

ProteoCarry[®] <Protein transfection reagent>

商品コード FDV-0015

※本商品は研究用です。研究用以外には使用できません。

商品背景

ProteoCarry[®]は機能性を持つタンパク質、ペプチド、抗体などのタンパク質を細胞質内に高効率に導入する新しいペプチド性のタンパク質トランスフェクション試薬です。タンパク質のトランスフェクション（細胞内へのタンパク質の輸送）は、解析対象のタンパク質の細胞内での反応を解析するための優れた方法となります。プラスミドによる遺伝子発現は一般的にタンパク質を十分に発現するまで 12-24 時間かかるとされていますが、タンパク質のトランスフェクション試薬は、数時間以内に生細胞へと機能性タンパク質を直接導入することが出来ます。ペプチド、カチオン性脂質、ポリマーベースの多くのタンパク質トランスフェクション試薬が開発されてきましたが、これらの試薬は細胞質へのタンパク質の輸送に問題を抱えてきました。従来の試薬は一般的にタンパク質と複合体を形成し、この複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内に入ります。しかし、この複合体は低効率でしかエンドソームから脱出できず、大部分がリソソームに輸送されて分解されてしまいます。タンパク質がエンドソームから高効率に脱出することがタンパク質のトランスフェクション試薬において非常に重要な課題となります。ProteoCarry[®]は pH に依存してエンドソーム膜破壊活性を起こすことでこの問題を克服しました。タンパク質と ProteoCarry[®]はエンドサイトーシスを介してエンドソームに輸送され、低毒性ながら高いエンドソーム膜破壊活性により細胞質へと脱出します。

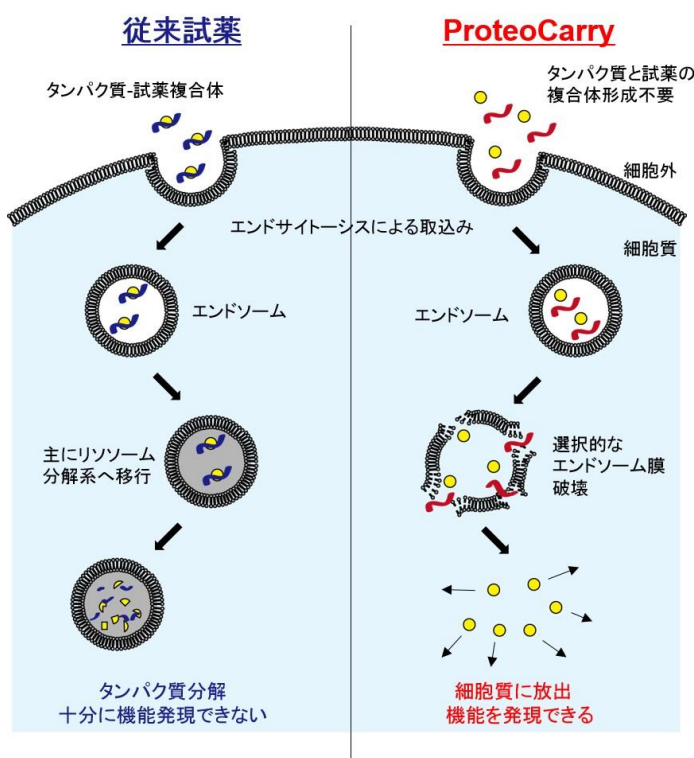


図 1. ProteoCarry[®]の原理

左: 既存商品の問題点

右: ProteoCarry[®]の導入原理

商品仕様

商品コード: FDV-0015

構成品

- ProteoCarry[®], 4mg (**vial A**)
- FITC-dextran for positive control, 2 mg (**vial B**)

溶解性: ProteoCarry[®]および FITC-dextran とともに水に可溶。

アッセイ回数: 標準プロトコルにおいて、下記の表に記載の回数が実施できる。

ProteoCarry [®]		FITC-dextran	
6 well scale	14 assays	6 well scale	5 assays
12 well scale	28 assays	12 well scale	10 assays
24 well scale	56 assays	24 well scale	20 assays
48 well scale	140 assays	48 well scale	50 assays
96 well scale	280 assays	96 well scale	100 assays

アプリケーション例

- ペプチド、酵素、抗体を含む外来性や組換えタンパク質の細胞内への輸送
- グリコサミノグリカンを含む生体高分子の細胞内への輸送

溶解方法と保存方法

溶解方法: 水での溶解を推奨

保存温度 (溶解前): -20℃で保管

(溶解後): 水溶液として調製後は小分注して-20℃で保管

凍結融解の繰り返しは避け、小分注品の使い切りを推奨

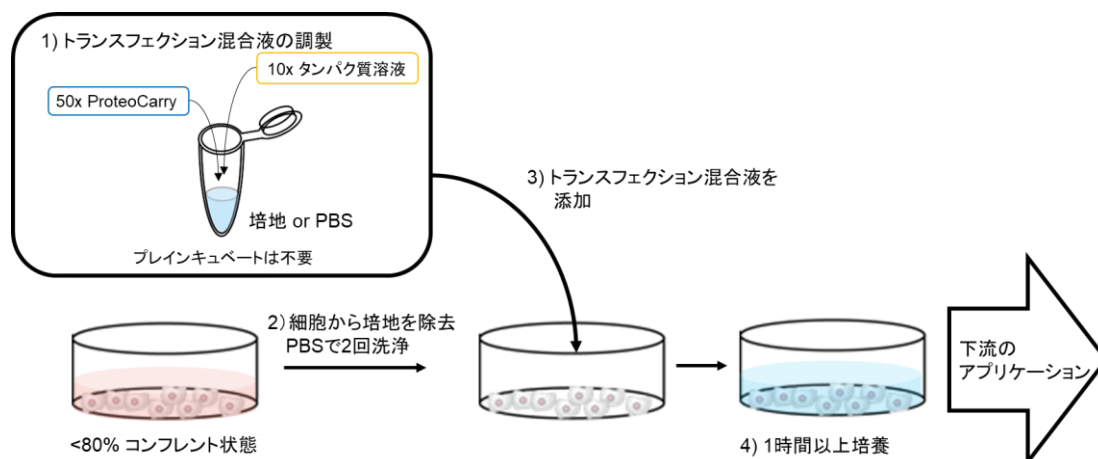
FITC-dextran については、遮光保存を推奨

検証済みの細胞

HeLa, SW280, COS7, NIH3T3, HUVEC

使用方法

* 以下はプロトコルの一例となります。実験ごとに最適化を推奨いたします。



50x ProteoCarry®ストック溶液の調製

- 581ulの滅菌済み超純水を vial A に添加し、穏やかに混合し、50 x ProteoCarry®ストック溶液を調製する。
- 調製したストック溶液は、凍結融解の繰り返しを避けるために小分けにして、-20℃で6カ月間保存できる。

