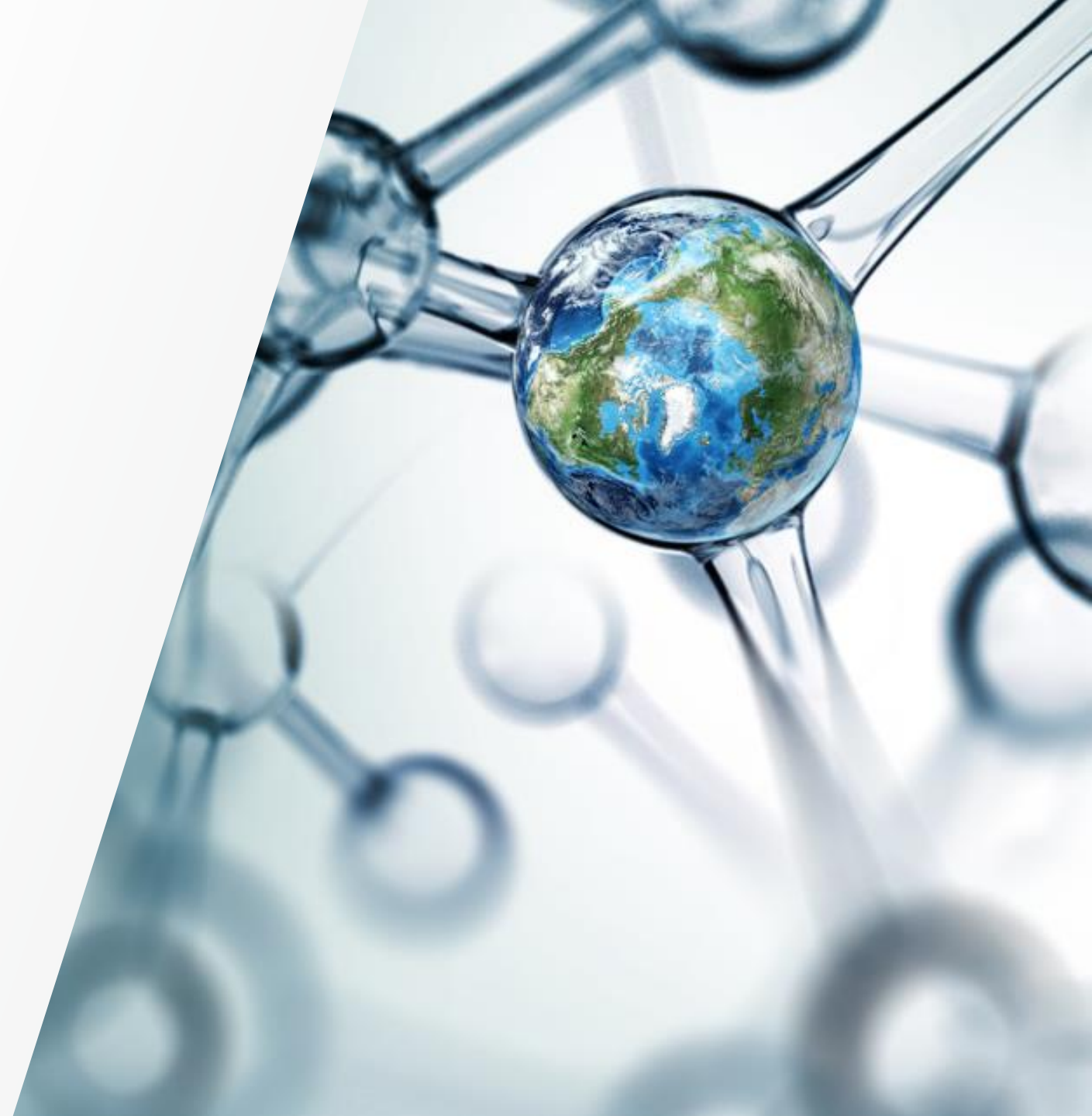


遺伝子導入の基礎

ライフサイエンスソリューションズグループ



 The world leader in serving science



内容

1 遺伝子導入(トランスフェクション)とは

2 一般的な遺伝子導入方法について

3 カチオン性脂質導入方法

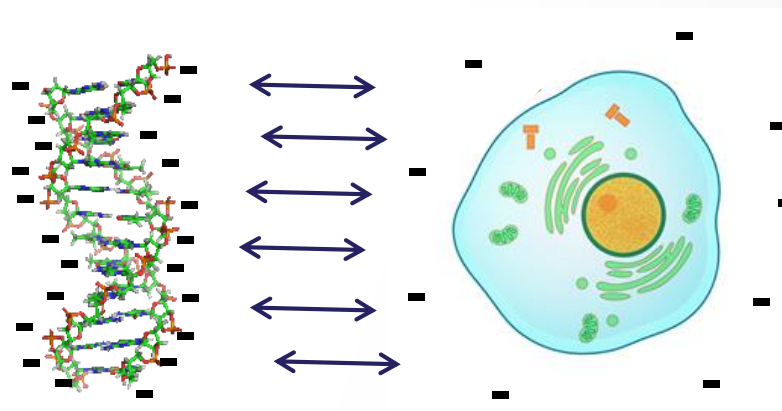
4 エレクトロポレーション導入方法



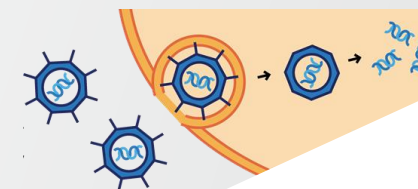
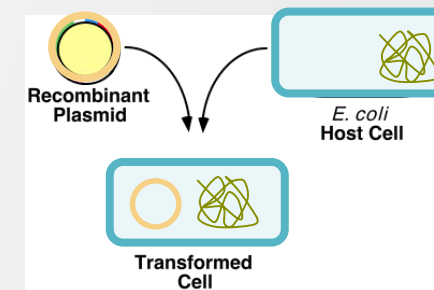
遺伝子導入(トランスフェクション)とは

トランスフェクションとは

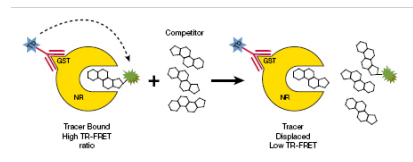
- トランスフェクション: 外来のDNA、RNA、タンパク質や化合物などを培養細胞に導入するプロセス



