

SuperFect[®] Transfection Reagent

プロトコールとトラブルシューティング

最高のトランスフェクション効率

目次	ページ
付着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	2
付着細胞のステーブル トランスフェクション用プロトコール	4
浮遊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	6
浮遊細胞のステーブル トランスフェクション用プロトコール	8
トラブルシューティング	9

March 2001



付着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

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。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う際の、各ステップでの最適なDNA量および試薬の量を3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細胞数は、HandbookのTable 1(8ページ)を参照して下さい。SuperFect® Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率が必要な場合には、それぞれの細胞系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、Handbookの8～10ページのガイドラインを参照して下さい。

1. トランスフェクション前日に、最適な培養液5 ml中の $2 \sim 8 \times 10^5$ 個の細胞(細胞系に依存)を60 mmの培養ディッシュにまく。トランスフェクションを行う日に、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。
2. 細胞を通常の培養条件でインキュベートする(一般的には37℃、5%のCO₂)。
3. TE (pH 7～pH 8) に溶解したDNA 5 µg (DNA濃度は0.1 µg/µl以上であることが望ましい)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(初代培養細胞にはプラスミドDNA 2.5 µgを使用)。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および抗生物質の存在は、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: 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. SuperFect Transfection Reagent 30 µlをDNA溶液に添加する(初代培養細胞にはSuperFect Transfection Reagent 15 µlを添加)。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: SuperFect 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. トランスフェクション複合体形成のために室温(15～25℃)で5～10分間インキュベートする。
6. 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回洗浄する。

7. 細胞培養液（血清および抗生物質を含有）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。
この段階での培養液中の血清および抗生物質は、SuperFect 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通常の培養条件で2～3時間インキュベートする。
9. トランスフェクション複合体を含む培養液を静かに吸引除去した後、PBS 4 mlで細胞を1回洗浄する。
10. 細胞に新鮮な培養液（血清および抗生物質を含有）を添加し、適切な時間インキュベートし、トランスフェクトした遺伝子発現のアッセイを行う。
*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最高の発現レベルに達します。

表3. 様々な培養ディッシュフォーマット中の付着細胞への最適なトランジェントトランスフェクションのためのDNA量および各試薬量

培養ディッシュ フォーマット	DNA (μg)	血清フリー培養 液で希釈した 最終DNA溶液量 (μl)	SuperFect Reagent 量 (μl)	血清含有の 培養液量 (μl) *
プロトコールステップ	3	3	4	7
96ウェルプレート	0.50	30	2.5 [†]	150
48ウェルプレート	0.75	50	4.5 [†]	250
24ウェルプレート	1.0	60	5.0	350
12ウェルプレート	1.5	75	7.5	400
6ウェルプレート	2.0	100	10.0	600
60mm ディッシュ	5.0	150	30.0	1000
100mm ディッシュ	10.0	300	60.0	3000

* 培養液は通常の細胞培養に用いる濃度の血清を有すること。

[†] 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う場合には、まず血清を含まない培養液で SuperFect 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、これをステップ3で希釈したDNA溶液に添加する。

付着細胞のステーブルトランスフェクション用プロトコール

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。その他の培養ディッシュフォーマットを用いて細胞をまく際の各培養ディッシュでの最適な細胞数は、HandbookのTable 1（8ページ）を参照して下さい。SuperFect Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率が必要な場合には、それぞれの細胞系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、Handbookの8～10ページのガイドラインを参照して下さい。

1. トランスフェクション前日に、最適な培養液5 ml中の $2 \sim 8 \times 10^5$ 個の細胞（細胞系に依存）を60 mmの培養ディッシュにまく。トランスフェクションを行う日に、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。
2. 細胞を通常の培養条件でインキュベートする（一般的には37℃、5%のCO₂）。
3. TE（pH 7～pH 8）に溶解したDNA 5 µg（DNA濃度は0.1 µg/µl以上であることが望ましい）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（初代培養細胞にはプラスミドDNA 2.5 µgを使用）。ミックスした後、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、血清および抗生物質の存在は、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：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. SuperFect Transfection Reagent 20 µlをDNA溶液に添加する（初代培養細胞にはSuperFect Reagent 15 µlを添加）。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秒間ボルテックスした後、スピンドウンし溶液を収集する。

注：SuperFect 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. トランスフェクション複合体形成のために室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。
6. 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回洗浄する。