10x ポジティブコントロールの調製

- 1mLの滅菌済みPBSをVial Bに添加し、穏やかに混合し、10 x 濃縮溶液(2 mg/ml)を調製する。
- 調製したストック溶液は、遮光して、-20℃で保存する。

<メモ>

本商品に含まれる FITC-dextran は固定処理ができません。そのため、FITC-dextran を用いるコントロール実験は生細胞で行う必要があります。PFA やメタノール固定は細胞内に取り込まれた FITC-dextran が漏出する恐れがあります。

導入したいタンパク質溶液 (10x) の調製

- 滅菌した PBS により 10 x 濃縮の導入タンパク質溶液を調製する。10 x タンパク質溶液は、使用前に用事調製する。推奨のタンパク質濃度は、下記の Table 1 を参照下さい。
- 10 倍濃縮溶液を作製するのが難しい場合には、下記の Table 2 の容量を最適化して下さい。

Table 1 推奨のタンパク質濃度

	終濃度	10x 濃度
抗体	50-250 µg/ml	500-2500 µg/ml
タンパク質		
Saponin	1-10 µg/ml	10-100 µg/ml
Cre	10-100 µg/ml	100-1000 µg/ml
ポジティブコントロール		
FITC-dextran	200 µg/ml	2 mg/ml

<メモ>

FITC-IgG など蛍光標識されたタンパク質の蛍光シグナルの細胞質への分散を蛍光イメージングで観察するためには、高濃度の蛍光標識タンパク質が必要となります。蛍光標識タンパク質の濃度が低い場合、エンドソームからの蛍光シグナルが細胞質のシグナルよりも高くなる可能性があります。

トランスフェクションのプロトコル

注意：以下のプロトコルはポジティブコントロールとして FITC-dextran を使用した例です。トランスフェクションの効率は、分子量や全体の電荷、細胞の種類、細胞の密集度など条件によって影響を受けます。最適な実験結果を得るために、実験毎に最適化を推奨しています。

細胞の準備

細胞は播種後、24 時間培養し、80%コンフルエントの状態にする。

<メモ>

培養した細胞のコンフルエンスはトランスフェクション効率に影響されます。各実験において使用する細胞の数は最適化をして下さい。

トランスフェクション

- 以下の Table 2 に従い試薬を混合する。

Table 2 トランスフェクション混合液の推奨量

Scale (well)	50x ProteoCarry® (μL)	10x Protein soln. (μL)	Base medium volume (μL)	Total volume (μL)
96	2	10	88	100
24	10	50	440	500
12	20	100	880	1000
6	40	200	1760	2000

<メモ>

タンパク質のトランスフェクションの基礎培地として、血清フリー、血清入り培地、PBS が選べます。ProteoCarry®による輸送効率は血清（10%以下の FBS）による影響を受けません。PBS が最も良い結果となったこともあります。お使いの細胞に応じて、基礎培地をお選び下さい。ただし、血清入り培地の場合、血清成分も ProteoCarry®により細胞内導入されるため、適切なコントロールの設定を推奨いたします。

- 培地を除き、PBS で 2 回細胞を洗浄後、上記で用意したトランスフェクション溶液を添加する。

3. 37℃で少なくとも 1 時間細胞をトランスフェクション溶液中でインキュベートする。
※インキュベーション時間はタンパク質に依存するため、実験毎に最適化を推奨します。

4. 培地を除き、PBS で細胞を 2 回洗浄後、血清入りの新しい培地を加えて適切な時間細胞を培養する。培養した細胞はその後のアプリケーション実験に使用する。

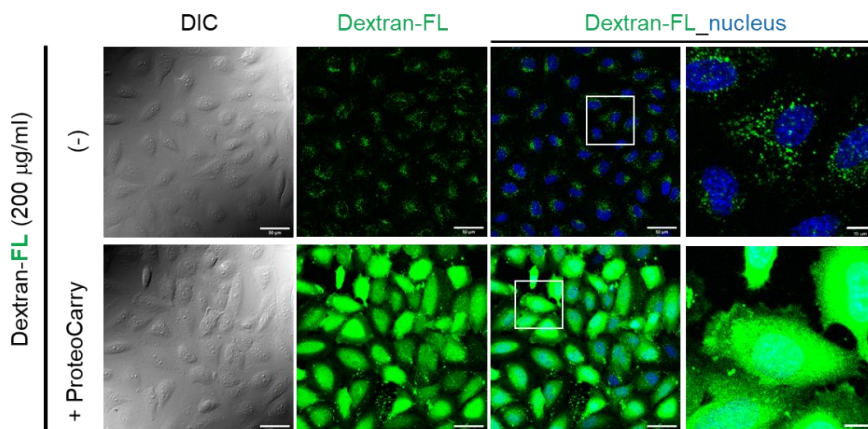
<メモ>

ProteoCarry[®]による細胞内へのタンパク質輸送の機構はエンドサイトーシスとマクロピノサイトーシス経路に基づいています。トランスフェクションの間は、エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシス経路に対する阻害剤を使用するのは避けてください。

