

Effectene[®] Transfection Reagent

プロトコールとトラブルシューティング

次世代の脂質テクノロジー

目次	ページ
プロトコール	
付着細胞のトランジェントあるいはステーブル・トランスフェクション用	2
浮遊細胞のトランジェントあるいはステーブル・トランスフェクション用	5
トラブルシューティング	8



プロトコール：付着細胞のトランジェントあるいはステابل・トランスフェクション用

本プロトコールは、60 mmディッシュ中で培養した付着細胞のトランスフェクション用です。通常、60 mmディッシュ中の付着細胞へのトランスフェクションに必要なDNA量は1 µgで十分です。その他の培養ディッシュフォーマットを用いてトランスフェクションを行なう際の、各ステップでの最適なDNA量および試薬の量を4ページの表3に示しました。各培養ディッシュでの最適な播種数は、英語版 Handbook 9ページのTable 1を参照してください。Effectene Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率を要する場合には、それぞれの細胞株において個別にトランスフェクション条件の至適化を行なうことをお勧めします。トランスフェクションの至適化に関しては、英語版 Handbook 9 ~ 11ページのガイドラインを参照してください。

1. トランスフェクション前日に、血清および抗生物質を含む適切な培養液 5 ml 中の $2 \sim 8 \times 10^5$ 個(細胞株に依存)の細胞を 60 mm の培養ディッシュに播種する。
2. 細胞を通常の培養条件下 (37 °C、5% CO₂) でインキュベートする。トランスフェクション当日に、培養ディッシュの 40 ~ 80 % が細胞で被われているのが理想的である。
3. TEバッファー (pH7 ~ 8) に溶解したDNAの 1 µg (DNA濃度は0.1 µg/µl以上) をDNA凝縮バッファー (Buffer EC) で希釈し、最終容量を 150 µl にする。8 µl の Enhancer を添加し、1 秒間ボルテックスする。

重要：DNAとEnhancerの比率を常に一定に保ちます。

注：プラスミドDNAの品質は、効率、再現性、毒性、そして結果の解釈などのいくつかのトランスフェクションのパラメータに大きな影響を与えますので、最高純度のプラスミドDNAのみを使用してください。HiSpeed®、QIAfilter および QIAGEN Plasmid Kit を用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞株のトランスフェクションに最適です。すべての細胞株で最も高い再現性と最良の結果を得るためには、EndoFree® Plasmid Kit で精製したDNAを使用することをお勧めします。本キットはプラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンを効率的に除去することで、より最適なトランスフェクション結果が確実に得られます。

4. 室温 (15 ~ 25 °C) で 2 ~ 5 分間インキュベーション後、スピンドウンし溶液を収集する。
5. DNA・Enhancer混合液に 25 µl の Effectene Transfection Reagent を添加し、ピペットで5回アップダウンを行ない溶液を混和するか、ボルテックスで10秒間混和する。

注：Effectene Reagentを常に氷上に保存する必要はありません。10 ~ 15分間室温に放置しても安定性に変化はありません。

6. トランスフェクション・コンプレックス形成のために室温 (15 ~ 25 °C) で 5 ~ 10分間インキュベートする。

7. トランスフェクション・コンプレックス形成中に、培養ディッシュから培養液を静かに吸引除去し、**4 ml**のPBSで細胞を1回洗浄する。**4 ml**の新鮮な培養液（血清および抗生物質を含有）を細胞に添加する。
8. **1 ml**の細胞培養液（血清および抗生物質を含有）をトランスフェクション・コンプレックスを含むチューブに添加する。ピペットで**2回**アップダウンして混和後、直ぐにトランスフェクション・コンプレックスを**60 mm**の培養ディッシュ中の細胞へ一滴ずつ添加する。混合液が均一に行き渡るように培養ディッシュを静かに揺り動かす。
9. トランスフェクトされた遺伝子の発現のために適切な時間、および通常の増殖条件下で、トランスフェクション・コンプレックスを含む細胞をインキュベートする。インキュベーション時間は、使用するアッセイおよび遺伝子に応じて決定する。

オプション：ほとんどの場合、トランスフェクション・コンプレックスを除去する必要はありません。しかし、細胞毒性が観察された場合には、トランスフェクションの6～18時間後にEffectene・DNAコンプレックスを除去し、PBSで1回細胞を洗浄後に新鮮な培養液を5 ml添加してください。

10. トランジェント・トランスフェクションには遺伝子発現用の細胞アッセイを行なう。

*β-gal*あるいは*cat*レポータープラスミドをトランスフェクトした細胞では、通常、トランスフェクション後、24～48時間のインキュベーションで最高の発現レベルに達します。

