

培養細胞へのトランスフェクションの最適化

哺乳動物細胞への DNA の導入効率は、多くの要因に依存し、それらの因子は細胞によっても異なります。MultiFectam は、標準的なプロトコール（試薬と DNA の混合比率 B）に従って操作すれば、多くの細胞に遺伝子導入可能ですが、培養細胞の種類によって高い導入効率を得るためにトランスフェクション条件の最適化をお勧めします。ここでは、MultiFectam を使用する場合の最適な条件（高い導入効率、低い細胞毒性）を見出すための簡単な条件検討法をご紹介します。最適化とは、目的の細胞に、できるだけ多くの DNA を導入し、できるだけ多くのタンパク質を発現させ、それに対して細胞の生存性への影響を最小限にすることができる条件を見つけることです。

MultiFectam を使った場合のトランスフェクション条件の最適化

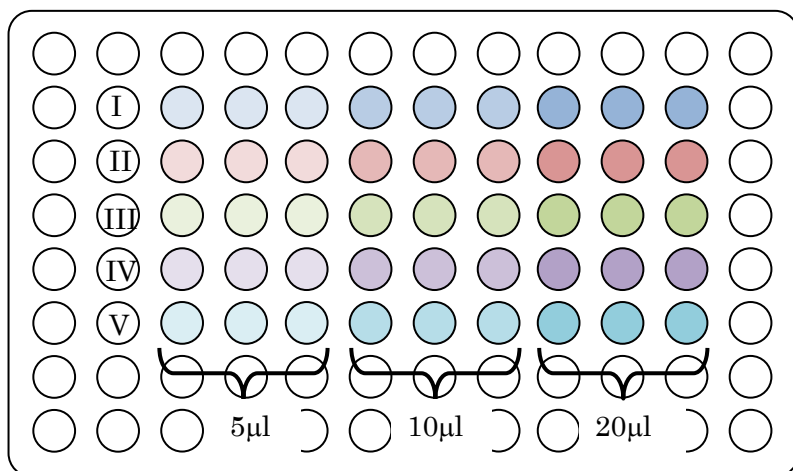
細胞への最適なトランスフェクション条件は、実際に実験を行い決定する必要があります。手間と時間をかけたとしても、そうして決定した最適な条件は、その後の実験のデータを得るための基礎的な条件になり、多くの情報を細胞から引き出すためには、非常に大切です。あなたの細胞の健康への影響を最小限にして最高の情報を得るため、あらかじめ条件検討することを推奨します。

MultiFectam トランスフェクション試薬は、非常に簡単な操作で、目的の遺伝子を最小限の細胞毒性で導入することができます。トランスフェクション条件の最適化は 96 - well プレートで、図 2 に示すような方法で検討すると簡単です（手順を参考）。多くの場合、DNA とトランスフェクション試薬の比率とそのボリューム（液量/DNA 量）が導入効率に影響を与えます。試薬と DNA の比は、負に帯電した DNA に対して試薬のカチオン性脂質との比で決定されます。ここでは、典型的な比率として A,B,C の 3 段階、液量として各ウェルあたり 5-20 μ l を添加しています。実際に行ってみると、試薬を多く加えればたくさんタンパク質が発現するとは限らないことがわかります。タンパク質の発現量と細胞の生存性を合わせて観察することで、最適な条件を見出すことが可能です。

手順：

- ① 細胞を準備する。細胞の種類によって異なりますが、96well の 1well あたり、付着細胞では $1 \sim 2 \times 10^4$ 、浮遊細胞では $2 \sim 10 \times 10^5$ 程度の細胞密度でトランスフェクションすることをお勧めします。通常は前日にプレートに蒔きます。血清を含む培地 100 μ l になるように細胞を各 well に加えます。
- ② 指定された比率の DNA と MultiFectam の混合液を調製する。MultiFectam はあらかじめ、1ml/vial の滅菌水で溶解しておきます。

I	コントロール	水	90 μ l	+	MultiFectam	0 μ l	=	90 μ l
II	比率 A	DNA	1.2 μ g/70 μ l	+	MultiFectam	20 μ l	=	90 μ l
III	比率 B	DNA	1.2 μ g/60 μ l	+	MultiFectam	30 μ l	=	90 μ l
IV	比率 C	DNA	1.2 μ g/50 μ l	+	MultiFectam	40 μ l	=	90 μ l
(V*	コントロール	水	60 μ l	+	MultiFectam	30 μ l	=	90 μ l)
- ③ 混合後、30 分待つ。
- ④ それぞれのサンプル(I-V)に OPTI-MEM（無血清培地）を 30 μ l 加える（総量 120 μ l）。
（注* このコントロールは必ずしも行う必要はありませんが、MultiFectam 単独の毒性を評価できます。）
- ⑤ 混合後 5 分待つ。
- ⑥ 各 well に 5/10/20 μ l の試薬を加える。
- ⑦ 24 時間後に生存性試験、遺伝子導入効率を測定する。例えば、Luciferase 発現ベクター(pGL4.51, Cat# E1320)をコントロール DNA として使用しますと、ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Cat.# E6110)と CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Cat.# G6080)を使うことで、1 枚のプレートで細胞の生存性と導入効率を評価できます。



その他の条件など：

●細胞の状態：細胞は、overconfluent にならないように定期的に新鮮な培地で継代し、増殖が正常であることが重要です。理想的には、トランスフェクション際には、95%以上の生存性で、75-90%コンフルエントの状態であることが望まれます。継代数は、記録しておくべきであり、非常に低い継代数や、高い継代数では、生物学的反応がばらつく場合があります。

●DNA の品質：トランスフェクションに使用するプラスミド DNA は、高純度である必要があります（260/280 比が 1.7 から 1.9）。また毒性や炎症性サイトカイン産生などの予期しない細胞応答を避けるために低エンドトキシンレベルであることが望まれます。このようなトランスフェクションに最適なプラスミドを調製するのに PureYield™プラスミド精製システムは最適です。

●トランスフェクション後のアッセイまでの時間：最適な時間は、発現させるためのベクター、目的のタンパク質の性質、またアッセイの感度にも依存しますが、通常、トランスフェクション後 24〜48 時間にアッセイを行います。必要に応じて最適な時間を検討してみることをお勧めします。

問い合わせ先

プロメガテクニカルサービス部

Tel: 03-3669-7980 / Fax: 03-3669-7982

E-mail: prometec@jp.promega.com