アプリケーション例

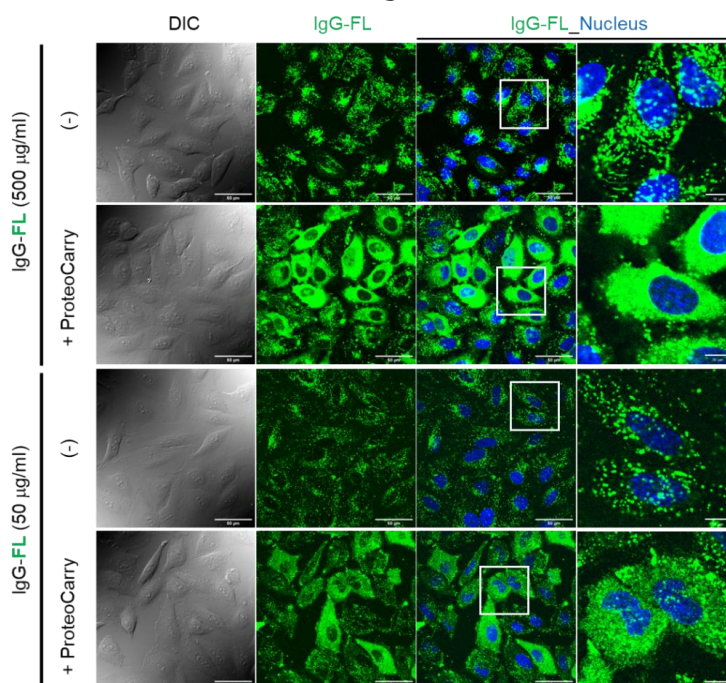
蛍光標識デキストランの導入

HeLa 細胞を ProteoCarry[®] 存在下および非存在下の条件で、緑色蛍光標識 Dextran (Dextran-FL ; 平均分子量 10 kDa, 培地に対する終濃度 200 µg/ml) と共に 37℃で 1 時間インキュベーションした。ProteoCarry[®] を添加していない場合 (-) は、細胞内でエンドソームのようなドット状の蛍光シグナルが検出された。一方, ProteoCarry[®] を用いた場合は細胞質全般に蛍光シグナルが観察され, Dextran-FL が細胞質に取り込まれていることが分かる。



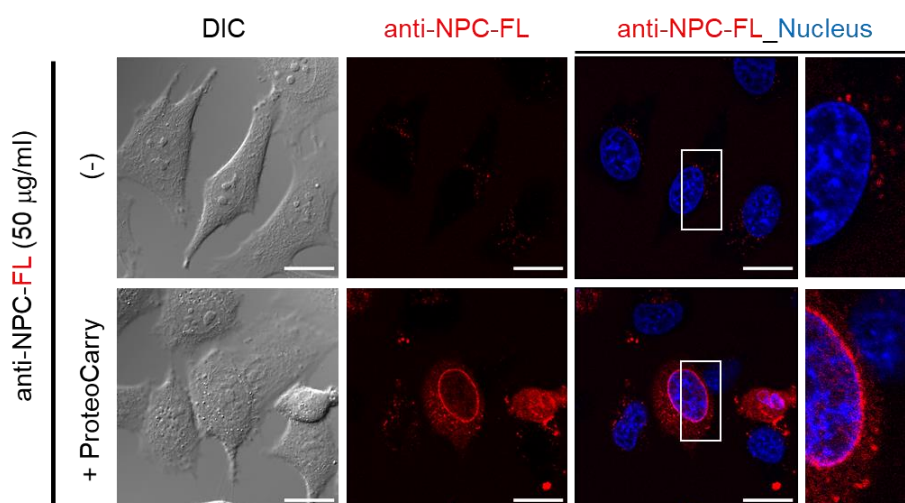
蛍光標識 IgG の導入

Hela 細胞を ProteoCarry[®] 存在下および非存在下で、緑色蛍光標識した IgG (IgG-FL, 終濃度 50 および 500 $\mu\text{g/ml}$) と共に 37°C で 1 時間インキュベーションした。ProteoCarry[®] を添加していない場合 (-)、IgG-FL はドット状のエンドソーム構造が観察された。一方で、ProteoCarry[®] 存在下では、一部の IgG-FL がエンドソーム内で検出されるものの、IgG-FL の細胞質への輸送を促進した結果となった。



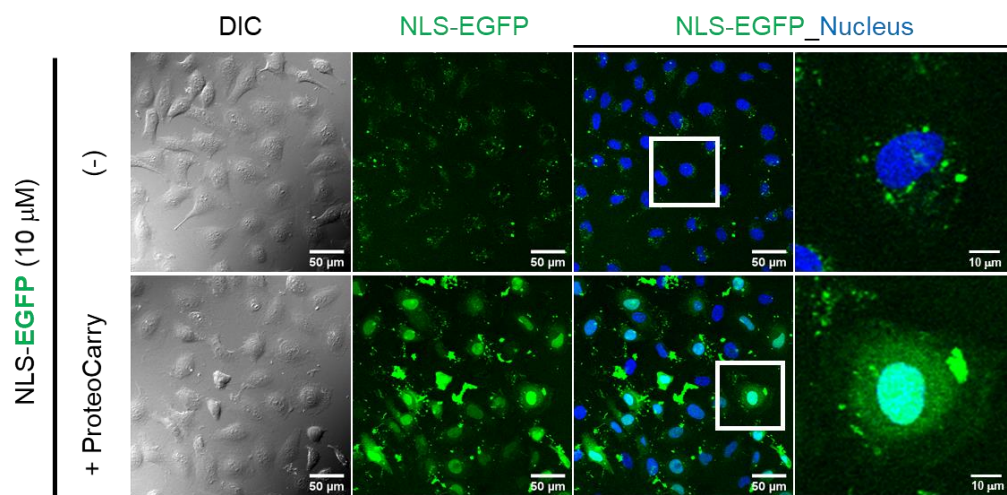
抗核膜孔複合体抗体の導入

蛍光標識した抗核膜孔複合体 (Nucleus pore complex ; NPC) 抗体 (Anti-NPC-FL ; 培地に対する終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$) を ProteoCarry[®] の存在下、非存在下で HeLa 細胞と 37°C で 1 時間インキュベーションした。ProteoCarry[®] を添加していない場合(-)、ドット状の蛍光シグナルが検出されるのみであるが、ProteoCarry[®] を添加した場合、核膜構造が明瞭に観察されており、抗 NPC 抗体が細胞質に取り込まれたのち核膜構造に結合していることが分かる。