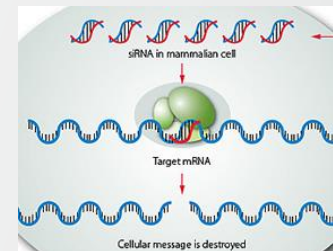
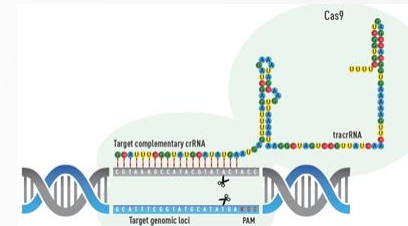
- トランスフォーメーション: バクテリアや酵母に外来の核酸などを導入するプロセス
- トランスダクション: ウイルスを介して細胞に外来の核酸などを導入するプロセス



トランスフェクションが必要な実験？



ゲノム編集



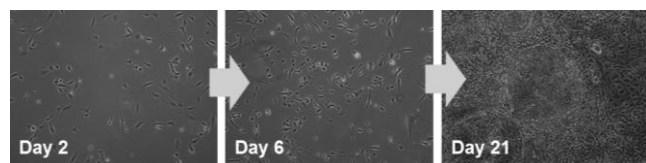
セルベースアッセー、ドラッグ
ディスカバリー

トランスフェ
クション

RNAi

iPS細胞リプログラミング

タンパク質生産



一般的な遺伝子導入方法について

トランスフェクションの方法

化学的な方法

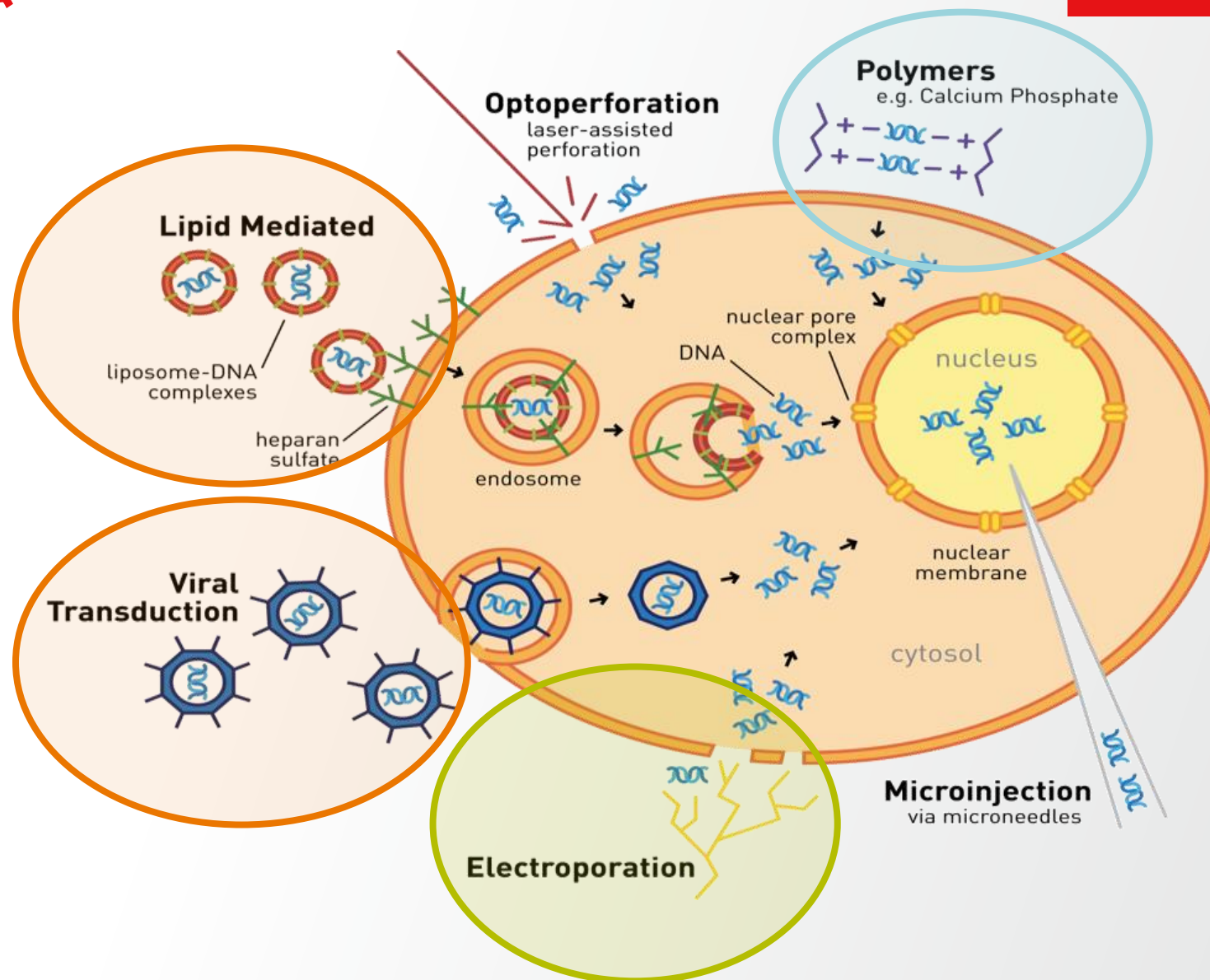
脂質、
ポリマー (PEI)
無機化合物 (リン酸カルシウム)

