

Attractene Transfection Reagent プロトコールとトラブルシューティング

感受性の高い細胞種を含む様々な細胞株への
効率的なDNAトランスフェクション

目次	ページ
プロトコール	
細胞への迅速なDNAトランスフェクション (24ウェルプレート)	2
細胞へのDNAトランスフェクション (24ウェルプレート；従来のトランスフェクション・プロトコール)	4
トラブルシューティング	6



プロトコール：細胞への迅速なDNAトランスフェクション（24ウェルプレート）

トランスフェクション24時間前に細胞を播種せずに、細胞（24ウェルプレート）へのトランスフェクションを最適化するためのスタートポイントとして以下のプロトコールをご利用ください。24ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。他のサイズの培養フォーマットを用いた場合のトランスフェクションには、3ページの表3を参照ください。

操作手順

1. TEバッファー（PH 7～8）で溶解した0.4 μg のDNA（DNA濃度は0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上）を培養液（血清、タンパク質、抗生物質を含まない）で希釈し、最終容量を60 μl にする。

例えば、DNA濃度が1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の場合、0.4 μl のDNAを59.6 μl の培養液で希釈します。

2. 1.5 μl の **Attractene Transfection Reagent** を添加する。ピペットでアップダウンするかボルテックスで混和する。必要に応じてチューブの上に付着している液体を回収するため数秒間遠心操作する。
3. 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℃）でサンプルを10～15分間インキュベートする。インキュベーション中にステップ4および5を続けて行なう。

注：トランスフェクション・コンプレックス形成には10～15分かかります。トランスフェクション用の細胞を準備している時間内では、トランスフェクションコンプレックスは安定です。しかし、インキュベーション時間は細胞準備に必要な時間より長くないようにしてください。

4. トリプシン処理により細胞を回収し、血清および抗生物質を含む培養液で懸濁する。

注：健全で対数増殖期の細胞を使用してください。

培養液を交換せずにトランスフェクションを実施するため、この時点では培養液中に血清および抗生物質が存在することが重要です。この期間に血清なしで培養すると重要な成長因子が細胞から欠損してしまいます。この現象はルーチンで血清なしに培養している細胞には当てはまりません。

5. 回収した細胞懸濁液中の細胞数を測定し、500 μl 中の細胞数が0.4～1.6 $\times 10^5$ になるように調節する（細胞株に依存）。最適な細胞密度はそれぞれの細胞株で決定すること。

注：例えば、トランスフェクションで最終細胞密度が0.4～1.6 $\times 10^5/500 \mu\text{l}$ である場合には、ここでの細胞密度を0.8～3.2 $\times 10^5/\text{ml}$ になるように調節します。

細胞の播種およびトランスフェクションを同じ日に行なうため、トランスフェクション前に長時間インキュベートされた細胞に比べてより高い細胞密度が必要です。目安としては、従来のトランスフェクション・プロトコールに使用する細胞数（トランスフェクションの前日に播種した細胞）の2～3倍の細胞が通常必要になります。

6. **24ウェルプレート**の1ウェルに**500 µl**の細胞懸濁液を添加する。次にトランスフェクション・コンプレックスをウェルに添加する。ピペットで**2回アップダウン**し混和する。
7. 通常の培養条件で細胞をトランスフェクション・コンプレックスとインキュベートする（通常**37℃**、**5%CO₂**）。
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、6～18時間後にコンプレックスを除去し、新鮮な培養液を添加します。
8. 適切なインキュベーション時間の後、トランスフェクトした遺伝子の発現を調べるためのアッセイを行なう。インキュベーション時間の長さはアッセイおよびトランスフェクトした遺伝子に依存する。
9. ステابل・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、適切な選択培地に細胞を移す。コロニーが出現するまで、細胞を選択培地中で培養する。

表3. 迅速なトランスフェクション用プロトコールを用いた様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタート量

培養フォーマット	DNA量 (µg)	希釈DNAの 最終容量 (µl)	Attractene Reagent (µl)	細胞懸濁液量 (µl)
プロトコールステップ	1	1	2	6
96ウェルプレート	0.2	50	0.75	100
24ウェルプレート	0.4	60	1.5	500
6ウェルプレート	1.2	100	4.5	2,000
100 mm ディッシュ	4	300	15	10,000