ステーブル・トランスフェクションでは、トランスフェクション**24～48**時間後に、適切な抗生物質を含む選択培地で細胞を**1：5**から**1：10**に希釈する。コロニーが出現するまで選択培地中で細胞を増殖する。

注：使用する細胞株および抗生物質のそれぞれの組み合わせにおいて、抗生物質濃度と細胞数の相関グラフ（細胞死亡率のグラフ）の作製をお勧めします。抗生物質濃度と細胞の死亡率の関係は、細胞集密度により影響されることを考慮してください。

トランスフェクトした細胞をまず通常の培養液（例えば、選択のための薬物を含まない）にプレーティングし、1～2日培養した後に選択した培養液を添加する必要がある場合もあります。

表3. Effectene Reagentを用いて様々な培養ディッシュフォーマット中の付着細胞にトランスフェクトする際の最適なDNA量および各試薬量

培養ディッシュ フォーマット	DNA (μg)	Enhancer (μl)	DNA と Buffer EC の最終量 (μl)	Effectene Reagent 量 (μl)	細胞に 添加する 培養液量 (μl) [†]	混合液に 添加する 培養液量 (μl) [†]
プロトコールステップ	3	3	3	5	7	8
96ウェルプレート	0.1	0.8	30	2.5*	100	0
48ウェルプレート	0.15	1.2	50	4*	150	200
24ウェルプレート	0.2	1.6	60	5	350	350
12ウェルプレート	0.3	2.4	75	6	800	400
6ウェルプレート	0.4	3.2	100	10	1600	600
60 mm ディッシュ	1	8.0	150	25	4000	1000
100 mm ディッシュ	2	16	300	60	7000	3000

* 96あるいは48ウェルプレートでトランスフェクションを行なう場合には、まず、Buffer ECでEffectene Reagentをそれぞれ最終容量が20 μl あるいは50 μl になるように希釈し、ステップ3で希釈したDNA・Enhancer混合液に添加する。

[†] 培養液は通常の細胞培養に用いる血清濃度を有すること。

プロトコール：浮遊細胞のトランジェントあるいは ステーブル・トランスフェクション用

本プロトコールは、60 mmディッシュ中で培養した浮遊細胞のトランスフェクション用です。通常、60 mmディッシュ中の浮遊細胞へのトランスフェクションに必要なDNA量は1 µgで十分です。その他の培養ディッシュフォーマットを用いてトランスフェクションを行なう際の、各ステップでの最適なDNA量および試薬の量を7ページの表4に示しました。各培養ディッシュでの最適な播種数は、英語版 Handbook 9ページのTable 1を参照してください。Effectene Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率を要する場合には、それぞれの細胞株において個別にトランスフェクション条件の最適化を行なうことをお勧めします。トランスフェクションの最適化に関しては、英語版 Handbook 9～11ページのガイドラインを参照してください。

1. トランスフェクション前日に細胞を分ける。
2. トランスフェクションの当日に遠心分離により細胞を回収し、10 mlのFalconチューブ中で細胞ペレットをPBSで1回洗浄する。
3. 血清および抗生物質を含む培養液4 mlで、 $2.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 個（細胞株に依存）の細胞を懸濁して60 mm培養ディッシュに播種する。
4. TEバッファー（PH 7～8）で溶解した1 µgのDNA（DNA濃度は0.1 µg/µl以上）をDNA凝縮バッファーで（Buffer EC）で希釈し、最終容量を150 µlにする。8 µlのEnhancerを添加し、1秒間ボルテックスする。

重要：DNAとEnhancerの比率を常に一定に保ちます。

注：プラスミドDNAの品質は、効率、再現性、毒性、そして結果の解釈などのいくつかのトランスフェクションのパラメータに大きな影響を与えますので、最高純度のプラスミドDNAのみを使用してください。HiSpeed、QIAfilterおよびQIAGEN Plasmid Kitを用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞株のトランスフェクションに最適です。全ての細胞株で最も高い再現性と最良の結果を得るためには、EndoFree Plasmid Kitで精製したDNAを使用することをお勧めします。本キットはプラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンを効率的に除去することで、より最適なトランスフェクション結果が確実に得られます。

5. 室温（15～25℃）で2～5分間のインキュベーション後、スピンドウンし溶液を収集する。
6. DNA・Enhancer混合液に25 µlのEffectene Transfection Reagentを添加し、ピペットで5回のアップダウンを行ない溶液を混和するか、10秒間ボルテックスする。

