

LipoTrust™ SET

■セット内容

LipoTrust™ SR

LipoTrust™ PE

LipoTrust™ CH

■容量・保存

凍結乾燥品 1ml 用(カチオン脂質 1 μ mol 含有) × 各 1 本 溶解後溶液保存用チューブ × 各 1 本 2~8°C 保存

■特徴

カチオン脂質系の遺伝子導入試薬の多くは血清添加培地中においてほとんど遺伝子発現活性が期待できないため、遺伝子導入時に無血清培地を用いることが推奨されています。本LipoTrust™では、血清添加培地中でも十分な遺伝子発現活性が得られるため、血清添加に関わらずin vitro培養細胞系、in vivoのどちらの実験でも使用することが可能です。また、一般的な遺伝子導入試薬は細胞毒性が強いことが知られていますが、LipoTrust™は細胞毒性が低いことも特徴です。さらに凍結乾燥品であるため、空のLipoTrust™を核酸水溶液で復水することで核酸を効率的に保持しながらリポソーム膜を再構成させる「Coating Type」と一般的な遺伝子導入試薬溶液と核酸溶液を混合して使用する「Lipoplex Type」を用途によって選択することが可能です。

LipoTrust™ SR :血清存在下でも多くの細胞に高い遺伝子発現活性を示します。

LipoTrust™ PE :血清存在有無に関係なく一定の遺伝子発現活性を示します。

LipoTrust™ CH :無血清培地中で非常に高い遺伝子発現活性を示し、また血球系細胞への遺伝子導入も可能です。

■品質管理

LipoTrust™を β -gal遺伝子を有するプラスミドと混合させた後、無血清培地/10%FBS添加培地にてHeLa細胞へトランスフェクションさせ、その後 β -gal陽性細胞数を測定しております。

■使用上の注意

- ・LipoTrust™の凍結乾燥製剤（粉の状態）、これに蒸留水を加えた水分散製剤は2~8°Cの冷暗所にて保存をお願いします。
- ・Coating Type も Lipoplex Type も、細胞に添加する際 (in vitro 実験時)は希釈することになりますが、この希釈液にはPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)や細胞培養用培地(NaClなどの電解質が入った液)を用いる方が良い結果が得られます。
- ・LipoTrust™は血清(FBS10%程度)添加培地でも無血清培地での結果に近い遺伝子発現効果が得られます(特にSR、PEタイプ)。CHタイプは無血清培地における高発現が確認されています。一方で、一般的には遺伝子発現活性は無血清培地中>血清添加培地中と言われておりますので、より強い遺伝子発現効率が必要な場合は無血清培地中での遺伝子導入をお勧めいたします。細胞の種類、実験条件により最適なりポソームは異なります。まずはご自身の実験系でリポソームタイプのご選択、ご確認いただきますようお願いいたします。
- ・本品は試験研究を目的に販売いたしております。その他の目的(医療、臨床診断、食品、化粧品、家庭用品等)には絶対に使用しないようお願いいたします。またヒトへの投与は絶対にしないでください。

■使用方法概要

LipoTrust™は、遺伝子を封入しない空のリポソームをバイアルに充填し凍結乾燥したリポソーム製剤です。したがって、2種類の方法での使用が可能です。

【Coating Type】

凍結乾燥空リポソームに、核酸水溶液を加え軽く転倒攪拌を行うことによって、核酸 Coating Type のリポソームが得られます。

【Lipoplex Type】

凍結乾燥空リポソームに、蒸留水を加え転倒攪拌を行ったりポソーム水分散液と、更に核酸水溶液とを混合することによってLipoplex Type の核酸/リポソーム複合体が得られます。in vitro 実験系では、Coating Type よりもこのLipoplex Typeの方が、より高い遺伝子発現活性が得られます。

製品に関するお問い合わせはこちらまで

北海道システム・サイエンス株式会社

〒001-0932 札幌市北区新川西2条1丁目2-1

TEL:011-768-5901 FAX:011-768-5951

URL:<http://www.hssnet.co.jp>

■Coating Type 調製方法例

LipoTrust™バイアル 1 瓶に 100 μ g/ml に調製した核酸水溶液 1ml (注1)(カチオン脂質 10nmol に対し核酸量 1 μ g 相当)を加えて復水させ、5 分間放置します。更に最終核酸濃度が 1 μ g/ml (in vitro 実験) または 20 μ g/ml (in vivo 実験) になるように、無血清培地 (in vitro または in vivo 実験) 又は FBS10% 添加培地 (in vitro 実験) で希釈をしてください(注2)。

注1：本LipoTrust™は蒸留水で復水すると等張になるように設計されていますので、核酸水溶液の溶媒はできるだけ蒸留水をお使いください。

注2：上記無血清培地の代わりに生理食塩水 (saline) やリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) も使用可能です。

■Lipoplex Type 調製方法例：最終核酸濃度が 1 μ g/ml (in vitro 実験) または 20 μ g/ml (in vivo 実験) 用

	操作内容	in vitro 実験用	in vivo 実験用
Stock Sol.A	LipoTrust™を蒸留水 1ml にて復水する	1ml (カチオン脂質として 1 μ mol/ml)	
Sol.A	in vitro 実験用: Stock Sol.A 100 μ l を無血清培地 900 μ l にて 10 倍希釈する in vivo 実験用: Stock Sol.A 400 μ l を無血清培地 600 μ l にて 2.5 倍希釈する	カチオン脂質として 100nmol/ml	カチオン脂質として 400nmol/ml
Sol.B	無血清培地にて右記濃度の核酸水溶液を調製する	核酸として 10 μ g/ml	核酸として 40 μ g/ml
Sol.C	Sol.A と Sol.B をそれぞれ等容量 (in vitro 実験用は 100 μ l ずつ、in vivo 実験用は 500 μ l ずつ) 混合し複合体を形成させる	カチオン脂質 10nmol に 対し核酸 1 μ g (全量 200 μ l)	カチオン脂質 200nmol に 対し核酸 20 μ g (全量 1ml)
—	複合体を安定させるために放置する	5 min	5 min
最終試料	in vitro 実験用: Sol.C 200 μ l に無血清培地又は FBS12.5% 添加培地 800 μ l を加える in vivo 実験用: Sol.C をそのまま使用する	最終核酸濃度は 1 μ g/ml (全量 1ml)	最終核酸濃度は 20 μ g/ml (全量 1ml)