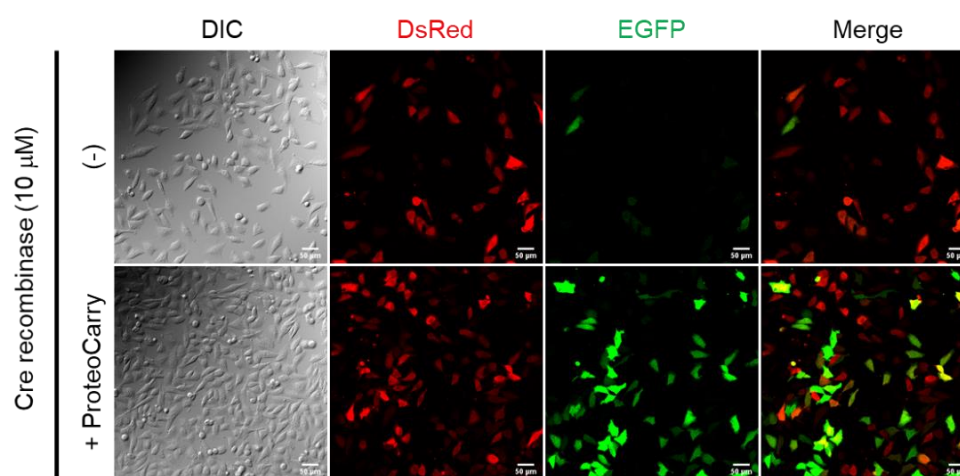
核局在性 EGFP の導入

HeLa 細胞を ProteoCarry® 存在下および非存在下で、1 時間 37℃ で核局在シグナルを有した EGFP (NLS-EGFP, 終濃度 10 μM) と共にインキュベーションした。ProteoCarry® を添加していない場合(-), ドット状のエンドソーム構造が僅かに観察されるのみであるが、ProteoCarry® を添加した場合、蛍光シグナルは主に核に局在しており、NLS-EGFP が核に移行している様子が観察された。



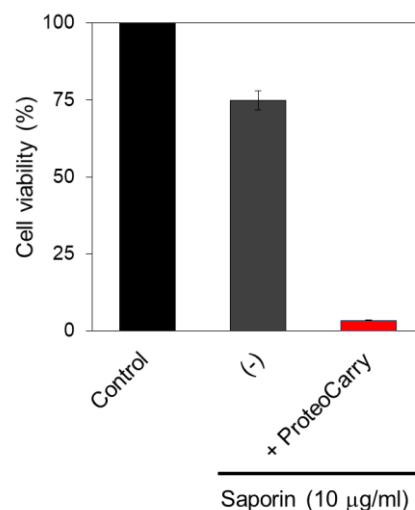
Cre recombinase の導入

Cre recombinase 非存在時には DsRed が発現し、Cre recombinase 存在時にのみ組換えが起こり GFP を発現するようにデザインされたプラスミド (loxP-DsRed-Stop-loxP-EGFP) を HeLa 細胞に遺伝子導入した。導入翌日に、ProteoCarry® の存在下、非存在下で遺伝子導入を実施した HeLa 細胞を Cre Recombinase 組換えタンパク質と 37℃ で 1 時間インキュベーションした。ProteoCarry® を添加していない条件では、殆どの細胞が DsRed を発現したままであるが、ProteoCarry® を添加した細胞では GFP が発現しており、本商品が Cre recombinase の機能を維持したまま細胞質に導入できることが分かる。



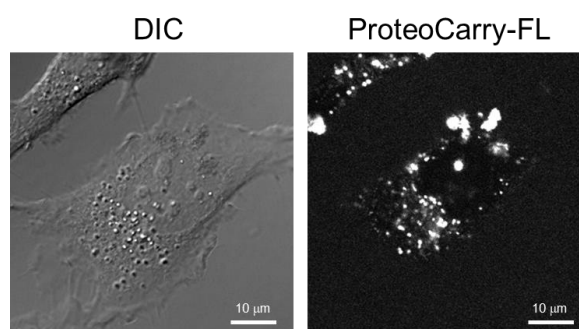
酵素依存的毒素タンパク質 Saporin の導入

Saporin はリボソームに直接結合し RNA グリコシダーゼ活性によりリボソームを不活性化することで細胞死を誘導する毒素タンパク質である。ProteoCarry® の存在下、非存在下で Saporin を 37℃ で 1 時間 RAW264.7 細胞とインキュベーションした。24 時間の培養後、MTT アッセイ法により細胞生存を確認した。ProteoCarry® を添加していない細胞では、サポリンによって誘導された細胞死は 30% 以下であったのに対し、ProteoCarry® を添加した場合、Saporin の細胞毒性が大幅に増加し、大部分の細胞が死滅した (>90%)。



参考データ : ProteoCarry® の細胞内局在

ProteoCarry® の細胞内局在性を観察するため、蛍光標識した ProteoCarry® (ProteoCarry®-FL) を HeLa 細胞に添加し、蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。蛍光シグナルはドット状のエンドソーム構造が観察されたものの、細胞質からはほとんど観察されなかった。ProteoCarry® はエンドソーム膜を傷害後もエンドソーム膜結合したまま留まっていると考えられる。



免責事項

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2017 年 10 月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル（以下、商品資料）を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。

ProteoCarry™ <Protein transfection reagent>

Catalog NO. FDV-0015

Research use only, not for human or animal therapeutic or diagnostic use

日本語版はこちらから
ダウンロードできます。
①弊社ウェブサイトより
Webページ番号検索にて
【70873】で検索



Product Background

ProteoCarry™ is a novel peptide-based transfection reagent for exogenous proteins such as functional proteins, peptides and antibodies with highly efficiency of cytosolic delivery. Protein transfection, intracellular delivery of proteins, is a powerful method to analyze cellular response to the protein of interest. While plasmid-based gene expression generally needs 12-24 hours to express proteins well, protein transfection reagents can immediately import functional proteins into living cells within several hours. Although many protein transfection reagents including peptide-, cationic lipid- and polymer-based compounds have been developed to date, these reagents struggle to deliver proteins into “cytosol”. Commonly these reagents interact with protein to form complexes and subsequently protein-reagent complexes are entered into cells via endocytosis pathway. But protein-reagent complexes are able to escape endosomes with little efficiency and consequently transported to lysosomes to be degraded. Highly effective endosomal escape of proteins is the most important subject of protein transfection reagents.

