

## はじめに

HilyMax (ハイリーマックス) は、新規に開発した陽イオン性合成脂質からなる遺伝子導入試薬です (特許第 4911416 号)。増殖培地中の血清の影響を殆ど受けないため、遺伝子導入時の面倒な培地交換をする必要がなく、多岐にわたる細胞種へ高効率に遺伝子導入することができます。

## キット内容

- HilyMax Reagent 1 tube
- Lipoform Buffer 1.0 ml x 1

## 保存条件

購入後は、0 ~ 5°C で保存してください。  
Lipoform Buffer にてリポソーム溶液を調製後は、-20°C で保存してください。調製後 6 ヶ月間安定です。  
リポソーム溶液を頻繁に使用する際は、0 ~ 5°C 保存も可能です。0 ~ 5°C で、1 ヶ月間安定です。

- ⚠ 凍結した HilyMax を融解後は、必ずボルテックス又はピペッティングにより、良く混合してご使用下さい。  
HilyMax は、20 回の凍結融解を繰り返しても、導入能に変化がないことを確認しております。また凍結融解の繰り返しを避けたい場合は、滅菌済みチューブへ HilyMax を小分けして、ご使用下さい。

## リポソーム調製方法

Lipoform Buffer 1.0 ml を HilyMax Reagent の tube に添加し、ボルテックスにより 30 秒間攪拌し、HilyMax 溶液を調製する。

- ⚠ 攪拌後は、チューブ底部のフィルム状の固体が消失したことを確認して下さい。  
不溶物が残存している場合は、再度完全に溶解するまでボルテックスにより攪拌を行って下さい。

## HilyMax 情報

弊社ホームページにて、HilyMax に関する情報を提供しております。是非ご覧下さい。

URL : [www.dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)

### ≪掲載内容≫

- ・細胞毎の最適遺伝子導入条件 (18 種)
- ・ HilyMax の使用例
- ・ HilyMax により導入実績がある細胞種
- ・ HilyMax 使用論文

## 操作方法

### 遺伝子導入操作手順 24 ウェルプレート使用時<sup>a)</sup>

#### 1. 細胞の準備

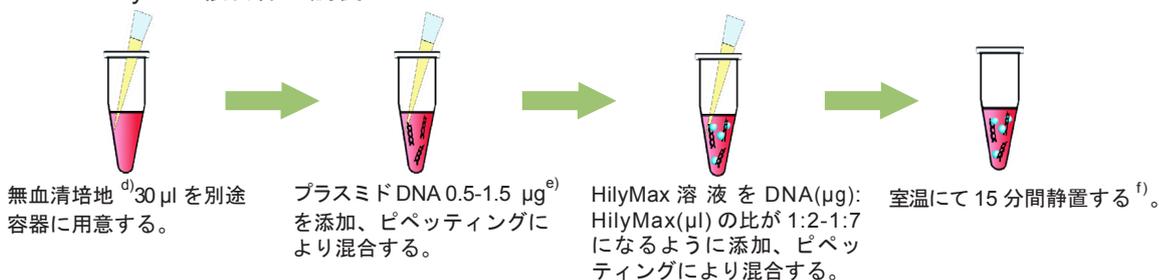
##### 接着細胞

遺伝子導入時に細胞密度が 50-90% になるよう増殖培地<sup>b)</sup>で調整した細胞懸濁液 0.5 ml をプレートへ播種し、一晚培養する。

##### 浮遊細胞

1.0-10.0 × 10<sup>5</sup> cells/ml となるよう増殖培地<sup>b)</sup>で調整した細胞懸濁液 0.5 ml をプレートへ播種し、一晚培養する。

#### 2. DNA-HilyMax 複合体の調製<sup>c)</sup>



#### 3. 細胞への添加

インキュベーション後の DNA-HilyMax 複合体を 1. で準備した培養細胞へ添加し、プレートを穏やかに振とうする。

#### 4. 細胞の培養

CO<sub>2</sub> インキュベーターにて細胞を 18 ~ 48 時間培養する<sup>g)</sup>。

#### 5. 遺伝子導入評価

レポーター遺伝子の発現活性を測定する。

- a) 他のプレートを使用する際は『培養プレート毎条件』の項をご参照下さい。  
b) 増殖培地中の血清は、遺伝子導入を妨害しません。  
c) 遺伝子導入時の細胞密度により最適な DNA 量及び HilyMax 量が異なります。  
d) 抗生物質を含まない無血清培地をご使用下さい。小社では DMEM、MEM、Opti-MEM での使用実績があります。  
e) プラスミド DNA は、精製処理後 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> が 1.7 ~ 1.9 の間にあるものをご使用下さい。  
DNA 濃度は、0.15 ~ 1.00 mg/ml を推奨します。  
f) 長時間インキュベーションすると導入効率が低下することがあります。  
g) 細胞によっては、複合体添加 4 時間後に培地交換を行うことで、毒性の低下および導入効率が向上します。

