

取扱説明書

0.5 ml	170-3350
1.0 ml	170-3351
5 x 1.0 ml	170-3352

本製品は研究用途専用の試薬です。

4°Cで保存してください。

保存条件および使用期限

TransFectin Lipid Reagent は冷蔵状態で出荷されます。お手元に届きましたら、4°Cで保存してください。0°C以下で保存した場合、製品の品質が低下する場合があります。TransFectin は4°Cで保存された場合、購入後6ヶ月間は安定です。

内容量

TransFectin には 0.5 ml (カタログ番号 170-3350 の場合)、1.0 ml (カタログ番号 170-3351 の場合) もしくは 5 x 1.0 ml (カタログ番号 170-3352) の3種類のパッケージサイズがあります。1.0 ml の試薬は、35 mm プレートを用いた場合、一般に 125~200 回のトランスフェクションに使用することができます。TransFectin は、脂質濃度 1.5 mg/ml で供給されています。

試薬について

TransFectin は独自のカチオン性脂質と 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine の混合物です。これらは、血清存在下において細胞密度 50~90%以上の培養ほ乳動物細胞へ核酸を導入するために調製されています。この取扱説明書に記載されている、種々のプレートやウェルのサイズに適切な量の TransFectin および DNA を用いることで、多くの細胞において高いレベルの発現が得られます。現在、他のカチオン性脂質を用いたトランスフェクションを行っている場合は、現在の条件を中心に 25~50%の範囲で TransFectin の量を検討します。より良い結果を得るためには、それぞれの細胞に対して至適な DNA 量および脂質量を決定することが重要です。

推奨事項

- 多くの細胞系統では、DNA (μg) : 脂質 (μl) の比率は 1 : 2~1 : 3 が至適です。この範囲から条件検討を開始します。
- TransFectin は使用前に転倒混和してください。
- TransFectin は血清の存在下で作用するようにデザインされていますが、無血清条件下でも使用できます。

- ・ プラスミド溶液や脂質溶液の調製には、滅菌済みのポリスチレン容器（12 x 75 mm チューブやマイクロプレートなど）を使用してください。ポリプロピレン製の容器はカチオン性脂質-プラスミド複合体を吸着するおそれがあります。

条件の至適化

導入効率の至適化は、遺伝子発現の最大化と細胞毒性の最小化のために必要です。様々な培養器と細胞密度に対して条件を至適化する際に非常に重要な 2 つのパラメーターは、TransFectin の濃度と核酸の量です。表 1 には、それぞれの培養器のサイズに応じた試薬量と DNA 量の目安が記載されています。一般に、TransFectin の量を増やしていくと、遺伝子発現量は増加し、次いでプラトーに達し、その後減少します。発現量の減少は細胞の生存率低下とも関係があります。細胞へ添加されるプラスミドの量が増加すると、発現量は増加し、次いでプラトーに達し、その後過剰量の DNA が毒性を与えることにより減少します。毒性が生じた場合、脂質や DNA の量を減らします。最良の発現に必要な TransFectin の濃度とプラスミドの量は細胞ごとに異なります。表 2 には、代表的な細胞を用いる場合の、より詳細な条件が記載されています。

表 1. 培養器の大きさに応じた試薬量の目安

培養器	表面積(cm ²)	培養器中の培地量	DNA量	無血清培地量	TransFectin使用量
96 well	0.32	0.1 ml	50–200 ng	25 μl	0.1–0.6 μl
24 well	1.9	0.5 ml	0.25–1.0 μg	50 μl	0.25–4.0 μl
12 well	3.8	1.0 ml	0.5–2.0 μg	100 μl	2.0–8.0 μl
6 well/35 mm	9.2	2.0 ml	1.0–4.0 μg	250 μl	5.0–15 μl
60 mm	21	5.0 ml	2.0–8.0 μg	500 μl	15–20 μl
100 mm	60	10.0 ml	12–36 μg	1.5 ml	40–60 μl