注：Effectene Reagentは常に氷上に保存する必要はありません。10～15分間室温に放置しても安定性に変化はありません。

7. トランスフェクション・コンプレックス形成のために室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。

8. 1 mlの細胞培養液（血清および抗生物質を含有）をトランスフェクション・コンプレックスを含むチューブに添加する。ピペットで2回アップダウンして混和後、直ぐにトランスフェクション・コンプレックスを60 mmの培養ディッシュ中の細胞へ一滴ずつ添加する。混合液が均一に行き渡るように培養ディッシュを静かに揺り動かす。
9. トランスフェクトされた遺伝子の発現のために適切な時間、および通常の増殖条件下で、トランスフェクション・コンプレックスを含む細胞をインキュベートする。インキュベーション時間は、使用するアッセイおよび遺伝子に応じて決定する。

オプション：ほとんどの場合、トランスフェクション・コンプレックスを除去する必要はありません。しかし、細胞毒性が観察された場合には、トランスフェクション後6～18時間後に遠心操作によりコンプレックスを含む培養液を除去し、PBSで細胞を洗浄後、新鮮な培養液を5 ml添加してください。

10. トランジェント・トランスフェクションには遺伝子発現用の細胞アッセイを行なう。

β -galあるいはcatレポータープラスミドをトランスフェクトした細胞では、通常、トランスフェクション後、24～48時間のインキュベーションで最高の発現レベルに達します。

ステアブル・トランスフェクションでは、軟寒天培養での選別あるいは96ウェルプレート中でのシングルセルクローニングを行なうために、選択培地で細胞を適切な細胞密度に希釈する（例えば、1：10～1：1,000）。コロニーが出現するまで、細胞を選択培地中で培養する。

注：使用する細胞株および抗生物質のそれぞれの組み合わせにおいて、抗生物質濃度と細胞数の相関グラフ（細胞死亡率のグラフ）の作製をお勧めします。抗生物質濃度と細胞の死亡率の関係は、細胞集密度により影響されることを考慮してください。

トランスフェクトした細胞をまず通常の培養液（例えば、選択のための薬物を含まない）にプレーティングし、1～2日培養した後に選択した培養液を添加する必要がある場合もあります。

表4. 様々な培養ディッシュ・フォーマット中の浮遊細胞へ Effectene Reagent を用いてトランスフェクトする際の最適なDNA量および各試薬量

培養ディッシュ フォーマット	DNA (μg)	Enhancer (μl)	DNAと Buffer EC の最終量 (μl)	Effectene Reagent量 (μl)	混合液に 添加する 培養液量 (μl) [†]
プロトコールステップ	4	4	4	6	8
96 ウェルプレート	0.1	0.8	30	2.5*	0
48 ウェルプレート	0.15	1.2	50	4*	200
24 ウェルプレート	0.2	1.6	60	5	350
12 ウェルプレート	0.3	2.4	75	6	400
6 ウェルプレート	0.4	3.2	100	10	600
60 mm ディッシュ	1	8.0	150	25	1000
100 mm ディッシュ	2	16	300	60	3000

* 96あるいは48ウェルプレートでトランスフェクションを行なう場合には、まず、Buffer ECでEffectene Reagentをそれぞれ最終容量が20 μl あるいは50 μl になるように希釈し、Effectene Reagentを希釈したDNA・Enhancer混合液（ステップ4）に添加する。

