

# PolyFect<sup>®</sup> Transfection Reagent

## プロトコールとトラブルシューティング

COS-7、NIH/3T3、HeLa、293、CHO 細胞に至適化した  
トランスフェクション用

英語版 Handbook  
September 2000 に対応



# 目次

	ページ
COS-7、NIH/3T3、CHO細胞の トランジェントトランスフェクション用プロトコール	3
HeLa細胞のトランジェントトランスフェクション用プロトコール	5
293細胞のトランジェントトランスフェクション用プロトコール	7
トラブルシューティング	9

# COS-7、NIH/3T3、CHO細胞の トランジェントトランスフェクション用プロトコール

以下のプロトコールは60 mm培養ディッシュ中でのCOS-7、NIH/3T3、CHO細胞のトランスフェクションに至適化したプロトコールです。他の大きさの培養ディッシュを用いてトランスフェクションを行う場合のパラメーターは表1(4ページ)に示しました。

**重要：** 最良の結果を確実に得るために、DNA、PolyFect Reagentの量は必ず、以下のプロトコールまたは表に示された適量を用いて下さい。

1. トランスフェクション前日に、 $8 \times 10^5$ 個の細胞(適切な培養液5 mlに懸濁)を60 mmの培養ディッシュにまく。
2. 細胞を37℃、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートする。トランスフェクション当日、培養ディッシュの40～80%程度が細胞で覆われている状態が理想的である。
3. TEバッファー(pH 7～8)に溶解したDNA 2.5 µg (DNA最低濃度は0.1 µg/µl以上)を血清、タンパク質および抗生物質を含まない培養液で希釈し、最終容量を150 µlにする。ミックス後、数秒間スピンドウンして溶液を収集する。

**重要：** このステップにおける血清、タンパク質、抗生物質の存在は、複合体の形成を妨げ、かつトランスフェクション効率を有意に低下させます。

**注：** 用いるプラスミドDNAの品質は、トランスフェクションの効率、再現性、毒性等のいくつかのパラメーターおよび結果の解釈に大きな影響を与えます。そのためプラスミドDNAは、必ず最高品質のものだけを使用してください。QIAGEN® Plasmid Kit、QIAfilter™ Plasmid Kit、HiSpeed™ Plasmid Kitを用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞系のトランスフェクションに最適です。全ての細胞系で、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。EndoFree Plasmid Kitを用いれば、プラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンが効率的に除去されるので、より良好なトランスフェクション結果が得られます。

4. PolyFect Transfection Reagent 15 µlをDNA溶液に添加する。ピペットで5回アップダウンを行い溶液をミックスするか、10秒間ボルテックスする。  
**注：** PolyFect Transfection Reagentは常に氷上に保存する必要はありません。10～15分間室温で放置しても安定性に変化はありません。
5. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成のために室温(20～25℃)で5～10分間インキュベートする。
6. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成中に、培養ディッシュから培養液を静かに吸引除去し、PBS 4 mlで細胞を1回洗浄後、新しい細胞培養液(血清と抗生物質を含有)3 mlを添加する。
7. 細胞培養液(血清と抗生物質を含有)1 mlをトランスフェクション複合体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ミックス後、直ぐにトランスフェクション混合液を全て60 mmの培養ディッシュ中の細胞へ添加する。ディッシュを静かに回して、複合体を均質に行き渡らせる。

この段階での培養液中の血清および抗生物質は、PolyFect Reagentのトランスフェクション効率を高めめます。

8. トランスフェクション複合体と細胞を  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%の $\text{CO}_2$ 存在下でインキュベートし、遺伝子発現を促す。適切な時間のインキュベーションを行った後、細胞を収集し、レポーター遺伝子発現アッセイを行う。

*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レポーター遺伝子の発現レベルは最高に達します。

表1. 異なる培養ディッシュフォーマットでのCOS-7、NIH/3T3、CHO細胞のトランジェントトランスフェクションのパラメーター

培養ディッシュ フォーマット	細胞数	培養 液量 <sup>†</sup> (ml)	DNA ( $\mu\text{g}$ )	希釈した DNAの 最終 容量 ( $\mu\text{l}$ )	PolyFect Reagent の容量 ( $\mu\text{l}$ )	細胞に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)	複合体に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)
プロトコールステップ	1	1	3	3	4	6	7
6ウェルプレート*	$4 \times 10^5$	3.0	1.5	100	10	1.5	0.6
60 mmディッシュ	$8 \times 10^5$	5.0	2.5	150	15	3.0	1.0
100 mmディッシュ <sup>†</sup>	$1.6 \times 10^6$	8.0	4.0	300	25	7.0	1.0