プロトコール：細胞へのDNAトランスフェクション (24ウェルプレート；従来のトランスフェクション・ プロトコール)

細胞（24ウェルプレート）へのトランスフェクションを至適化するためのスタートポイントとして以下のプロトコールをご利用ください。本プロトコールでは、トランスフェクション24時間前に細胞を播種します。24ウェルプレートの1ウェルあたりの量が記載されています。他のサイズの培養フォーマットを用いた場合のトランスフェクションには、5ページの表4を参照ください。このプロトコールは感受性の高い細胞株に使用できます。

操作手順

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 500 μ l 中の $2 \sim 8 \times 10^4$ 個（細胞株に依存）の細胞を播種する。
2. 通常の培養条件で細胞をインキュベートする（通常 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ ）。
細胞はトランスフェクション当日に $40 \sim 80\%$ の集密度になるようにします。
3. トランスフェクション当日に、TEバッファー（PH 7～8）で溶解した $0.4 \mu\text{g}$ の DNA（DNA濃度は $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上）を培養液（血清、タンパク質、抗生物質を含まない）で希釈し、最終容量を $60 \mu\text{l}$ にする。
4. $1.5 \mu\text{l}$ の **Attractene Transfection Reagent** を DNA 溶液に添加する。ピペットでアップダウンするかボルテックスで混和する。必要に応じてチューブの上に付着している液体を回収するため数秒間遠心操作する。
5. 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（ $15 \sim 25^\circ\text{C}$ ）でサンプルを $10 \sim 15$ 分間インキュベートする。
6. コンプレックス形成のインキュベーション中に、細胞から培養液を静かに吸引除去し、 $500 \mu\text{l}$ の新鮮な培養液（血清および抗生物質を含む）を細胞に添加する。
7. トランスフェクション・コンプレックスを1滴ずつ細胞に添加する。プレートを静かに回してトランスフェクション・コンプレックスの分布を均一にする。
8. 通常の培養条件で細胞をインキュベートし、適切なインキュベーション時間の後、細胞を解析する。
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、 $6 \sim 18$ 時間後にコンプレックスを除去し、新鮮な培養液を添加します。
9. ステابل・トランスフェクションでは、トランスフェクション $24 \sim 48$ 時間後に、適切な選択培地に細胞を移す。コロニーが出現するまで、細胞を選択培地中で培養する。

表4. 従来のトランスフェクション用プロトコルを用いた様々なフォーマットでのトランスフェクションのスタート量

培養フォーマット	DNA量 (μg)	希釈DNAの 最終容量 (μl)	Attractene Reagent (μl)	細胞に添加 する培養液量* (μl)
プロトコルステップ	3	3	4	6
96 ウェルプレート	0.2	50	0.75	100
24 ウェルプレート	0.4	60	1.5	500
6 ウェルプレート	1.2	100	4.5	2,000
100 mm ディッシュ	4	300	15	10,000

* 培養液は血清および抗生物質を含む。

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) 試薬とDNAとの割合が不適
- トランスフェクション試薬とプラスミドDNA比率が最適ではない場合、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。英語版 Handbook 9ページのTable 1を用いて Attractene Transfection Reagent とDNAの比率を最適化する。
- b) Attractene Reagent-DNA コンプレックスが不十分
- トランスフェクション効率が期待より低いが細胞毒性が非常に低い場合には、細胞に加える Attractene Reagent-DNA コンプレックスの全体量を増やす。英語版 Handbook 9ページのTable 1のピペッティング表を参照する。
- c) 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。このことをトランスフェクション後のインキュベーション時間を決定する際に考慮しなければならない。特定の細胞株で最高の発現時間がわからない場合には、経時変化実験が必要である。
- d) 細胞密度が不適
- Attractene Reagent-DNA コンプレックス添加時における細胞密度が最適な状態でないと、細胞へのコンプレックスの取り込みが非効率的である。付着細胞へのDNAトランスフェクションの最適な細胞集密度は40～80%である。従来のトランスフェクション・プロトコルを用いる場合には、少なくともトランスフェクシヨ 24時間前に細胞を必ず播種しておく。迅速なトランスフェクション・プロトコルの場合、播種とトランスフェクションの間に細胞が倍加する時間が短くなるので、通常より多数の細胞が必要である。