物理的な方法

エレクトロポレーション
マイクロインジェクション

ウイルス方法

アデノウイルス
レンチウイルス

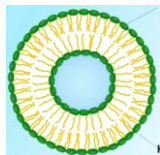


よく使用される2つの方法

カチオン性脂質導入方法

(リポソーム導入方法、リポフェクション方法)

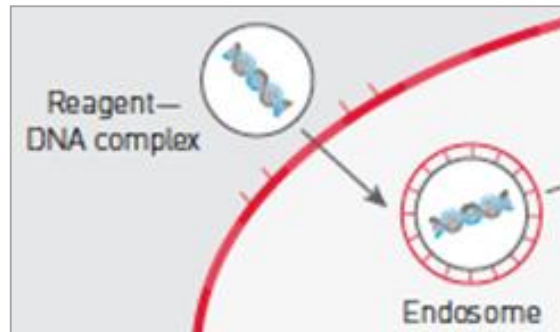
カチオン性脂質: プラス電荷をもつ脂質2重膜



Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 Reagent 試薬など

特長

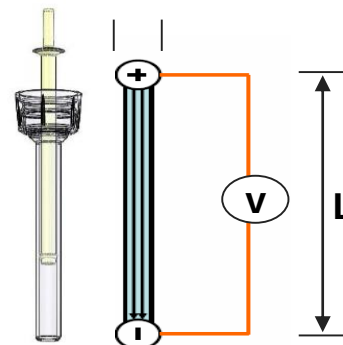
- 多くの細胞で効率よく導入
- 細胞毒性が低い
- 再現性が高い



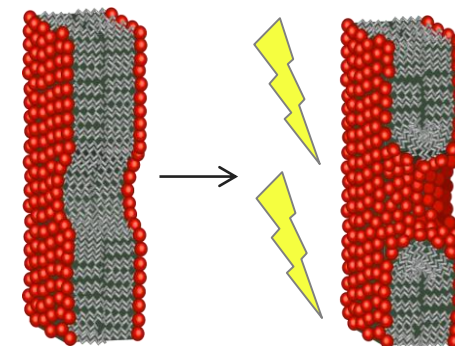
エレクトロポレーション

細胞に電圧をかけ、細胞膜(および核膜)に穴をあけ、核酸を導入する方法

Neon™ electroporation system



膜に穴をあけます



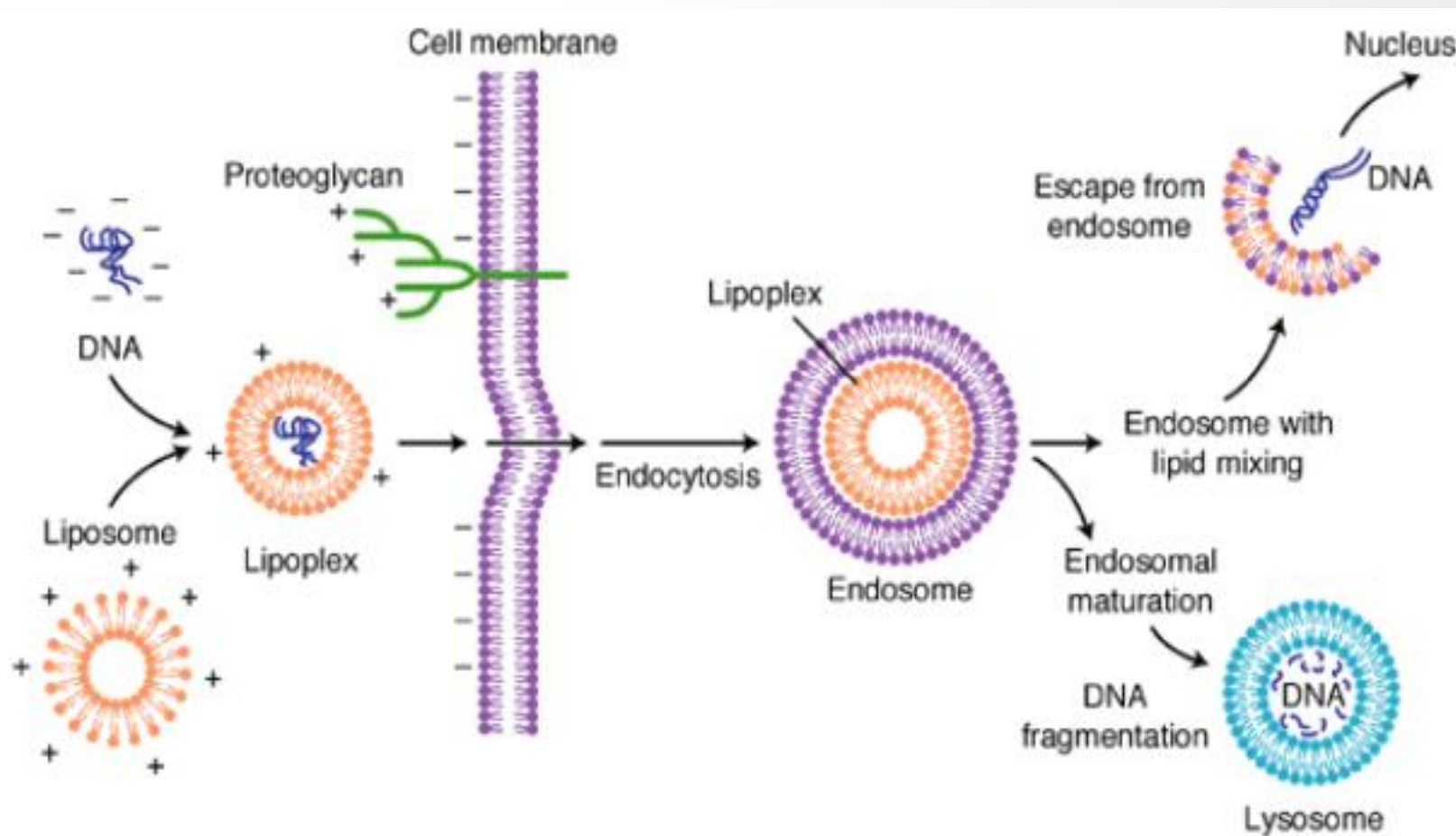
カチオン性脂質導入方法

カチオン性脂質導入方法とは？

カチオン性脂質(リポソーム)を用いた方法:

プラス電荷をもった脂質2重膜(リポソーム)とマイナス電荷をもった核酸を混合し、電氣的に結合したコンプレックスを添加。細胞内のエンドサイトーシスの機構で細胞内に取り込まれる。

- 再現性が高い
- 低毒性
- 低コスト



Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 トランスフェクション試薬

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Plasmid導入には最適なカチオン性脂質試薬



- 高い導入効率
多くの細胞で他の試薬の数倍以上の導入効率
- 細胞毒性が低い
- 導入可能な細胞種が多い
- プロトコルがシンプル(条件検討項目が少ない)

Lipofectamine 3000 トランスフェクション試薬 導入効率

導入効率が10倍以上になる細胞もございます。

Easy-to-transfect

Hard-to-transfect

HEK293

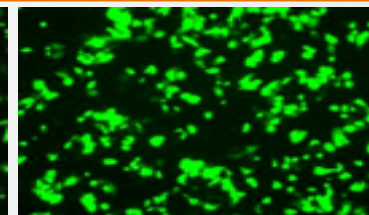
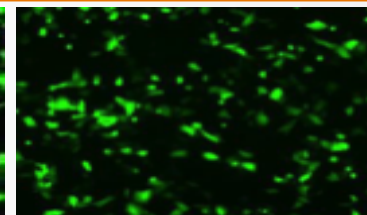
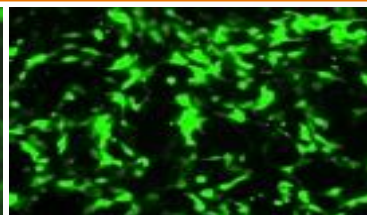
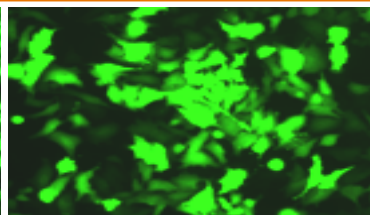
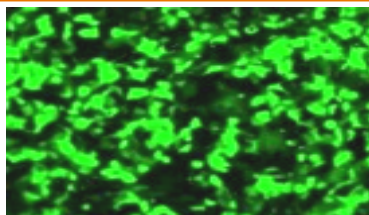
Hela

