HilyMax
Transfection Reagent

Vero細胞用
最適遺伝子導入条件

はじめに
本プロトコルは、HilyMaxを用いてVero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ございます。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 Vero細胞における最適遺伝子導入条件

細胞密度		60%
DNA-HilyMax複合体調製条件	無血清培地	30 μl
	DNA	1.0 μg
	HilyMax	5.0-7.0 μl
	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》
↓ Vero細胞用の増殖培地にて懸濁
遺伝子導入時に細胞密度60%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
CO_2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 μl/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 μg/wellを添加、混合
-HilyMax 5.0-7.0 μl/wellを添加、混合
-15分間、室温にてインキュベーション
Vero細胞へDNA-HilyMax複合体を添加
CO_2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

細胞培養条件			DNA-HilyMax複合体調製条件		
培養容器	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 μl	0.2 μg	1.0-1.4 μl
24 -well	1.9 cm^2	0.5 ml	30 μl	1.0 μg	5.0-7.0 μl
12 -well	3.8 cm^2	1.0 ml	60 μl	2.0 μg	10.0-14.0 μl
6 -well	9.2 cm^2	2.0 ml	120 μl	4.0 μg	20.0-28.0 μl
35 -mm	8.0 cm^2	2.0 ml	120 μl	4.0 μg	20.0-28.0 μl
60 -mm	21.0 cm^2	5.0 ml	300 μl	10.0 μg	50.0-70.0 μl
100 -mm	58.0 cm^2	15.0 ml	900 μl	30.0 μg	150.0-210.0 μl

HilyMaxによる遺伝子導入例

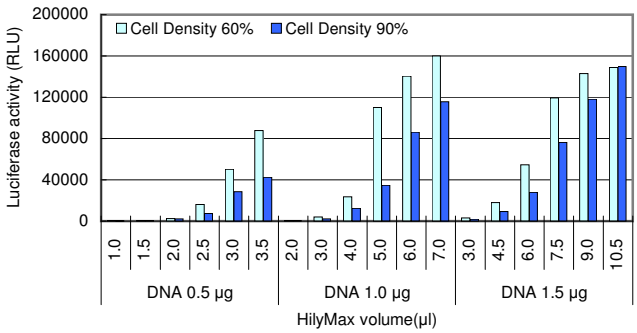

図1 Vero細胞における遺伝子導入効率

遺伝子導入前日に、24ウェルプレートへ播種、培養したVero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。
Vero細胞は、10%FBS(Gibco)を含むMEM培地(Gibco)にて、凍結細胞を解凍後約2週間継代培養したものを用いた。
細胞密度60%:0.4×10^5 cells/well　細胞密度90%:0.7×10^5 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(μg):HilyMax(μl)=1:8-1:10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(μg):HilyMax(μl)=1:5-1:7で検討下さい。

-毒性が強い場合-
対策1. DNA(μg):HilyMax(μl)=1:2-1:4の条件にて検討下さい。
対策2. 本プロトコル記載したDNA量の半分量を使用し、DNA(μg):HilyMax(μl)=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せんか？
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？