\* 35 mmの培養ディッシュを用いる場合は、6ウェルプレート用に記載の量を用いる。

<sup>†</sup> 85あるいは90 mmディッシュを用いる場合は、100 mmディッシュ用の記載量を用いる。

<sup>‡</sup> 培養液は、血清・抗生物質を含有。

# HeLa細胞のトランジェントトランスフェクション用 プロトコール

以下のプロトコールは60 mm培養ディッシュ中でのHeLa細胞のトランスフェクションに至適化したプロトコールです。他の培養ディッシュを用いてトランスフェクションを行う場合のパラメーターは表2(6ページ)に示しました。HeLa-S3細胞を用いる場合の最適なDNAとPolyFect Reagentの量は、以下のプロトコールに示された量と異なりますので、ご注意ください。HeLa-S3細胞をご利用になる場合は、QIAGENテクニカルサポート部にご連絡くだされば、専用プロトコールをお送りいたします。

**重要：** 最良の結果を確実に得るために、DNA、PolyFect Reagentの量は必ず、以下のプロトコールまたは表に示された適量を用いて下さい。

1. トランスフェクション前日に、 $8 \times 10^5$ 個の細胞(適切な培養液5 mlに懸濁)を60 mmの培養ディッシュにまく。
2. 細胞を37℃、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートする。トランスフェクション当日、培養ディッシュの40～80%程度が細胞で覆われている状態が理想的である。
3. TEバッファー(pH 7～8)に溶解したDNA 3 µg (DNA最低濃度は0.1 µg/µl以上)を血清、タンパク質および抗生物質を含まない培養液で希釈し、最終容量を150 µlにする。ミックス後、数秒間スピンドウンして溶液を収集する。

**重要：** このステップにおける血清、タンパク質、抗生物質の存在は、複合体の形成を妨げ、かつトランスフェクション効率を有意に低下させます。

**注：** 用いるプラスミドDNAの品質は、トランスフェクションの効率、再現性、毒性といったいくつかのパラメーターおよび結果の解釈に大きな影響を与えます。そのためプラスミドDNAは必ず、最高品質のものだけを使用してください。QIAGEN Plasmid Kit、QIAfilter Plasmid Kit、HiSpeed Plasmid Kitを用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞系のトランスフェクションに最適です。全ての細胞系で、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。EndoFree Plasmid Kitを用いれば、プラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンが効率的に除去されるので、より良好なトランスフェクション結果が得られます。

4. PolyFect Transfection Reagent 25 µlをDNA溶液に添加する。ピペットで5回アップダウンを行い溶液をミックスするか、10秒間ボルテックスする。

**注：** PolyFect 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。

5. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成のために室温(20～25℃)で5～10分間インキュベートする。
6. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成中に、培養ディッシュから培養液を静かに吸引除去し、PBS 4 mlで細胞を1回洗浄後、新しい細胞培養液(血清と抗生物質を含有)3 mlを添加する。

7. 細胞培養液（血清と抗生物質を含有）1 mlをトランスフェクション複合体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ミックス後、直ぐにトランスフェクション混合液を全て60 mmの培養ディッシュ中の細胞へ添加する。ディッシュを静かに回して、複合体を均質に行き渡らせる。

この段階での、培養液中の血清および抗生物質はPolyFect Reagentのトランスフェクション効率を高めます。

8. トランスフェクション複合体と細胞を37℃、5%のCO<sub>2</sub>存在下でインキュベートし、遺伝子発現を促す。適切な時間のインキュベーションを行った後、細胞を収集し、レポーター遺伝子発現アッセイを行う。

*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レポーター遺伝子の発現レベルは最高に達します。

表2. 異なる培養ディッシュフォーマットでのHeLa細胞のトランジェントトランスフェクションのパラメーター

培養ディッシュ フォーマット	細胞数	培養 液量 <sup>†</sup> (ml)	DNA (μg)	希釈した DNAの 最終 容量 (μl)	PolyFect Reagent の容量 (μl)	細胞に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)	複合体に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)
プロトコールステップ	1	1	3	3	4	6	7
6ウェルプレート*	4 × 10 <sup>5</sup>	3.0	1.5	100	12	1.5	0.6
60 mmディッシュ	8 × 10 <sup>5</sup>	5.0	3.0	150	25	3.0	1.0
100 mmディッシュ <sup>†</sup>	1.6 × 10 <sup>6</sup>	8.0	6.0	300	50	7.0	1.0