7. 細胞培養液（血清および抗生物質を含有）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。

この段階での血清および抗生物質の存在は、SuperFect 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細胞を通常の培養条件で2～3時間インキュベートする。
9. トランスフェクション複合体を含む培養液を静かに吸引除去し、PBS 4 mlで細胞を3～4回洗浄する。
10. 新鮮な培養液（血清および抗生物質を含有）を添加し、24～48時間インキュベートする。
11. 適切な抗生物質を含む選択培養液で1:10から1:15に希釈し、クローンが得られるまで選択培養液で培養する。

注：使用する細胞系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関連グラフ（細胞死亡率のグラフ）の作製をお薦めします。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下さい。

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培養液を添加する必要がある場合もあります。

浮遊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

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ジェントトランスフェクション用です。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う際の、各ステップでの最適なDNA量および試薬量を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細胞数と培養液量は、Handbook 8ページのTable 1を参照して下さい。SuperFect Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率が必要な場合には、それぞれの細胞系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、Handbookの8～10ページのガイドラインを参照して下さい。

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収集、培養液を取り除いた後、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. 4 mlの血清および抗生物質を含む培養液で $2.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 個（細胞系に依存）の細胞を懸濁して60 mm培養ディッシュにまく。
4. TE (pH 7 ~ pH 8) に溶解したDNA の5 μg (DNA濃度は0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上であることが望ましい) 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 にし、ミックスした後、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、血清および抗生物質の存在は、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：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. SuperFect Transfection Reagent 20 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秒間ボルテックスした後、スピンドウンし溶液を収集する。

注：SuperFect 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。

6. トランスフェクション複合体形成のために室温（15～25℃）で5～10分間インキュベートする。
7. 細胞培養液（血清および抗生物質を含有）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回アップダウンを行いミックス後、直ぐにトランスフェクション複合体を60 mmの培養ディッシュ中の細胞へ一滴ずつ添加する。複合体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。

この段階での血清および抗生物質の存在は、SuperFect Reagentのトランスフェクション効率を高め、さらに血清は細胞の生存率を高めます。

8. トランスフェクション複合体を含む細胞を通常の培養条件（37℃、5%のCO₂）でトランスフェクトした遺伝子発現に最適な時間インキュベートする。

通常、トランスフェクション混合液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、2～3時間のインキュベーション後にトランスフェクション複合体を遠心操作により除去します。細胞ペレットから培養液を除去します。新鮮な培養液（血清および抗生物質を含有）で細胞を懸濁後、遺伝子発現に最適な時間インキュベートします。

9. 細胞を遠心分離により収集し、遺伝子発現の解析を行う。
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ションした細胞では、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。

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の最適なトランジェントトランスフェクションのためのDNA量および各試薬量

培養ディッシュ フォーマット	DNA (μg)	血清フリー培養 液で希釈した 最終DNA溶液量 (μl)	SuperFect Reagent 量 (μl)	血清含有の 培養液量 (μl) *
プロトコールステップ	4	4	5	7
96ウェルプレート	0.50	30	2.0 [†]	0
48ウェルプレート	0.75	50	3.0 [†]	0
24ウェルプレート	1.0	60	4.0	100
12ウェルプレート	1.5	75	6.0	200
6ウェルプレート	2.0	100	8.0	400
60mm ディッシュ	5.0	150	20.0	1000
100mm ディッシュ	10.0	300	40.0	3000

* 培養液は通常の細胞培養に用いる濃度の血清を有すること。

[†] 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う場合には、まず血清を含まない培養液でSuperFect 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、これをステップ3で希釈したDNA溶液に添加する。

浮遊細胞のステーブルトランスフェクション用プロトコール

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ステーブルトランスフェクション用です。各培養ディッシュでの最適な細胞数と培養液の量は、Handbook 8 ページの Table 1 を参照して下さい。SuperFect Reagentを用いた最高のトランスフェクション効率が必要な場合には、それぞれの細胞系で個別にトランスフェクション条件の至適化を行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、Handbook の 8 ~ 10 ページのガイドラインを参照して下さい。

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収集し培養液を取り除いた後、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. 4 ml の血清および抗生物質を含む培養液で $2.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 個（細胞系に依存）の細胞を懸濁して 60 mm 培養ディッシュにまく。
4. TE (pH 7 ~ pH 8) に溶解した DNA 5 μg (DNA 濃度は 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上であることが望ましい) 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 にしてミックスした後、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、血清および抗生物質の存在は、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：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. SuperFect Reagent 20 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 秒間ボルテックスした後、スピンドウンし溶液を収集する。