ProteoCarry™ can overcome this problem based on a novel and potent pH-dependent endosomal membrane-lytic activity. Proteins and ProteoCarry™ can be delivered into endosomes by endocytosis pathway and also escape to cytosol by its highly membrane-lytic activity with low cytotoxicity.

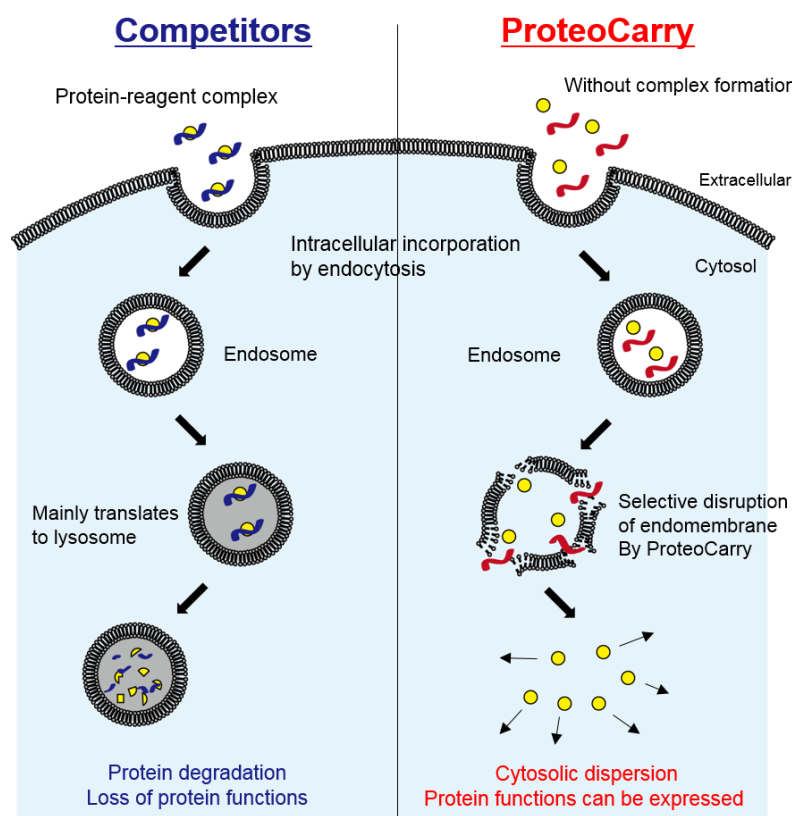


Figure 1. The principle of ProteoCarry™

Left: Problems of conventional competitors

Right : Principle of ProteoCarry™

Description

Catalog Number: FDV-0015

Kit components

- ProteoCarry™, 4mg in vial (**vial A**)
- FITC-dextran for positive control, 2 mg in vial (**vial B**)

Solubility: ProteoCarry™, soluble in water

FITC-dextran, soluble in water

Assay number:

Each reagent is enough to perform following assay numbers under the standard protocol below.

ProteoCarry™		FITC-dextran	
6 well scale	14 assays	6 well scale	5 assays
12 well scale	28 assays	12 well scale	10 assays
24 well scale	56 assays	24 well scale	20 assays
48 well scale	140 assays	48 well scale	50 assays
96 well scale	280 assays	96 well scale	100 assays

Application examples

- Intracellular delivery of exogenous or recombinant proteins including peptides, enzymes, antibodies
- Intracellular delivery of bio-macromolecules including glycosaminoglycans etc.

Storage

Storage (powder) : Store powder at -20°C

Storage (solution) : After reconstitution in water (please read “How to use”), aliquot and store at -20°C.

Avoid repeated freeze-thaw cycles. For FITC-dextran protect from light.