LNCAP

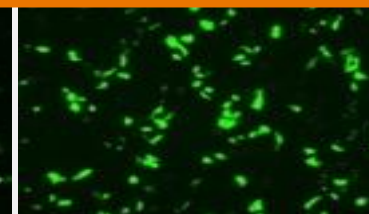
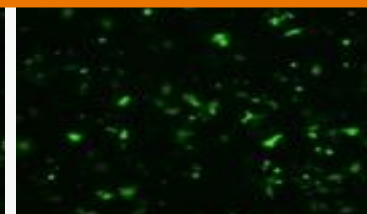
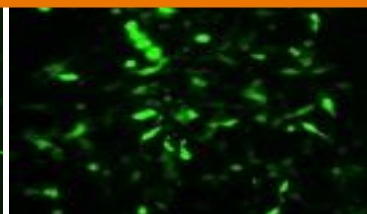
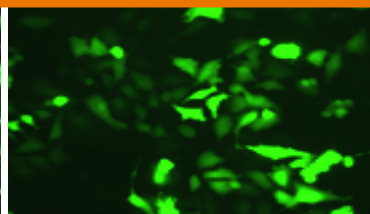
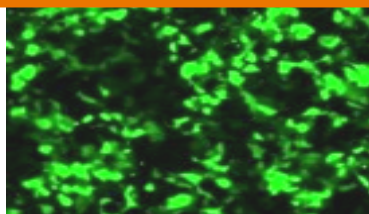
A549

HepG2

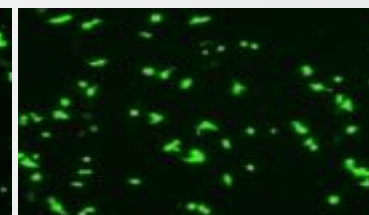
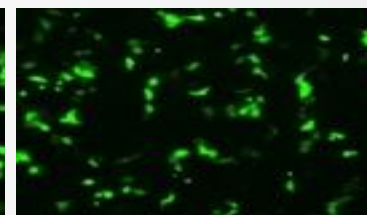
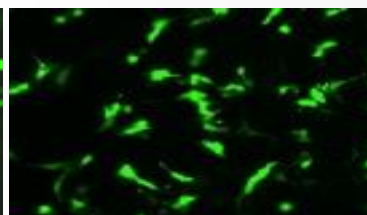
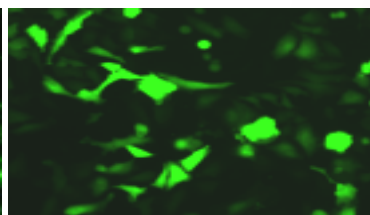
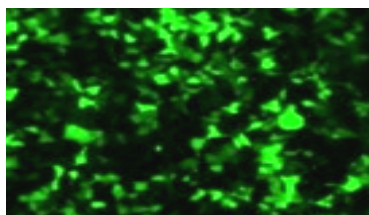
Lipofectamine™
3000