注：SuperFect 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。

6. トランスフェクション複合体形成のために室温 (15 ~ 25) で 5 ~ 10 分間インキュベートする。
7. 細胞培養液 (血清および抗生物質を含有) 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 回アップダウンを行いミックス後、直ぐにトランスフェクション複合体を 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。

この段階での血清および抗生物質の存在は、SuperFect Reagentのトランスフェクション効率を高め、さらに血清は細胞の生存率を高めます。

8. トランスフェクション複合体を含む細胞を通常の培養条件（37℃、5%のCO₂）で24～48時間インキュベートする。

通常、トランスフェクション複合体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、2～3時間のインキュベーション後にトランスフェクション複合体を遠心操作により除去します。細胞ペレットから培養液を除去し、新鮮な培養液（血清および抗生物質を含有）で細胞を懸濁後、薬物耐性遺伝子が発現するまで24～48時間インキュベートします。

9. PBS 4 mlで細胞を3～4回洗浄後、軟寒天培養、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うかにより、適切な抗生物質を含む選択培養液で1:10から1:1000に希釈、培養する。

注：使用する細胞系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関連グラフ（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下さい。

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培養液を添加する必要がある場合もあります。

トラブルシューティング

コメントおよび対処方法

トランスフェクション効率が低い

SuperFect ReagentとDNA比率が不適

SuperFect ReagentとDNA比率が最適ではない場合には、SuperFect-DNA複合体の全体的な電荷が負、中性あるいは強度に正となり、細胞表面への吸着が非効率的になる。最適化に関する説明“Transfection Optimization”（Handbook 9ページ）に従いSuperFect ReagentとDNA比率を変更する。

SuperFect-DNA複合体量が不十分

期待したもの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SuperFect-DNA複合体の全体量を増加する。Handbook 9ページのTable 2、ピペッティング一覧表を参照する。

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達成の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定する際にこのことを考慮する。特殊な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。

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率に影響する。
SuperFect-DNA 複合体の添加時における細胞集密度が高すぎる	複合体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成長周期ではないので、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複合体添加時の最適な細胞集密度は、通常 40 ~ 80% (Handbook 8 ページ)。
DNA の品質が悪い	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 Plasmid Kit、QIAGEN Plasmid Kit あるいはまたはそれらに相等する精製方法で DNA を調製する。エンドトキシンへの感受性の高い細胞系、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。
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確実に最適となるよう、ポジティブコントロールを常に一緒に行う。
非常に高い細胞死亡率	
SuperFect-DNA 複合体と細胞との接触時間が長すぎる	ほとんどの付着細胞では、SuperFect-DNA 複合体と 2 ~ 3 時間インキュベートすることにより、最適な結果が得られる。しかし、感受性の高い付着細胞（例えば初代培養細胞）や SuperFect Reagent での処理後に極端に高い死亡率を示した細胞系の場合には、SuperFect-DNA 複合体とのインキュベーション時間を 1 時間まで短縮する。感受性の高い浮遊細胞や細胞系では、2 ~ 3 時間のインキュベーション後に複合体を遠心分離により除去し、注意深く細胞を洗浄。感受性の高い細胞系では、PBS よりも培養液で、注意深い 2 ~ 4 回の洗浄ステップを推奨。
SuperFect-DNA 複合体量が多すぎる	細胞と複合体との接触時間の短縮に関わらず、高い細胞死亡率が観察された場合は、SuperFect Reagent と DNA の比率を変えずに SuperFect-DNA 複合体量を減らす (Handbook 9 ページのピペッティング一覧表を参照)。

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する。
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系を使用する場合は、最適化に関する Transfection Optimization (Handbook 9ページ) に従いプラスミドDNA濃度の最適化を行う。
各実験でトランスフェクション効率の再現性がない	
各実験毎に細胞集密度が異なる	各実験前に、同じ細胞数をまくために細胞数を数える。細胞をまいてから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	血清の品質の差異によりトランスフェクション効率変動し得る。一般に、トランスフェクション実験を行う前に、サプライヤーからテスト用のロットを取り寄せ、使用する細胞系でテストを行い、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。

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

www.qiagen.co.jp