Validated cell types

HeLa, SW280, COS7, NIH3T3, HUVEC

How to use

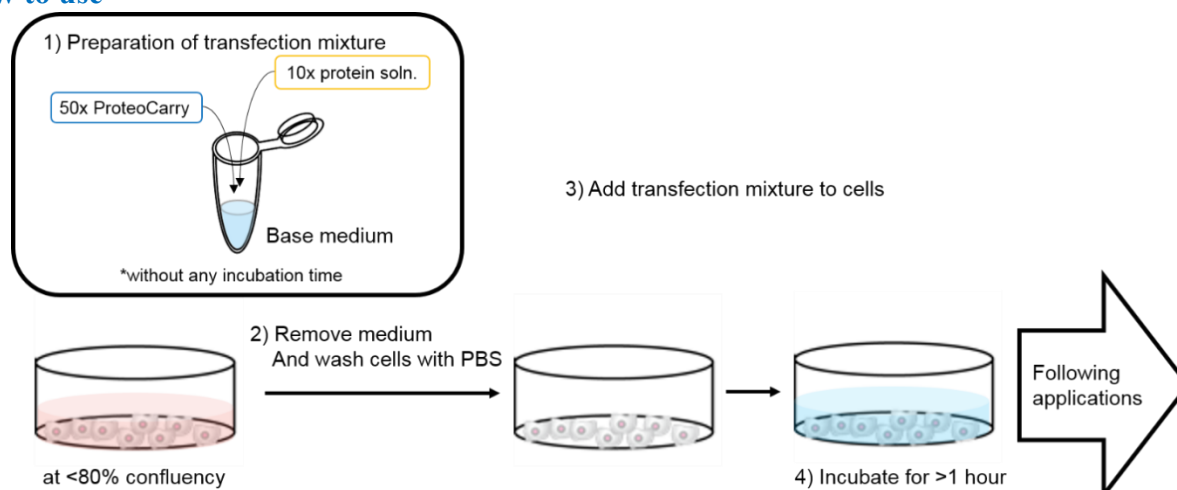


Figure 2. Overview of procedure

Preparation of 50x ProteoCarry™ stock solution

1. Add 581 µl of sterile ultrapure water to **vial A** and mix gently well to be 50x concentrated solution.
2. Stock solution should be stored at -20°C for up to 6 months in small aliquots to avoid repeated freeze and thaw cycles.

Preparation of positive control

1. Add 1 mL of sterile PBS to **vial B** and mix gently well to prepare 10x stock solution (2 mg/ml).
2. Stock solution should be stored at -20°C with protecting from light.

<Memo>

FITC-dextran in this kit is a non-fixable form dextran. Control experiments using FITC-dextran should be on live cells, not on PFA or methanol-fixed cells. After cell fixation, FITC-dextran may be leaked from cells.

Preparation of protein solution

1. Prepare 10x concentrated protein solution with sterile PBS. 10x solution should be prepared at time of use. Please refer Table 1 as a suggestion of protein concentrations.
2. If it is challenging to prepare 10x concentrated solution, please optimize Table 2 below.

Table 1 Suggested concentration of proteins

	Final conc.	10x conc.
Antibody	50-250 µg/ml	500-2500 µg/ml
Proteins		
saponin	1-10 µg/ml	10-100 µg/ml
Cre	10-100 µg/ml	100-1000 µg/ml
Positive control		
FITC-dextran	200 µg/ml	2 mg/ml

<Memo>

To observe cytosolic disperse of fluorescent signal from fluorophore-labelled proteins such as FITC-IgG, high concentration of proteins may require. Under the low concentration of fluorophore-labelled proteins, fluorescent signal from endosome may be higher than the signal from cytosol.

Transfection protocol

CAUTION: Following protocol is an example for the positive control experiment, FITC-dextran. Transfection efficiency is highly affected by protein's profile such as molecular weight and net charge, cell-type, and confluency of cells. To obtain best results, please optimize condition for your experiments.

Cell preparation

Cells are seeded and allowed to reach up to 80% confluency in 24 hours.

<Memo>

Confluency of cultured cells may be influence on transfection efficiency. Please optimize cell number for each experiment.

Transfection

1. Mix reagents according to the following table (= Transfection mixture).

Table 2 Suggested amount of transfection mixture

Scale	50x ProteoCarry™ (μL)	10x Protein soln. (μL)	Base medium volume (μL)	Total volume (μL)
96 well	2	10	88	100
24 well	10	50	440	500
12 well	20	100	880	1000
6 well	40	200	1760	2000

<Memo>

You can choice serum-free, serum-supplemented media or PBS as the basal medium of protein transfection. Delivery efficiency through ProteoCarry™ is not affected by serum (<10% FBS). In some cases, PBS give the best results. Please select a basal medium according to your cells of tested.

2. Remove culture medium, wash cells with PBS twice and add the transfection mixture prepared above.
3. Culture cells in the transfection mixture at 37°C for at least 1 hour. The incubation time for the best delivery efficiency is depends on proteins. Please optimize incubation time.
4. Remove culture medium, wash cells with PBS twice and add fresh medium containing serum and culture cells for appropriate time for your experiments. Cells can be used for following applications.

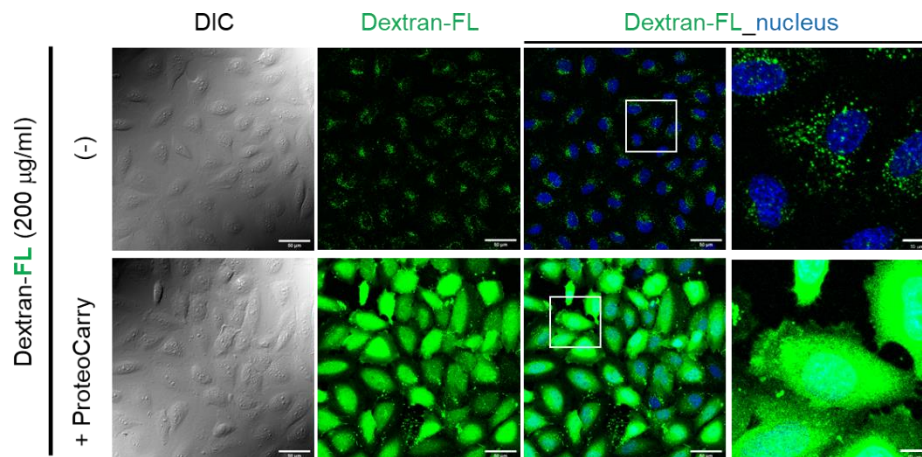
<Memo>

Mechanism of intracellular delivery of proteins by ProteoCarry™ is based on endocytosis and macropinocytosis pathways. Please avoid to use inhibitors for endocytosis and/or macropinocytosis pathway during transfection.