Lipofectamine™
2000



他社試薬



% Transfection efficiency

さまざまな培養細胞の導入効率はwebでご確認ください

Lipofectamine 3000トランスフェクション試薬のシンプルな プロトコル

- 条件検討が少ない

→

2点のLipofectamine 3000量の最適化のみ

- インキュベーション時間室温で10分

→

Lipofectamine 3000と核酸の結合反応は10分のみ

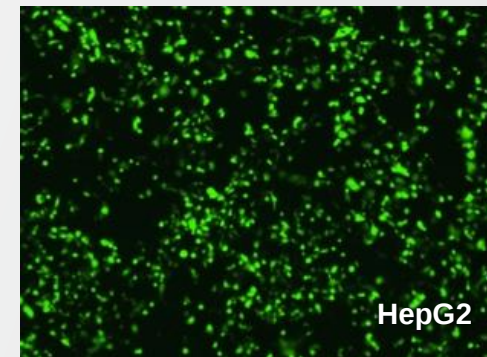
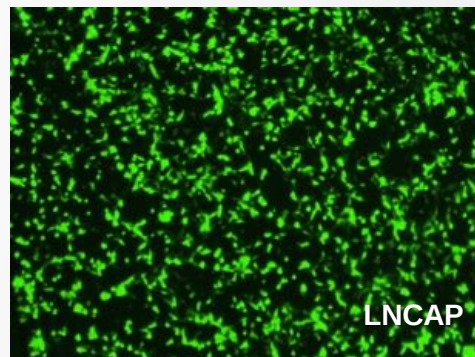
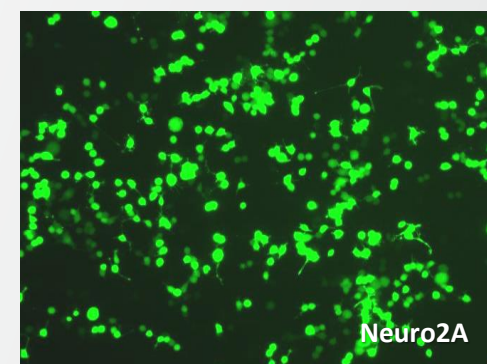
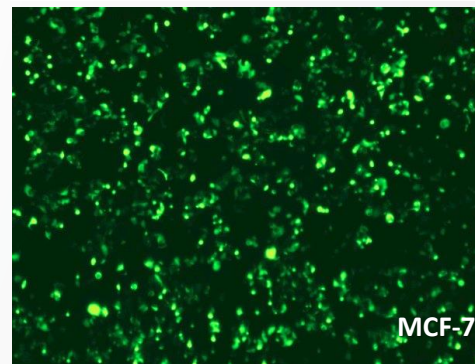
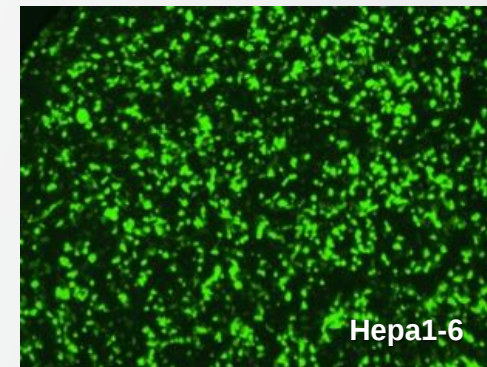
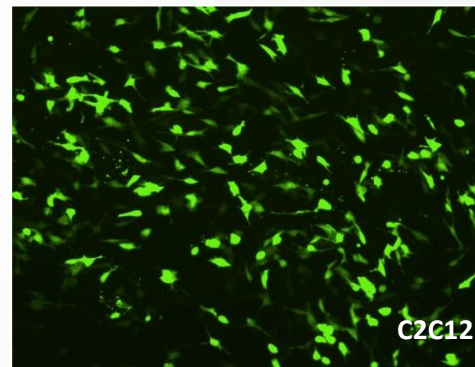
- 血清含有培地使用

→

培地は血清含有(および抗生物質含有)培地が使用可能

- 培地交換は必要なし

→毒性が低いので試薬を添加後の培地交換は不要



カチオン性脂質導入に影響のある要素



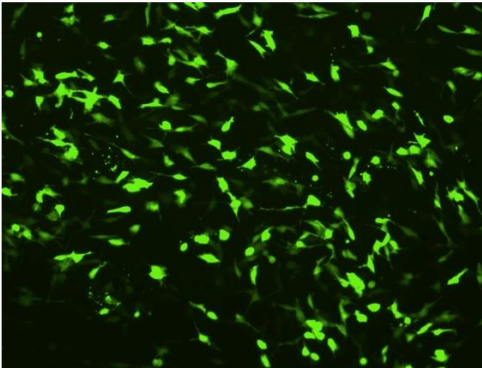
ランキング	要素
最も重要	- 細胞種 - 細胞の状態（passage数、適切なpassage など） - Lipofectamine トランスフェクション 試薬の状態（保管は適切？、古くはないか？） - 核酸の精製度（260/280=1.8、トランスフェクショングレードのカラム精製） - 試薬と核酸の比
重要	- 細胞播種濃度（トランスフェクション時に70%程度） - 核酸と試薬のインキュベーション時間 - 核酸と試薬のインキュベーションbufferには血清不含有
普通	- 混合の仕方（転倒混和、ピペッティング、ボルテックスなど） - 希釈用buffer(Gibco™ Opti-MEM™ 培地推奨)および培地の種類 - 細胞への暴露時間（試薬核酸コンプレックスの細胞添加後の時間） - 培地中の抗生物質
ほとんど影響はなし	- 血清 - Plateのスケール



トランスフェクションのコントロール



ポジティブコントロール	レポーター物質（GFP、ルシフェラーゼ、B-Galなど）
	上記以外ですでに確認れている物質
ネガティブコントロール	細胞のみ
	コンプレックス用の培地のみ
	導入核酸および希釈培地のみ
	試薬および希釈培地のみ



