

# ラジカルがプラズマ遺伝子導入に及ぼす影響

## Effects of radicals on the plasma gene transfection

愛媛大院理工<sup>1</sup>, パール工業<sup>2</sup>, ワイ'ズ<sup>3</sup>, 大阪電通大工<sup>4</sup>

○立花 宏紀<sup>1</sup>, 木村 真徳<sup>1</sup>, 池田 洋平<sup>1</sup>, 木戸 祐吾<sup>1,2</sup>, 池田 善久<sup>1</sup>,

本村 英樹<sup>1</sup>, 佐藤 晋<sup>1,3</sup>, 神野 雅文<sup>1</sup>, 橋 邦英<sup>4</sup>

Ehime Univ.<sup>1</sup>, Pearl Kogyo Co., Ltd.<sup>2</sup>, Y's Corp.<sup>3</sup>, Osaka Electro-Commun. Univ.<sup>4</sup>

○Hiroki Tachibana<sup>1</sup>, Masanori Kimura<sup>1</sup>, Yohei Ikeda<sup>1</sup>, Yugo Kido<sup>1,2</sup>, Yoshihisa Ikeda<sup>1</sup>

Hideki Motomura<sup>1</sup>, Susumu Satoh<sup>1,3</sup>, Masafumi Jinno<sup>1</sup>, Kunihide Tachibana<sup>4</sup>

E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

### 1. はじめに

我々はマイクロキャピラリ電極により安定したプラズマを生成し、細胞へのダメージを局在化した遺伝子導入を行うことに成功した<sup>[1]</sup>。そこで、遺伝子が導入プロトコルのどのタイミングで、またどのような要因が影響しているかの判別を試みたので、その結果について報告する。

### 2. 実験方法

接着細胞(COS7)を培養した96Wellシャーレにプラスミド(pCX-EGFP)を滴下し試料とする。図1に各サンプル毎の処理手順を示す。シャーレ直上にマイクロキャピラリ電極(銅製, 外径 70  $\mu$ m)、下部に板状接地対向電極を配置した。20kHzの正弦波を20 Hz, Duty比1%でパルス変調した24 kVp-pの電圧をキャピラリ先端に印加してプラズマを生成し、試料に0.1秒間照射する。その後24時間培養し、蛍光発現を確認することで導入を検証した。プラズマ照射後にPBSで細胞をウォッシュアウトしラジカルを除去することで化学的要因が遺伝子導入にどの程度影響するか確認する。図2のタイムチャートに各プロトコルにおける要因の作用期間を示す。

### 3. 結果と考察

各Protocolの導入効率を図3に示す。Protocol 1の導入効率は15%程度であり、Protocol 2~4はProtocol 1より低い値である。Protocol 3がProtocol 2より導入効率が高い理由は、プラズマ照射による細胞の生化学的作用(エンドサイトーシスなど)により、ウォッシュアウト後に滴下したプラスミドが導入されたためと考えられる。またProtocol 4は、ウォッシュアウト後にプラスミドを滴下しているがProtocol 2,3より高い導入効率である。この理由は、プラスミド溶液とTE Bufferとの塩分濃度の差に起因する浸透圧が細胞活性を促し、後にプラスミドを滴下した時の導入を促進していると考えられる。本結果より、遺伝子の1割がプラズマ照射直後までに導入され、その後1割が生化学的作用、8割が化学的作用により導入されると考えられる。

#### 謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金(新学術領域研究 25108509)の助成により行われた。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] Tadashi Okihiro: *Proceeding of 4th International Conference on Plasma Medicine*, 2012, p.72,

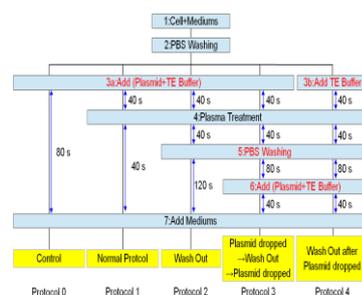


Fig.1: Sample treatment protocol.

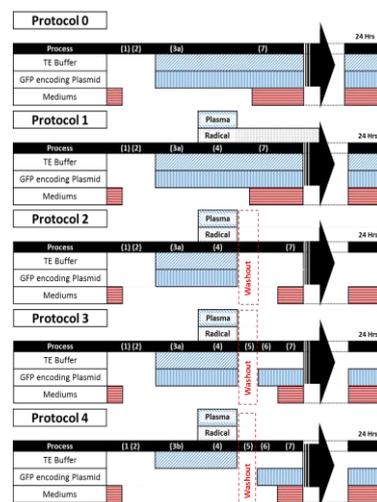


Fig.2: Time chart for each factor in each protocol

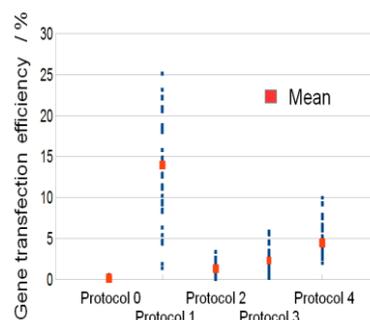


Fig.3: Gene transfection rate for each protocol.