\* 35 mmの培養ディッシュを用いる場合は、6ウェルプレート用に記載の量を用いる。

<sup>†</sup> 85あるいは90 mmディッシュを用いる場合は、100 mmディッシュ用の記載量を用いる。

<sup>‡</sup> 培養液は、血清・抗生物質を含有。

## 293細胞のトランジェントトランスフェクション用 プロトコール

以下のプロトコールは60 mm培養ディッシュ中での293細胞のトランスフェクションに至適化したプロトコールです。他の培養ディッシュを用いてトランスフェクションを行う場合のパラメーターは表3に示しました。

**重要：** 最良の結果を確実に得るために、DNA、PolyFect Reagentの量は必ず、以下のプロトコールまたは表に示された適量を用いて下さい。

1. トランスフェクション前日に、 $1.2 \times 10^6$ 個の細胞(適切な培養液5 mlに懸濁)を60 mmの培養ディッシュにまく。
2. 細胞を37℃、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートする。トランスフェクション当日、培養ディッシュの40～80%程度が細胞で覆われている状態が理想的である。
3. TEバッファー(pH 7～8)に溶解したDNA 4 µg (DNA最低濃度は0.1 µg/µl以上)を血清、タンパク質および抗生物質を含まない培養液で希釈し、最終容量を150 µlにする。ミックス後、数秒間スピンドウンして溶液を収集する。

**重要：** このステップにおける血清、タンパク質、抗生物質の存在は、複合体の形成を妨げ、かつトランスフェクション効率を有意に低下させます。

**注：** 用いるプラスミドDNAの品質は、トランスフェクションの効率、再現性、毒性といったいくつかのパラメーターおよび結果の解釈に大きな影響を与えます。そのためプラスミドDNAは、必ず最高品質のものだけを使用してください。QIAGEN Plasmid Kit、QIAfilter Plasmid Kit、HiSpeed Plasmid Kitを用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞系のトランスフェクションに最適です。全ての細胞系で、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。EndoFree Plasmid Kitを用いれば、プラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンが効率的に除去されるので、より良好なトランスフェクション結果が得られます。

4. PolyFect Transfection Reagent 40 µlをDNA溶液に添加する。ピペットで5回アップダウンを行い溶液をミックスするか、10秒間ボルテックスする。

**注：** PolyFect 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。

5. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成のために室温(20～25℃)で5～10分間インキュベートする。
6. PolyFect ReagentとDNAの複合体形成中に、培養ディッシュから培養液を静かに吸引除去し、新しい細胞培養液(血清と抗生物質を含有)3 mlを添加する。
7. 細胞培養液(血清と抗生物質を含有)1 mlをトランスフェクション複合体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ミックス後、直ぐにトランスフェクション混合液を全て60 mmの培養ディッシュ中の細胞へ添加する。ディッシュを静かに回して、複合体を均質に行き渡らせる。

この段階での培養液中の血清および抗生物質はPolyFect Reagentのトランスフェクション効率を高めめます。

8. トランスフェクション複合体と細胞を37℃、5%のCO<sub>2</sub>存在下でインキュベートし、遺伝子発現を促す。適切な時間のインキュベーションを行った後、細胞を収集しレポーター遺伝子発現アッセイを行う。

*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レポーター遺伝子の発現レベルは最高に達します。

表3. 異なる培養ディッシュフォーマットでの293細胞のトランジェントトランスフェクションのパラメーター

培養ディッシュ フォーマット	細胞数	培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)	DNA (μg)	希釈した DNAの 最終 容量 (μl)	PolyFect Reagent の容量 (μl)	細胞に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)	複合体に 添加する 培養 液量 <sup>‡</sup> (ml)
プロトコールステップ	1	1	3	3	4	6	7
6ウェルプレート*	6 × 10 <sup>5</sup>	3.0	2.0	100	20	1.5	0.6
60 mmディッシュ	1.2 × 10 <sup>6</sup>	5.0	4.0	150	40	3.0	1.0
100 mmディッシュ <sup>†</sup>	2.4 × 10 <sup>6</sup>	8.0	8.0	300	80	7.0	1.0