GFP発現plasmid

エレクトロポレーション

エレクトロポレーションとは？

電気パルスにより細胞膜に穴をあけ、外来の核酸を導入する方法

Before pulse

During E-field

After pulse

Cell membrane

Introduce genes/drugs

Cell "heals" with
gene/drug inside

Electric field induces
a voltage across
cell membrane

カチオン性試薬で導入が難しい細胞への効率が高い

DNA、siRNA、mRNA、タンパク質、Q Dotなど導入可能

細胞やアプリケーションごとの最適化が必要

専用機器と試薬が必要

Invitrogen™ Neon™ Transfection Systemの特長

- チップ式:
 - ✓ 細胞ごとに均一に電圧がかかりやすい
 - ✓ 細胞毒性が低い
 - ✓ 2×10^4 個の細胞からエレクトロポレーションが可能



Cuvette electroporation chamber

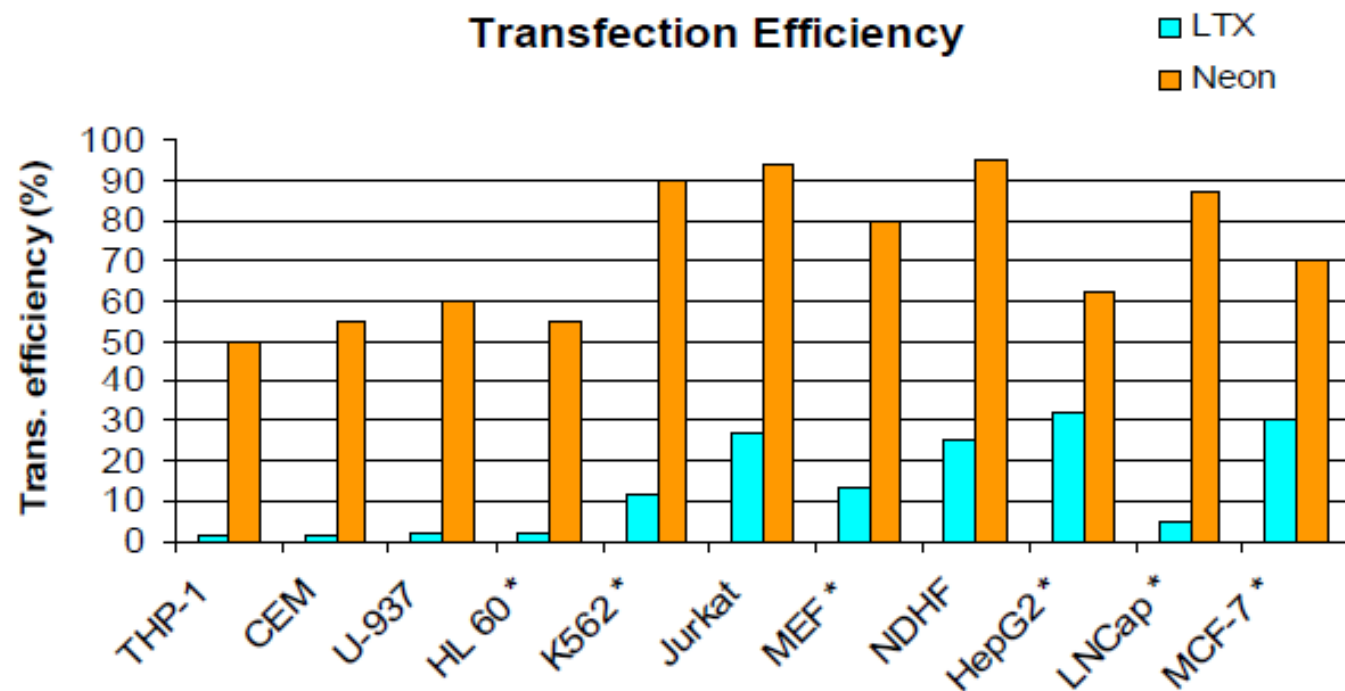


Neon™ pipette tip chamber

Neon Transfection System

カチオン性試薬では導入が難しい細胞にも高い導入効率

Transfection Efficiency



脂質導入の困難な細胞

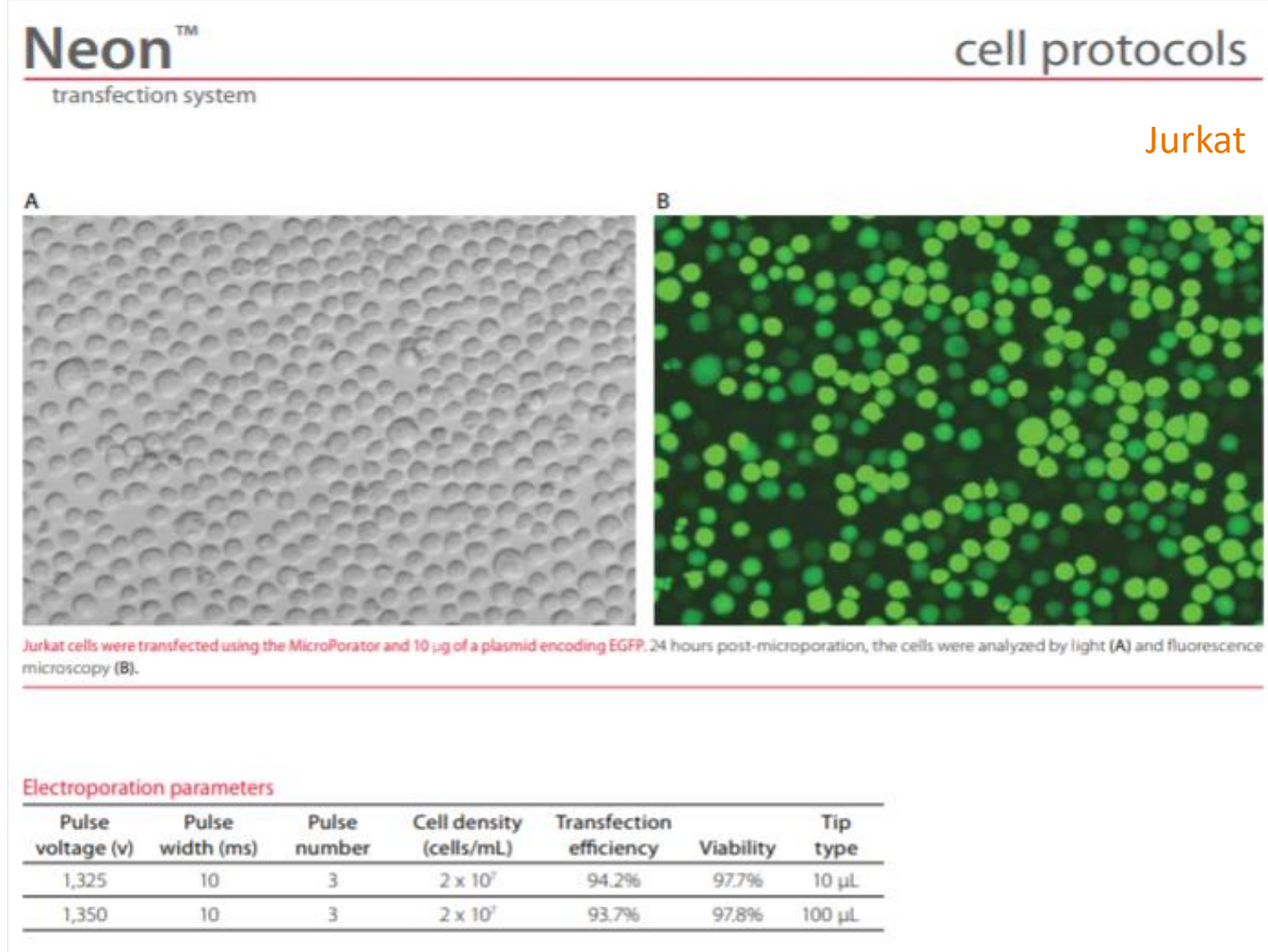


細胞ごとのエレクトロポレーションの条件

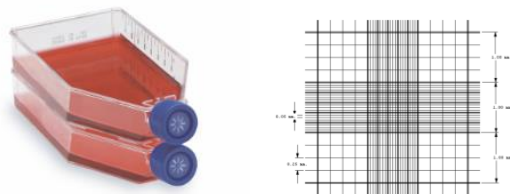
- 140以上の細胞の条件がwebに紹介済み
- 右図; Jurkat細胞の例

1325 V10 mS3回パルス

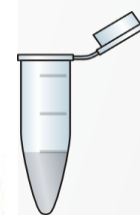
→ 94.2% plasmidGFP導入



NEON™ Electroporation ワークフロー



細胞を回収して、細胞数を測定



遠心後、DPBSで洗い、
専用bufferで細胞を懸濁
後、核酸を添加



チップをピペットに装着



細胞と核酸の混合液をチップで吸い込み、目