Application data

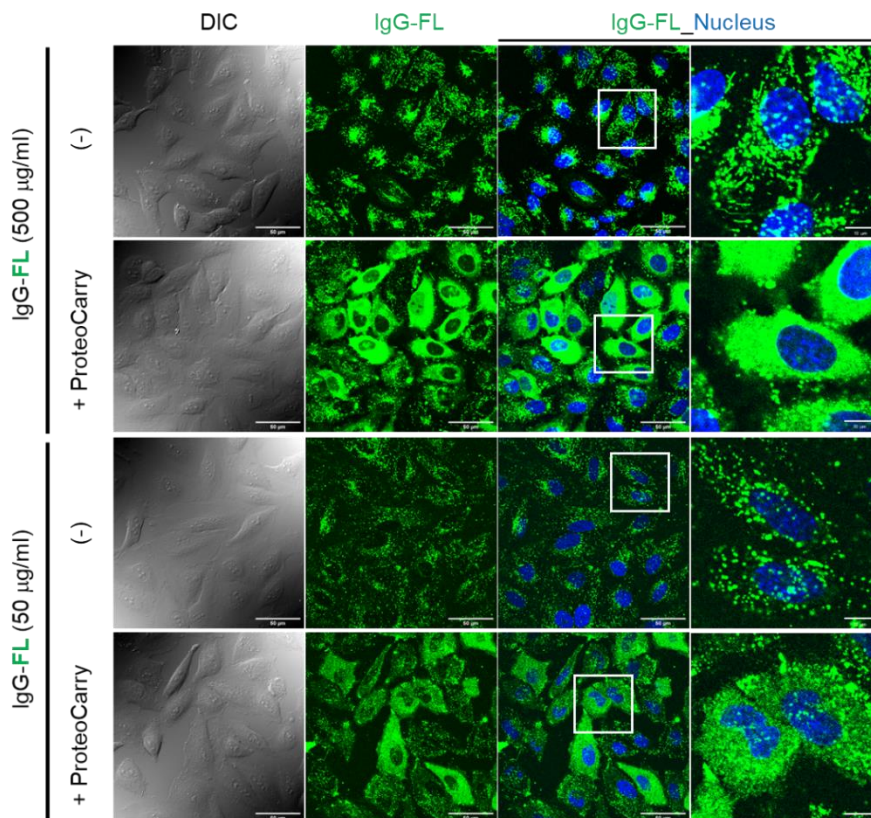
Transfection of fluorophore-conjugated dextran

HeLa cells were treated with green fluorophore-conjugated dextran (Dextran-FL, average MW 10 kDa, final 200 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of ProteoCarryTM (1x conc.) for 1 hour at 37°C. Without ProteoCarryTM, fluorescent signals were detected from endosome-like dot structures inside cells. On the other hand, ProteoCarryTM clearly stimulated cytosolic delivery of Dextran-FL.



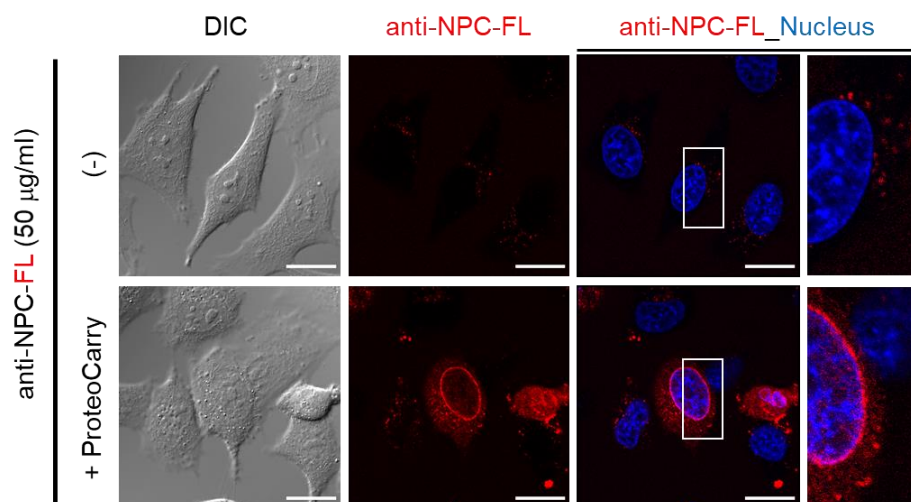
Transfection of fluorophore-conjugated IgG

HeLa cells were treated with green fluorophore-conjugated IgG (IgG-FL, final 50 or 500 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of ProteoCarryTM (1x conc.) for 1 hour at 37°C. Without ProteoCarryTM, IgG-FLs were aggregated into endosome-like dot structures. On the other hand, ProteoCarryTM promoted cytosolic delivery of IgG-FL even if some IgG-FLs were detected in endosomes.



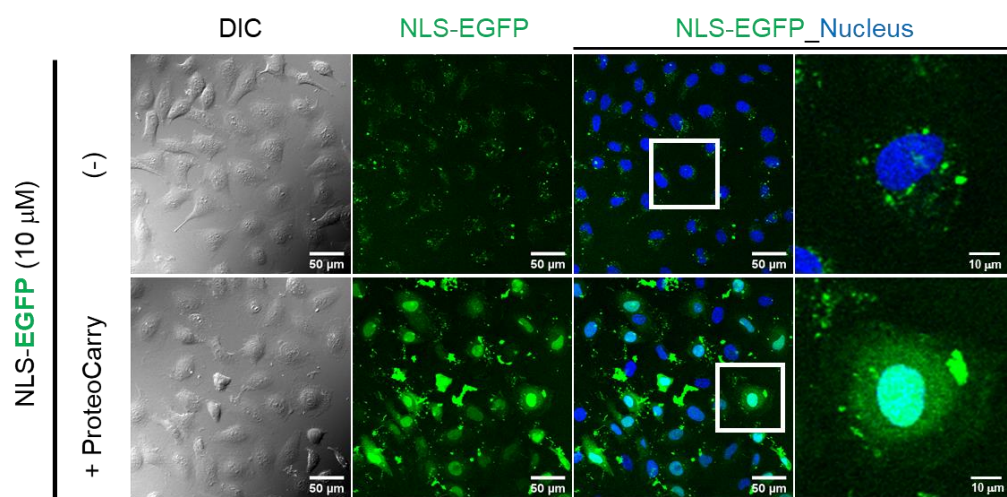
Transfection of fluorophore-conjugated anti-nucleus pore complex (NPC)

HeLa cells were treated with red fluorophore-conjugated anti-nucleus pore complex (NPC) antibody (anti-NPC-FL, final 50 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of ProteoCarryTM (1x conc.) for 1 hour at 37°C. Without ProteoCarryTM, a little of fluorescent signal was observed in dot-like structure. On the other hand, ProteoCarryTM clearly promoted localization of anti-NPC-FL to peri-nuclear structure. This result indicates that ProteoCarryTM could induces incorporation of anti-NPC-FL into cytosol and binding of antibody to nucleus pore complex.