\* 35 mmの培養ディッシュを用いる場合は、6ウェルプレート用に記載の量を用いる。

<sup>†</sup> 85あるいは90 mmディッシュを用いる場合は、100 mmディッシュ用の記載量を用いる。

<sup>‡</sup> 培養液は、血清・抗生物質を含有。



# トラブルシューティング

状況	考えられる原因	コメントと提案
トランスフェクション効率が低い	PolyFect Reagent あるいはDNA量が 不適	プロトコールに指定されているDNA、PolyFect Reagentの量はそれぞれの細胞系に最適な条件となるよう設定されている。最良の結果を確実に得るために、DNA、PolyFect Reagentの量は、専用のプロトコールに示された適量を用いる。ただし、オリゴヌクレオチド、または大きなベクターコンストラクト(20 kb以上)を用いる場合には、Handbook 8ページの“Transfection of oligonucleotides or large vector constructs”に記載のガイドラインに従う。
	遺伝子発現のための インキュベーション 時間が不適	最高レベルの遺伝子発現を達成するために必要なトランスフェクション後のインキュベーション時間は、細胞系により異なる。複合体とのインキュベーション時間を決める際には、必ずこのことを考慮する。使用の細胞系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行う。
	PolyFect Reagentと DNAの複合体の 添加時における細胞 密度が高すぎる	PolyFect ReagentとDNAの複合体の添加時に密度が高い場合は、細胞がトランスフェクションに最適な細胞成長周期ではない可能性がある。このような場合には、複合体の細胞への取り込み、あるいは遺伝子の発現が完全に行われない。必ず専用のプロトコールに記載されている最適な細胞密度レベルでトランスフェクションを行うようにする。
	レポーターアッセイ が問題	レポーターアッセイの測定法が最適であることを確認するため、ポジティブコントロールを常に一緒に行う。

状況	考えられる原因	コメントと提案
	DNAの品質が悪い	用いるプラスミドDNAの品質は、トランスフェクションの効率、再現性、毒性等のいくつかのパラメーターおよび結果の解釈に大きな影響を与える。このためプラスミドDNAは、必ず最高品質のものだけを使用する必要がある。QIAGEN Plasmid Kit、QIAfilter Plasmid Kit、HiSpeed Plasmid Kitを用いて精製したDNAは、ほとんどの細胞系のトランスフェクションに最適である。全ての細胞系で、最良の結果を得るためには、EndoFree Plasmid Kitで精製したDNAを使用することを推奨する。EndoFree Plasmid Kitを用いれば、プラスミド調製中にバクテリアのエンドトキシンが効率的に除去されるため、より良好なトランスフェクション結果が得られる。
細胞死亡率が非常に高い	PolyFect ReagentとDNAの複合体量が多すぎる	プロトコールに指定されているDNA、PolyFect Reagentの量はそれぞれの細胞系に最適な条件となるよう設定されている。最良の結果を確実に得るために、DNA、PolyFect Reagentの量は、必ず専用のプロトコールに示された適量を用いる。
	細胞へのストレス	一般的に、培養液なしの長い洗浄時間、および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うことを推奨。
	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。トランスフェクションでは、コントロール実験を行うことが非常に有用である。既知のレポーターコンストラクトは、目的の細胞系で用いたプロモーターが働くかを決定するのに非常に役立つ。さらに、インサートのないプラスミドを使えば、目的の遺伝子に毒性があるかどうかを決定できる。

状況	考えられる原因	コメントと提案
各実験で トランスフェク ション効率の 再現性がない	各実験毎に細胞密度 が異なる	確実に、同じ細胞数をまくために各実験前に細胞数を数える。細胞をまいてから PolyFect と DNA の複合体を添加するまでの間のインキュベーション時間を実験毎に一定に保つ。
	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、各実験毎のトランスフェクション効率変動する。
	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。
	血清の品質が異なる	血清の品質のばらつきがトランスフェクション効率にばらつきを起こすことがある。一般に、トランスフェクションを行う前に、コントロール細胞系で信頼できるサプライヤーから得た少量の血清を用いて予備試験を行うことを推奨。再現性のある、満足のいく結果が得られたら、同じサプライヤーの同じロットの血清を購入して用いる。

**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](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

