20a-S8-7

プラズマによる遺伝子導入法における DNA 損傷評価

Evaluation of DNA Damage Irradiated by Plasmas for Gene Transfection

愛媛大院理工 [1]，大阪電通大工 [2]，ワイ’ズ [3]，パール工業 [4]
°三宅 献[1], 柴川 勢竜[1], 池田 善久[1]，本村英樹[1]，神野雅文[1], 橘邦英[2]，佐藤晋[3]，木戸祐吾[4]
Ehime Univ.[1], Osaka Electro-Commun.Univ.[2], Y’s Corp.[3], Pearl Kogyo Co., Ltd.[4]
°Ken Miyake[1], Seiryu Shibakawa[1], Yoshihisa Ikeda[1], Hideki Motomura[1],
Masafumi Jinno[1], Kunihide Tachibana[2], Susumu Satoh[3], Yugo Kido[4]
E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. はじめに

我々はプラズマ遺伝子導入法におけるプラズマ生成源について、アーク型に始まり、プラズマジェット型及びキャピラリー電極型というように改良を行ってきた。その結果キャピラリー電極を用いて、Fig.1 に示すように導入効率・生存率ともに向上させることができた[1-3]。本研究では、プラズマ照射による DNA 損傷(DNA 鎖切断)についてこれらのプラズマ生成装置別に比較した。

2. 実験方法

本研究では環状二本鎖構造をもつプラスミド DNA(pCX-EGFP, 5.5kbp)を用いた。実験手順は以下の通りである。3.5cm ディッシュにプラスミド溶液(0.033μg/μl, TE 希釈)を滴下し、各装置にセットした後プラスミド溶液にプラズマを照射した。照射時間や印加電圧波形は Fig.1 に示す各装置での最高導入効率を実現する条件に設定した。プラズマ照射後、ディッシュからプラスミドを回収しアガロースゲル電気泳動を行い Fig.2 のようなバンド図を得た。いずれの条件でも DNA 切断のない CC(Closed circular)に加えて DNA 鎖が一本切断された OC(Open circular)のバンドが観測された。それぞれのバンド発光強度を定量化し、両者の和に対する OC の比率より損傷度を算出した。

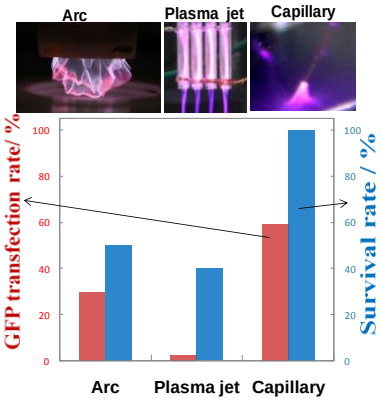

Fig.1: Transfection and cell survival rates for each plasma source

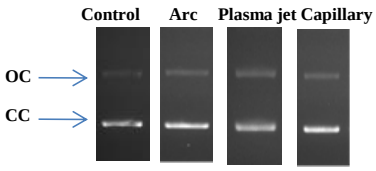

Fig.2: Electrophoresis patterns of plasmid for each plasma source

3. 結果と考察

Fig.3 にそれぞれのプラズマ生成装置別の損傷度を示す。プラズマ非照射の Control でも一定の損傷が存在しており、アーク型やキャピラリー電極型プラズマ照射とさして変わらないと言える。また Fig.1 及び Fig.3 よりキャピラリー電極型プラズマ源は他のプラズマ源に比べて導入効率、生存率が高く、更に DNA 損傷も抑えられている。

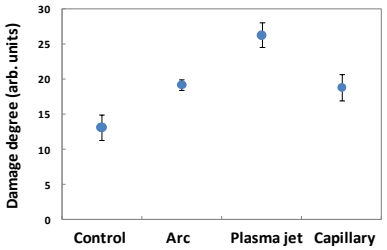

Fig.3: Damage degree for each plasma source

謝辞

本研究の一部は、科研費（新学術領域研究 25108509)による助成を受けた。また本学 INCS 重信よりプラスミドの提供を受けた。

参考文献

[1]佐藤 晋:「プラズマ技術の分子生物学への応用－細胞および組織への分子導入研究および装置の開発」，日本学術振興会プラズマ材料科学第 153 委員会第 85 回研究会，2008 年 3 月，pp. 1-4.
[2]沖廣 仁:「遺伝子導入のためのマイクロプラズマジェットの最適化」，第72回応用物理学会学術講演会，2011年8月，31p-ZD-6，山形
[3]T. Okihiro, et al:“Validation of Plasma Irradiation Effect on Gene Transfection by Using MicroplasmaJet from Capillary Nozzle“, *Proceedings of 4th International Conference on Plasma Medicine*, June, 2012, p.74

© 2014 年　応用物理学会