注3：上記無血清培地の代わりに生理食塩水 (saline) やリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) も使用可能です。

■遺伝子発現実験例

ルシフェラーゼ活性 in vitro 実験例

各種腫瘍細胞を 6well-plate に $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 個播種し、FBS10% 添加培地で 24 時間培養後、無血清培地で 1 回洗浄した。次に遺伝子プラスミド (pPGV-C) を含有するリボソーム分散液 (Coating Type 並びに Lipoplex Type: 最終 DNA 濃度として 1 μ g/10nmol カチオン脂質/ml) を各 well に 1ml 加え、37°C で 5 時間反応させた。5 時間後、well を無血清培地で 1 回洗浄し、FBS10% 添加培地を加えて 2 日間培養した後、ルシフェラーゼ・アッセイを行なった。

ルシフェラーゼ・アッセイは以下の通り実施した。即ち、リン酸緩衝化生理食塩水 (-) [PBS(-)] で 2 回洗浄後、細胞溶解液 (LC β) 150 μ l を添加して室温で 15 分間放置し、cell scraper にて plate 表面を削り落とす。次に、このライセートを 12,000r.p.m. で 2 分間遠心分離し、その上清 20 μ l と発光試薬 100 μ l を混合した時の発光量をルミフォトメーター (TD-4000、Laboscience) を用いて測定した。また蛋白量は BCA Protein Assay Reagent (Pierce 社) を用いて測定し、蛋白 1mg 当りの発光量としてルシフェラーゼ活性を求めた。

X-gal 染色 in vitro 実験例

各種腫瘍細胞を 6well-plate に $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 個播種し、FBS10% 添加培地で 24 時間培養後、無血清培地で 1 回洗浄した。次に遺伝子プラスミド (pCAG-lacZ) を含有するリボソーム分散液 (Coating Type 並びに Lipoplex Type: 最終 DNA 濃度として 1 μ g/10nmol カチオン脂質/ml) を各 well に 1ml 加え、37°C で 5 時間反応させた。5 時間後、well を無血清培地で 1 回洗浄し、FBS10% 添加培地を加えて 2 日間培養し、X-gal 染色を行なった。

X-gal 染色は以下の通り実施した。即ち、PBS(-) で一回洗浄後、1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド並びに 0.02% NP-40 を含む PBS(-) で 3~4 分間固定した後、更に PBS(-) で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。最終的に、5mM $K_4[Fe(CN)_6]$ 、5mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、0.01% Sodium Deoxycholate、0.02% NP-40、2mM $MgCl_2$ 、0.1% X-gal 混液にて 37°C で 5~8 時間染色させた後、顕微鏡下で細胞を最低 1000 個以上数えて、LacZ 陽性細胞の割合を求めた。

X-gal 染色 in vitro HeLa 細胞 実験例

トランスフェクション前日、HeLa 細胞を 24well-plate に $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 個播種し、FBS10% 添加培地で 24 時間培養後した。トランスフェクション直前に Dish の培地を全て捨て、無血清培地で 1 回洗浄した後、実験方法に従って 無血清培地 あるいは、12.5% 血清添加培地を各 400 μ l 加えた。次に、 β -gal 遺伝子を保持するプラスミドを含有するリボソーム分散液 (1 μ g/10nmol カチオン脂質/100 μ l; sol.C) を各 well に 100 μ l 加え、37°C で 1 時間反応させた。1 時間後、各 Well に 20% あるいは 10% 血清添加培地を 500 μ l 加え、希釈するとともに 10% 血清添加状態とし、37°C で 24 時間以内の培養の後、X-gal 染色を行なった。

X-gal 染色は以下の通り実施した。即ち、PBS(-) 1ml で一回洗浄後、固定液 [1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド並びに 0.02% NP40 を含む PBS(-)] 500 μ l で 5 分間固定した後更に PBS(-) 500 μ l で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。最終的に染色液 [5mM $K_4[Fe(CN)_6]$ 、5mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、0.01% Sodium Deoxycholate、0.02% NP40、2mM $MgCl_2$ 、0.1% X-gal を含む PBS(-)] 500 μ l を加え 37°C で 5~8 時間染色させた後、顕微鏡下で細胞を最低 1000 個以上数えて、LacZ 陽性細胞の割合を求めた。

X-gal 染色 in vivo 実験例

各種腫瘍細胞をヌードマウス腹腔内に 5×10^6 個 ~ 6×10^7 個接種し、1 日 ~ 10 日前後 ~ 3 週間前後経過した後 (腫瘍細胞の種類により変化)、遺伝子プラスミド (pCAG-lacZ) を含有するリボソーム分散液 (Coating Type 並びに Lipoplex Type: 最終 DNA 濃度として 20 μ g/200nmol カチオン脂質/ml) を 1ml マウス腹腔内に投与した。1 日後 ~ 2 日後にそれぞれ腫瘍細胞を回収し、 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個を 6 well-plate に播種し、FBS10% 添加培地で 24 時間培養して細胞が付着したところで X-gal 染色を行なった。X-gal 染色は in vitro 実験と同様に行なった。