

はじめに

本プロトコルは、HilyMaxを用いてNeuro2a細胞へ遺伝子導入を行うための最適条件を示しております。『最適遺伝子導入条件』および『遺伝子導入操作』に従い遺伝子導入を行って下さい。なお、本プロトコルは、24ウェルプレートを用いた条件を示しています。他のプレートをご使用の際は、表2『培養プレート毎での培養および遺伝子導入条件』を参照のうえ、『遺伝子導入操作』中の下線部分の条件を変更し、遺伝子導入を行って下さい。

※重要※

細胞の培養条件、継代日数等により、遺伝子導入時の最適条件が変わる可能性があります。本条件において高い導入効率がみられない場合は、下記の『HilyMaxによる遺伝子導入例』及び『導入がうまくいかない場合の対策および確認』を参考に検討下さい。

最適遺伝子導入条件 : 24ウェルプレート使用時

表1 Neuro2a細胞における最適遺伝子導入条件

細胞密度	70%
	無血清培地 30 μ l
DNA-HilyMax複合体調製条件	DNA 1.0 μ g
	HilyMax 2.0-4.0 μ l
	複合体調製時間 15 min
遺伝子導入後の培地交換	効果あり (4 hr後)

遺伝子導入操作 : 24ウェルプレート使用時

《細胞の準備》

Neuro2a細胞用の増殖培地にて懸濁
遺伝子導入時に細胞密度70%になるよう希釈した細胞懸濁液0.5 mlを24ウェルプレートへ添加
CO₂インキュベーターにて24 hr培養

《遺伝子導入操作》

DNA-HilyMax複合体の調製
-無血清培地(抗生物質も含まない) 30 μ l/wellを別途容器(エッペンドルフチューブなど)へ添加
-DNA 1.0 μ g/wellを添加、混合
-HilyMax 2.0-4.0 μ l/wellを添加、混合
-15分間、室温にてインキュベーション
Neuro2a細胞へDNA-HilyMax複合体を添加
CO₂インキュベーターにて18-48 hr培養
※複合体添加4 hr後に、新しい増殖培地へ交換

《導入評価》

レポーター遺伝子または目的遺伝子の発現活性を測定する。

スケールアップ&ダウン

表2 培養プレート毎での培養および遺伝子導入条件

培養容器	細胞培養条件		DNA-HilyMax複合体調製条件		
	容器表面積	増殖培地量	培地量(無血清)	DNA量	HilyMax量
96 -well	0.3 cm ²	0.1 ml	10 μ l	0.2 μ g	0.4-0.8 μ l
24 -well	1.9 cm ²	0.5 ml	30 μ l	1.0 μ g	2.0-4.0 μ l
12 -well	3.8 cm ²	1.0 ml	60 μ l	2.0 μ g	4.0-8.0 μ l
6 -well	9.2 cm ²	2.0 ml	120 μ l	4.0 μ g	8.0-16.0 μ l
35 -mm	8.0 cm ²	2.0 ml	120 μ l	4.0 μ g	8.0-16.0 μ l
60 -mm	21.0 cm ²	5.0 ml	300 μ l	10.0 μ g	20.0-40.0 μ l
100 -mm	58.0 cm ²	15.0 ml	900 μ l	30.0 μ g	60.0-120.0 μ l

HilyMaxによる遺伝子導入例

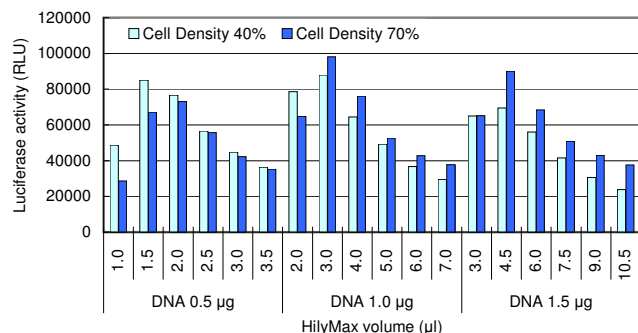


図1 Neuro2a細胞における遺伝子導入効率

遺伝子導入前日に、24ウェルプレートへ播種、培養したNeuro2a細胞へ、pGL3 control vector (Promega) をHilyMaxを用いて各条件下にて遺伝子導入した。遺伝子導入24時間後のLuciferase活性を、HilyMaxによる導入率として確認した。Neuro2a細胞は、10%FBS(Gibco)及びNon-Essential Amino Acids(Gibco)を含むMEM培地(Gibco)にて、凍結細胞を解冻後約2週間継代培養したものをを用いた。細胞密度40%: 0.75×10^5 cells/well 細胞密度70%: 1.2×10^5 cells/well

導入がうまくいかない場合の対策および確認

-導入効率が顕著に低い場合-

対策1. DNA(μ g):HilyMax(μ l)=1.5-1:7.7の条件にて検討下さい。
対策2. 本プロトコル記載したDNA量の1.5-2.0倍量を使用し、DNA(μ g):HilyMax(μ l)=1:2-1:4で検討下さい。

-毒性が強い場合-

対策1. 本プロトコル記載したDNA量の半分量を使用し、DNA(μ g):HilyMax(μ l)=1:3-1:7で検討下さい。

-遺伝子導入時の確認-

確認1. HilyMax Reagent チューブ下部に半透明の溶け残りはありますか？
確認2. 遺伝子導入から導入評価までの細胞培養時間は、適切ですか？
確認3. 複合体調製時の培地に、血清及び抗生物質は入っていませんか？