的の電圧をかける、その後細胞を培地に播種
する

Neon エレクトロポレーションに影響のある要素



ランキング	要素
最も重要	- 細胞種 - 細胞の状態 (passage数など) - 細胞濃度 - 細胞の洗い
重要	- 核酸濃度 - 核酸精製度 - 専用buffer用いる - 適切な培地 - 専用bufferに懸濁した後の時間
普通	抗生物質
ほとんど影響なし	- 血清 - Plateのスケール



Product								
	Neon Transfection System	Lipofectamine 3000 reagent	Lipofectamine 2000 reagent	Lipofectamine RNAiMAX reagent	Lipofectamine MessengerMax reagent	Lipofectamine CRISPRMAX reagent	Lipofectamine Stem reagent	InvivoFectamine reagent
Cell type		Workhorse	Workhorse	Workhorse	Workhorse	Workhorse		
	Hard-to-transfect	Hard-to-transfect		Hard-to-transfect		Hard-to-transfect		
	Primary	Primary		Primary		Primary		
	Stem	Stem		Stem	Stem		Stem	
			Neurons		Neurons			
	Cancer	Cancer	Cancer	Cancer	Cancer	Cancer		
								Animal models
Payload	DNA	DNA	DNA				DNA	
	siRNA			siRNA			siRNA	siRNA
	mRNA				mRNA		mRNA	
				miRNA				
	CRISPR-Cas9 RNP					CRISPR-Cas9 RNP	CRISPR-Cas9 RNP	
	Antibody							
		Cotransfection	Cotransfection					
	In vitro delivery							In vivo delivery

Thank you

