol. Cancer Ther., 7(6), 1461-1471 (2008).

製品についてのお問い合わせ先



大阪府箕面市稲 4 丁目 1 番 7 号
TEL: 072-749-3009