

# Technical Notes



## FuGENE® HD トランスフェクション条件の最適化

トランスフェクションを成功させるために、トランスフェクション試薬と DNA (プラスミド) の割合および添加量の最適化は非常に重要です。

FuGENE® HD 製品マニュアルに掲載される混合比 (FuGENE® HD:DNA=4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1) および添加容量 (2, 5, 10 $\mu$ l) について、導入効率を検討する手順をご紹介します。表 1 の混合比の組み合わせで最適化を行います。

表 1. 96well プレートにおける培地量と最適化のための FuGENE® HD と DNA の比率

	Ratio of FuGENE® HD Transfection Reagent to DNA					
	4:1	3.5:1	3:1	2.5:1	2:1	1.5:1
Medium to a final volume of <sup>1</sup>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
DNA amount	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g
Volume of FuGENE® HD Transfection Reagent <sup>1</sup>	8 $\mu$ l	7 $\mu$ l	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	4 $\mu$ l	3 $\mu$ l

<sup>1</sup>The volumes were calculated for 20 wells (5 $\mu$ l/well) of a 96-well plate for each ratio.

以下のリンクより、96well プレートでの最適化のためのグラフ作成用テンプレート (エクセルファイル形式) をダウンロードしてご利用頂けます。

・ FuGENE® HD Optimization Analysis Worksheet

<http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-optimization-analysis/>

### 手順

- ① トランスフェクションの前日に、細胞を準備する。96well プレートに血清を含む培地 100 $\mu$ l/well で、80%コンフルエントになるように細胞を蒔く。  
(例: HEK-293 細胞の場合、 $2 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ l/well)
- ② トランスフェクション当日、表 1 の比率の DNA/ FuGENE® HD 混合液を調整する。滅菌チューブまたは U- or V-bottom プレートに、無血清培地または Opti-MEM と DNA 2 $\mu$ g を最終容量 100 $\mu$ l となるように加えた後、各容量 (3-8 $\mu$ l) の FuGENE® HD を加える。
- ③ 混合後、0-15 分間待つ。
- ④ ②で作成した DNA/ FuGENE® HD 混合液を、各 well に 2, 5, 10 $\mu$ l を加える (図 1 参照)。
- ⑤ 24 時間後に細胞生存性試験、遺伝子導入効率の測定を行う。

図 1 トランスフェクション最適化のための 96well プレートレイアウト

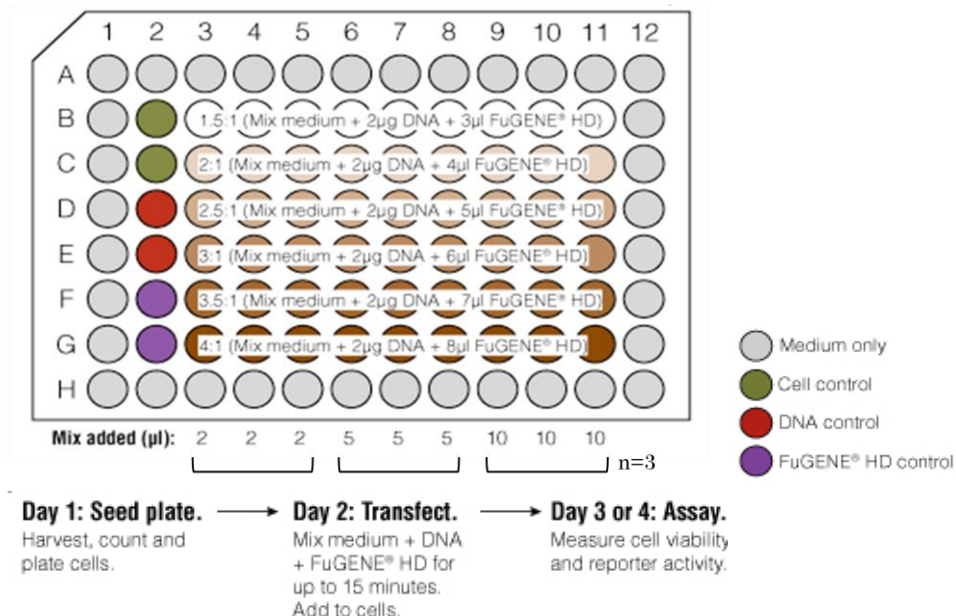
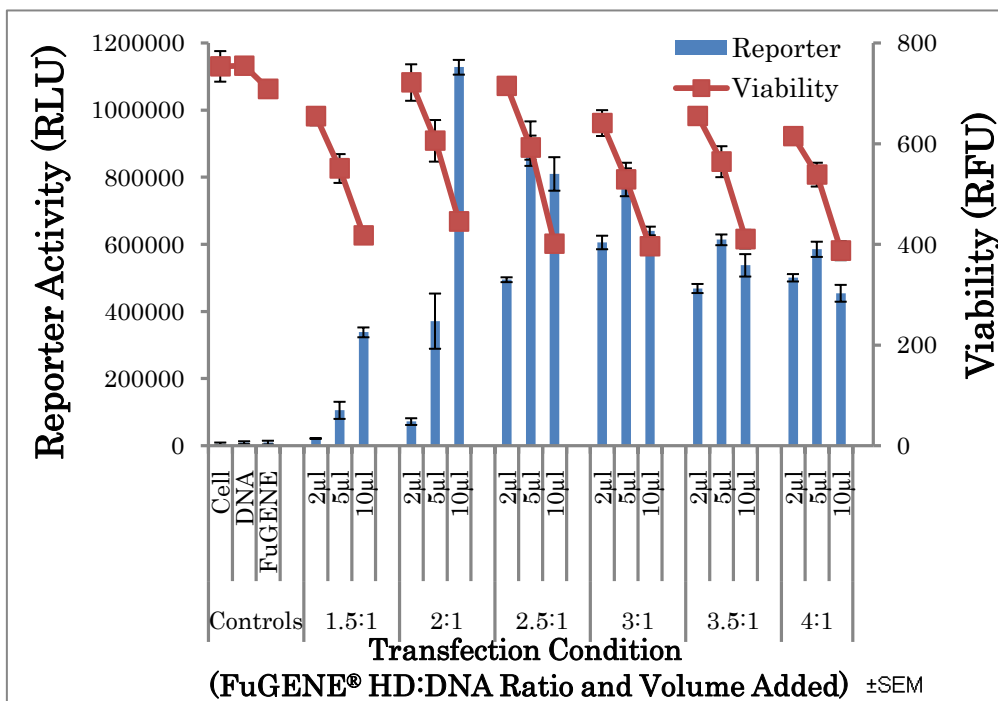


図 2 では以下の条件で最適化を検討した例を示しています。

- DNA : pGL4.13 Vector (Cat.# E6681)
- 細胞生存性試験 : CellTiter-Fluor™ Viability Assay (Cat.# G6080)
- レポーターアッセイ : ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Cat.# E6110)
- 蛍光および発光の測定機器 : GloMax®-Multi Detection System

図 2 HEK-293 細胞を用いたトランスフェクション最適化の例



検討の結果、HEK-293 細胞の最適条件は、混合比 2.5:1、混合液 5μl 添加となった。