コメント

- e) 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の最適な量はプラスミドの発現率に依存する。
- f) DNAの品質が低い 不純物によりトランスフェクション効率が低下するためDNAは高品質でなければならない。HiSpeed®、QIAfilter、QIAGEN Plasmid Kitを用いてプラスミドを精製するとよい。エンドトキシンに対する感受性の高い細胞には、EndoFree® Plasmid Kitを用いることを推奨する(英語版 Handbook 20 ページ、ordering information 参照)。

細胞死亡率が非常に高い

- a) Attractene Reagent-DNA コンプレックスと細胞との接触時間が長すぎる Attractene Reagent-DNA コンプレックスの添加後に感受性の高い細胞が多数死亡する場合には、6時間後にコンプレックスを除去し、新鮮な培養液を添加する。
- b) Attractene Reagent-DNA コンプレックスの濃度が高すぎる 細胞に添加する Attractene Reagent-DNA コンプレックス量を減らす。ただし Attractene Reagent と DNA の比率は一定に保つ。
- c) 細胞へのストレスが高い 温度変化や、洗浄中に培養液が無い状態が長くなるような細胞へのストレスを避ける。トランスフェクション時に細胞密度が低すぎないことを確認する。付着細胞へのDNAトランスフェクションの最適な細胞集密度は40～80%である。従来のトランスフェクション・プロトコルを用いる場合には、少なくともトランスフェクション24時間前に細胞を必ず播種しておく。迅速なトランスフェクション・プロトコルの場合、播種とトランスフェクションの間に細胞が倍加する時間が短くなるので、通常より多数の細胞が必要である。細胞が長時間のインキュベーション中に、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。

コメント

- d) DNAの品質が低い 不純物によりトランスフェクション効率が低下するためDNAは高品質でなければならない。HiSpeed、QIAfilter、QIAGEN Plasmid Kitを用いてプラスミドを精製するとよい。エンドトキシンに対する感受性の高い細胞には、EndoFree Plasmid Kitを用いることを推奨する（英語版 Handbook 20ページの ordering information 参照）。

同じ実験を繰り返した時に実験間でトランスフェクション効率が変動する

- a) 同一実験ごとに細胞集密度が異なる 細胞の播種前に細胞数を数えて、それぞれの実験で同じ数の細胞を必ず使用する。実験ごとに細胞播種時からコンプレックスを添加するまでのインキュベーション時間を一定に保つ。従来のトランスフェクション・プロトコルを用いる場合には、少なくともトランスフェクションの24時間前に細胞を播種するべきである。
- 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状況の変化により、実験ごとのトランスフェクション効率が変動する。
- c) 細胞の継代数が多すぎる 細胞の継代数が増えると、増殖率、形態、特性およびトランスフェクション効率が変動する傾向がある。継代数が多い細胞を繰り返し同じ実験に用いる場合、後で行なった実験でトランスフェクション効率が低下する可能性がある。継代数の低い細胞（50回以下）を使用することを推奨。
- d) 異なる血清を使用 血清の品質の差異によりトランスフェクション効率が変動し得る。コントロール実験にメーカーからテスト用のロットを取り寄せテストすることを推奨する。満足ができ、再現性がある結果があるロットで得られたら、続く実験も同じロットの血清を使用する。

コメント

安定して発現しているDNAを持つ細胞コロニーを分離できない

- a) 選択培地の選択剤濃度が不適 選択剤の最適濃度は細胞密度および細胞種に依存する。各細胞種により濃度を評価しなくてはならない。
- b) トランスフェクションとコロニー選択の間のインキュベーション時間が不適である 選択に使用した耐性遺伝子の最適な発現に十分な時間があるように、トランスフェクションと選択培地で選択を開始するまでには十分なインキュベーション時間を取る。
- c) 単一細胞由来のコロニーでない 目的のDNAが安定して発現している単一細胞からなるコロニーであること、目的のDNAを発現していない耐性コロニーと目的のDNAが安定して発現しているコロニーが混合していないことを確認する。後者の場合には安定した発現をしている細胞が消失することがある。

Trademarks: QIAGEN®, HiSpeed®, EndoFree® (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。

© 2008 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