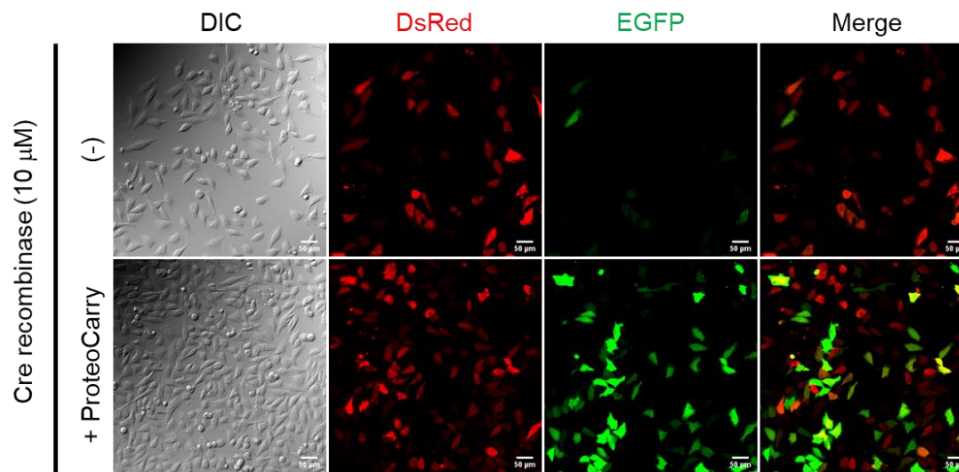
Transfection of nuclear-localizable EGFP

HeLa cells were treated with nuclear localization signal (NLS)-tagged EGFP (NLS-EGFP, final 10 μM) in the presence or absence of ProteoCarryTM (1x conc.) for 1 hour at 37°C. Without ProteoCarryTM, a little of fluorescent signal was observed in endosome-like dot structures. On the other hand, ProteoCarryTM promoted nuclear-localization of NLS-EGFP.



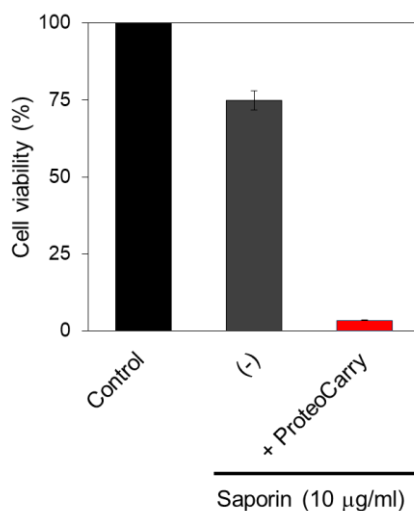
Transfection of Cre recombinase for Cre/loxp recombination assay

HeLa cells were transfected with a plasmid which encodes loxP-DsRed-stop-loxP-EGFP sequence by conventional lipofection reagent. Next day, the HeLa cells were treated with recombinant Cre recombinase (final 10 μ M) for 1 hour at 37°C with or without ProteoCarry™ (1x conc.). Without ProteoCarry™, almost cells still keep DsRed expression under the treatment of Cre recombinase. On the other hand, ProteoCarry™ promoted conversion from DsRed to EGFP by Cre/loxP recombination.



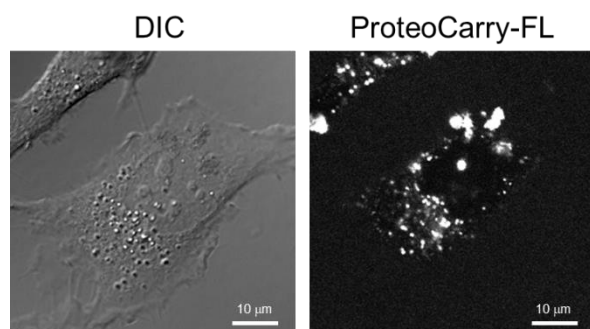
Transfection of Saporin enzyme

Saporin is an enzymatically cytotoxic protein which binds to ribosomes and inactivates ribosomes via its RNA glycosidase activity. RAW264.7 cells were treated with saporin (final 10 μ g/ml) with or without ProteoCarry™ for 1 hour at 37°C. After 24 hours culture, cell viability was measured by MTT assay. Without ProteoCarry™, saporin induced cell death with less than 30% efficiency. On the other hand, ProteoCarry™ dramatically increased cytotoxicity of saporin and almost cells were dead (>90%).



Reference data: Interacellular localization of FL-labeled ProteoCarry™

To monitor intracellular localization of ProteoCarry™, fluorophore-labeled ProteoCarry™ (ProteoCarry™-FL) was prepared and HeLa cells were treated with ProteoCarry™-FL. Fluorescent signal was observed by confocal microscopy. Signal was detected mainly in endosomal dot like structure and little fluorescent signal was observed in cytosol. This data indicates ProteoCarry™ keeps binding to endosomal membrane after lysis of endosomes.



Disclaimer/免責事項

This product has been commercialized by Funakoshi Co., Ltd. based on the results of academic research, and the advertisement text, figures and manuals (hereinafter “Product information”) have been prepared based on published research reports on October, 2017. The academic interpretation at the time of creation of the Product Information may change in accordance with future developments in the relevant research field and expansion of various scientific findings, and the latest version and certainty of the Product Information are not guaranteed. The specifications of this product and the Product Information are subject to change without notice. Please contact us for the latest information.

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2017年10月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル（以下、商品資料）を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。



E-mail Newsletter
Sign Up

Japanese



English



funakoshi
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE

URL: <http://funakoshi.co.jp>
9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033