## DNA, HilyMax 最適量の検討：24 ウェルプレート使用時

図 1 を参考に HilyMax による最適遺伝子導入条件をご検討下さい。  
細胞密度 50% 及び 80% にて評価を行い、最適な細胞密度を確認することをお勧めします。

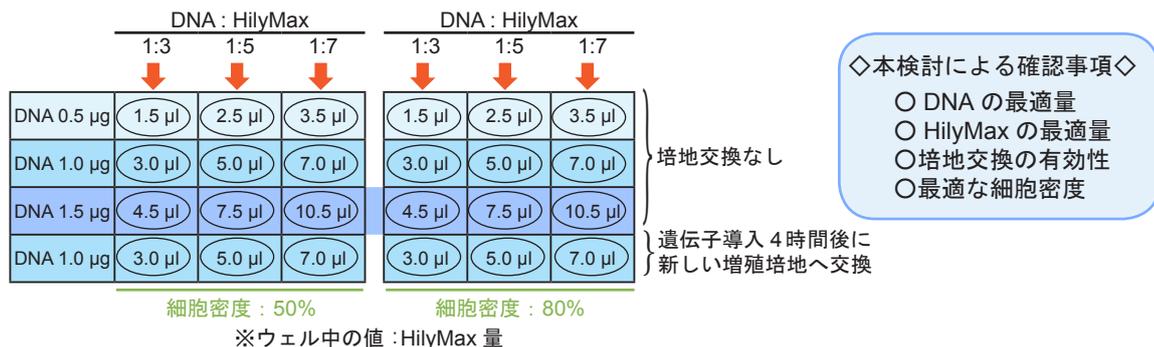


図 1 最適条件検討用プレートレイアウト

24 ウェルプレート以外をご使用の際は、図 1 の DNA 量および HilyMax 添加量に表 1 の換算倍率表の値を乗じた量をご使用下さい。

表 1 プレート毎換算倍率表

96 well plate : × 0.2	12 well plate : × 2	6 well plate (35 mm dish) : × 4
60 mm dish : × 8	100 mm dish : × 24	

培養プレート毎条件

本プロトコール中の操作方法は、24 ウェルプレート使用時の条件です。他のプレートを使用する際は、表 2 に従って導入実験を行って下さい。

表 2 培養容器毎での遺伝子導入条件

細胞培養条件			DNA-HilyMax 複合体調製条件		
培養容器	表面積	培養液量	培地量 (無血清)	DNA 量	DNA(µg) : HilyMax(µl)
96 -well	0.3 cm <sup>2</sup>	0.1 ml	10 µl	0.1-0.3 µg	1:2-1:7
24 -well	1.9 cm <sup>2</sup>	0.5 ml	30 µl	0.5-1.5 µg	1:2-1:7
12 -well	3.8 cm <sup>2</sup>	1.0 ml	60 µl	1.0-3.0 µg	1:2-1:7
6 -well	9.2 cm <sup>2</sup>	2.0 ml	120 µl	2.0-6.0 µg	1:2-1:7
35 -mm	8.0 cm <sup>2</sup>	2.0 ml	120 µl	2.0-6.0 µg	1:2-1:7
60 -mm	21.0 cm <sup>2</sup>	5.0 ml	300 µl	5.0-15.0 µg	1:2-1:7
100 -mm	58.0 cm <sup>2</sup>	15.0 ml	900 µl	15.0-45.0 µg	1:2-1:7

## FAQ

プラスミド DNA の導入率が低い時は、以下の事項をご確認下さい。

- ・ HilyMax Reagent は、完全に溶解していますか？  
⇒ HilyMax の tube 底部の半透明固体が消失しているか確認して下さい。
- ・ 複合体調製時に、30 分以上インキュベーションをしていませんか？  
⇒ 30 分以上インキュベーションすると極端に導入活性が低下する可能性があります。
- ・ 最適な DNA 量、HilyMax 量で遺伝子導入を行いましたか？  
⇒ 極端に導入効率が低い場合は、DNA (µg) : HilyMax (µl) = 1:5 ~ 1:9 の範囲で遺伝子導入を行って下さい。細胞毒性が強い場合は、HilyMax 量を減らして下さい。
- ・ 遺伝子導入時の細胞密度が導入条件に合っていますか？  
⇒ 使用する DNA 量、HilyMax 量により最適な細胞密度が異なります。『遺伝子導入条件の検討方法』の項を参考に最適条件をご検討下さい。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 株式会社同仁化学研究所  
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5  
 熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202  
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp/

ドージン・イースト (東京)  
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012  
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
 フリーダイヤル : 0120-489548  
 フリーファックス : 0120-021557