† 培養液は通常の細胞培養に用いる血清濃度を有すること。

トラブルシューティングガイド

コメント

トランスフェクション効率が低い

- a) Effectene Reagent と DNA の比率が不適
Effectene Reagent と DNA 比率が最適ではない場合、Effectene Reagent と DNA コンプレックスの全体的な電荷がマイナス、0 あるいは強度にプラスになり、細胞表面へ吸着が非効率的になる。最適化に関する Transfection Optimization に従い Effectene Reagent と DNA の比率を変更する（英語版 Handbook 9 ~ 11 ページ参照）。
- b) Effectene ・ DNA コンプレックス量が不充分
期待値よりトランスフェクション効率は低いが、細胞毒性は観察されない場合には、Effectene ・ DNA コンプレックスの全体量を増加する。英語版 Handbook 11 ページのピペッティング一覧表を参照する。
- c) 遺伝子発現のためのインキュベーション時間が不適
トランスフェクション後に遺伝子発現が最高レベルに達する時間は、細胞株により異なる。特殊な細胞株でいつ遺伝子発現が最高レベルに達するか不明の場合には、発現レベルと経過時間の相関関係を調べる実験をする必要がある。
- d) ベクターの影響
プロモーター、複製起源およびプラスミドサイズ等のファクターは遺伝子発現率に影響を及ぼす。トランスフェクションに使用したプラスミド DNA の量もプラスミドの発現に参与する。
- e) Effectene ・ DNA コンプレックスの添加時における細胞集密度が高すぎる
Effectene ・ DNA コンプレックスの添加時に高い集密度に達している細胞は、トランスフェクションに最適な増殖周期ではないので、細胞へのコンプレックス取り込み、あるいは遺伝子の発現が完全に行なわれない可能性がある。付着細胞の場合には、トランスフェクション・コンプレックス添加時の最適な細胞集密度は、通常 40 ~ 80%（英語版 Handbook 9 ページ）。
- f) DNA の品質が低い
トランスフェクションには品質の高いプラスミド DNA を使用する。DNA 精製中に存在する不純物によりトランスフェクション効率は著しく低下する。HiSpeed、QIAfilter、QIAGEN Plasmid Kit、またはそれに相等する精製方法で DNA を調製する。エンドトキシンに対して感受性の高い細胞株、および初代培養細胞に対しては、高トランスフェクション効率を保証する EndoFree Plasmid Kit により精製した DNA の使用を推奨。

コメント

- g) レポーターアッセイに問題
レポーターアッセイが適切に働くことを確実にするために、ポジティブコントロールを常に一緒に行なう。

細胞死亡率が非常に高い

- a) Effectene・DNAコンプレックスと細胞との接触時間が長すぎる
感受性の高い細胞（例えば初代培養細胞）や、あるいはEffectene Reagentでの処理後に極端に高い死亡率を示した細胞株の場合には、トランスフェクションの6～18時間後にEffectene・DNAコンプレックスを除去する。コンプレックスの除去後、注意深く細胞を洗浄。感受性の高い細胞株では、PBSではなく完全培養液で注意深く2～4回の洗浄ステップを行なう。
- b) Effectene・DNAコンプレックス量が多い
細胞とコンプレックスとの接触時間の短縮にも関わらず、高い細胞死亡率が観察された場合は、Effectene ReagentとDNAの比率を変えずにEffectene・DNAコンプレックス量を減らす（英語版Handbook 11ページのピペッティング一覧表を参照）。
- c) 細胞へのストレス
一般的に、培養液なしの状態が長く続く洗浄ステップや、温度差による細胞へのストレスを避ける。細胞が必要な成長因子および必要な栄養源を喪失しないように、トランスフェクション実験は血清の存在下で行なうことを推奨。
- d) ベクターからの影響
毒性タンパク質を組み込んだプラスミドや、発現率の非常に高いプラスミドを多量に使用した場合に細胞への毒性は高まる。また逆に、発現率が非常に低いプラスミドを使用した場合は、トランスフェクション効率も低くなる。新しいプラスミドおよび/あるいは新しい細胞株を使用する場合は、最適化に関するTranscription Optimization（英語版Handbook 10ページ）に従いプラスミドDNA濃度の最適化を行なう。

コメント

繰り返し実験でトランスフェクション効率の再現性がない

- a) 各実験毎に細胞集密度が異なる
播種前に必ず細胞数を数え、各実験で常に同じ細胞数を播種する。細胞を播種する時と Effectene・DNA コンプレックスの添加との間のインキュベーション時間を実験毎に一定に保つ。
- b) マイコプラズマのコンタミの可能性
マイコプラズマのコンタミはトランスフェクション効率に影響を及ぼす。マイコプラズマに感染した細胞の増殖の変化により、実験毎のトランスフェクション効率の変動する。
- c) 細胞の継代回数が多すぎる
継代回数が非常に多い場合に、細胞の形態、特性およびトランスフェクション効率に変化する傾向がある。継代回数の多い細胞を繰り返し同じ実験に使用すると、後で行なった実験では、トランスフェクション効率が低下してくる可能性がある。なるべく継代回数の少ない(50回以下)細胞の使用を推奨。
- d) 血清の品質が異なる
血清の品質の差異によりトランスフェクション効率の変動し得る。一般に、トランスフェクション実験を行なう前に、メーカーからテスト用のロットを取り寄せ、使用する細胞株でテストを行ない、評価することを薦める。そのロットで良好かつ再現性ある結果が得られた場合には、その後も同じロット番号の血清を購入する。

Trademarks: QIAGEN®, Effectene®, EndoFree®, HiSpeed® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は全て研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