表 2. 代表的な細胞を用いる場合の試薬量および DNA 量の目安（24 ウェルプレート）

細胞名	confluence	DNA量	TransFectin使用量	備考
293	70–90%	0.5–1.0 μg	0.5–1.0 μl	4時間後に複合体を除くことで発現量が向上します
COS7	70–90%	0.5–1.0 μg	0.5–1.0 μl	操作後に試薬を除去する必要はありません。
HeLa	70–90%	0.5–1.0 μg	0.5–1.0 μl	''
NIH-3T3	50–70%	0.5–1.0 μg	1.0–2.0 μl	''
CHO	70–90%	0.5–1.0 μg	0.5–1.0 μl	''
A549	50–70%	0.5–1.0 μg	0.5–1.0 μl	''

※細胞別のプロトコールに関する詳細は、弊社ウェブサイト（www.bio-rad.com/genetransfer/）をご参照ください。

接着細胞用プロトコール（24 ウェルプレートを用いる場合）

1. トランスフェクションの前日に、血清含有培地を含む 24 ウェルプレートで適当な量の細胞をインキュベートし、翌日に 50～90%コンフルエントになるようにします。多くの細胞では、0.5 ml の培地に 0.5～8.0 x 10⁵ の細胞が適切です（表 3 参照）。5% CO₂、37°C で一晩インキュベートします。

表 3. 代表的な細胞を用いる場合の細胞数および培地量の目安 (24 ウェルプレート)

細胞名	細胞数	培地量
293	$1.2-1.5 \times 10^5$	0.5 ml
COS7	$0.4-0.8 \times 10^5$	0.5 ml
HeLa	$0.25-0.5 \times 10^5$	0.5 ml
NIH-3T3	$0.25-0.5 \times 10^5$	0.5 ml
CHO	$0.75-1.0 \times 10^5$	0.5 ml
A549	$0.25-0.5 \times 10^5$	0.5 ml

2. 1 ウェル当たり $50 \mu\text{l}$ の無血清培地を用意します。培地 $50 \mu\text{l}$ に対して $0.25\sim 1.0 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA を添加します。
3. 1 ウェル当たり $50 \mu\text{l}$ の無血清培地を用意します。培地 $50 \mu\text{l}$ に対して $0.25\sim 0.4 \mu\text{l}$ の TransFectin を添加します。
4. DNA 溶液と TransFectin 溶液を混合します。タッピングやピペッティングで緩やかに混和し、室温で 20 分間インキュベートします。
5. $100 \mu\text{l}$ の DNA-TransFectin 複合体を血清含有培地中の細胞に添加し、緩やかに振盪します。5% CO_2 、 37°C でインキュベートし、4~6 時間後、必要に応じて培地を追加します。
6. トランジェントな発現を評価する場合は、トランスフェクションを行ってから 24~48 時間後にレポーター遺伝子の活性を調査します。
7. スターブルな発現が必要な場合は、トランスフェクションから 24 時間後に培地を除き、トリプシン処理を行います。細胞を新しい培養器に移し、選択物質を含まない培地で培養します。翌日、培地を選択物質を含むものに交換します。1~2 週間インキュベートし、導入遺伝子を発現している細胞の成育を促します。

浮遊細胞用プロトコール (24 ウェルプレートを用いる場合)

1. トランスフェクションの前日に、翌日に対数増殖期となるように細胞を懸濁します。ほとんどの細胞系では、 0.5 ml の培地に $0.75\sim 8.0 \times 10^5$ の細胞が適切です。5% CO_2 、 37°C で一晩インキュベートします。
2. 1 ウェル当たり $50 \mu\text{l}$ の無血清培地を用意します。培地 $50 \mu\text{l}$ に対して $0.25\sim 1.0 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA を添加します。
3. 1 ウェル当たり $50 \mu\text{l}$ の無血清培地を用意します。培地 $50 \mu\text{l}$ に対して $0.25\sim 0.4 \mu\text{l}$ の TransFectin を添加します。
4. DNA 溶液と TransFectin 溶液を混合します。タッピングやピペッティングで緩やかに混和し、室温で 20 分間インキュベートします。
5. $100 \mu\text{l}$ の DNA-TransFectin 複合体を細胞に加えます。緩やかに振盪し、十分に混和します。
6. 5% CO_2 、 37°C でインキュベートし、4~6 時間後、必要に応じて培地を追加します。
7. トランジェントな発現を評価する場合は、トランスフェクションを行ってから 24~48 時間後にレポーター遺伝子の活性を調査します。