

はじめに

本プロトコルは、HilyMaxを用いてMDCK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見られない場合は、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 MDCK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 μ l
	DNA	1.5 μ g
	HilyMax	6.0-9.0 μ l
	複合体調製時間	15 min
遺伝子導入後の培地交換	不要	

遺伝子導入操作：24ウェルプレート使用時

《細胞の準備》

- MDCK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
- 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 1.5 μ g/wellを添加、混合
 - HilyMax 6.0-9.0 μ l/wellを添加、混合
 - 15分間、室温にてインキュベーション
- MDCK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

《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	0.3 μ g	1.2-1.8 μ l
24 -well	1.9 cm ²	0.5 ml	30 μ l	1.5 μ g	6.0-9.0 μ l
12 -well	3.8 cm ²	1.0 ml	60 μ l	3.0 μ g	12.0-18.0 μ l
6 -well	9.2 cm ²	2.0 ml	120 μ l	6.0 μ g	24.0-36.0 μ l
35 -mm	8.0 cm ²	2.0 ml	120 μ l	6.0 μ g	24.0-36.0 μ l
60 -mm	21.0 cm ²	5.0 ml	300 μ l	15.0 μ g	60.0-90.0 μ l
100 -mm	58.0 cm ²	15.0 ml	900 μ l	45.0 μ g	180.0-270.0 μ l

HilyMaxによる遺伝子導入例

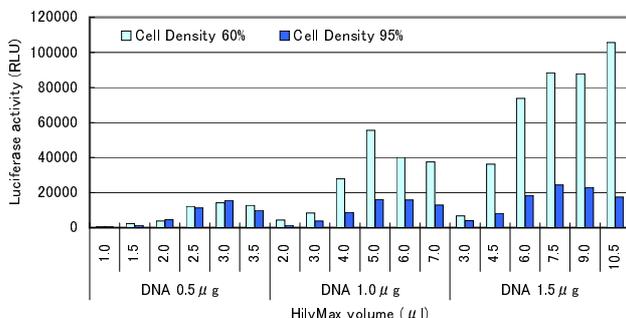


図1 MDCK細胞における遺伝子導入効率

遺伝子導入前日に、24ウェルプレートへ播種、培養したMDCK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。MDCK細胞は、10%FBS(Gibco)及びNon-Essential Amino Acids(Gibco)を含むMEM培地(Gibco)にて、凍結細胞を解凍後約2週間継代培養したものをを用いた。細胞密度60%: 0.6×10^5 cells/well 細胞密度95%: 0.9×10^5 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)=1:7-1:9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)=1:4-1:6で検討下さい。

-毒性が強い場合-

- 対策1. DNA(μ g):HilyMax(μ l)=1:2-1:3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1/3-2/3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？