

ScreenFect™A or A plus プロトコールの最適化

ご使用中の細胞株およびアプリケーションに最適な plasmid DNA 量および Transfection Reagent 使用量を下記手順で検討することを推奨します。(96 well format)

概要

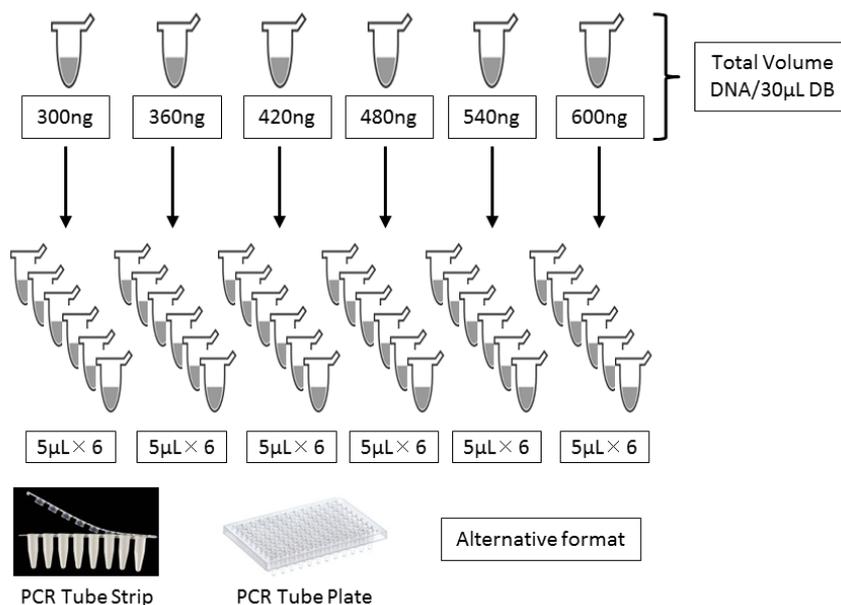
1 ウェルあたり、ScreenFect™A or A plus の Transfection Reagent 0.2~0.7 μ l と plasmid DNA 50~100ng の範囲で検討します。

ScreenFect™A/A plus plasmid DNA トランスフェクションの最適化

1. plasmid DNA/ Dilution Buffer 溶液の作製	
1-A	Dilution Buffer 30 μ l に、プラスミド DNA ^{*1} 300ng、360ng、420ng、480ng、540ng、600ng を添加し、6 つの希釈系列を作製してください。 *1 plasmid DNA は、例えば GFP expression plasmid : Empty vector = 1 : 10 の割合で調製してください。GFP 発現解析は 24 時間後に蛍光顕微鏡で観察できます。
1-B	1-A で調製した 6 系列それぞれの plasmid DNA 溶液 30 μ l から、1 系列につき 5 μ l \times 6 に小分けしてください。これにより 5 μ l \times 36 の plasmid DNA 溶液が作製できます。 plasmid DNA/Dilution Buffer 溶液を調製する際には、PCR Tube Strip または 96 ウェル PCR プレートをご使用ください。

DNA Transfection Optimization (96 wells)

DNA Dilution



2. ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液の作製

Dilution Buffer 30µl を PCR Tube Strip(8 ウェル)の 6 ウェルに添加し、そこへ 1.2µl, 1.8µl, 2.4µl, 3.0µl, 3.6µl, 4.2µl の ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent を添加してください。この際、Dilution Buffer に直接 ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent を添加し、すばやくピペッティングで混合してください。

3. DNA-lipid complex の作製

ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液 5µl を plasmid DNA/ Dilution Buffer 溶液に添加・混合し、室温で 20-30 分インキュベートしてください。この混合物を DNA-lipid complex とします。

8 連ピペットを使用して各 ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液 (8-strip PCR tubes 内の 30µl に希釈したもの)から 5µl ずつとり、以下 B4-B9 のサンプル 1-6 のプラスミド DNA/ Dilution Buffer 溶液に添加し、ピペッティングですばやく混合してください。以下、各 plasmid DNA 希釈系列に対して同様の作業を行ってください。ScreenFect™ or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液とプラスミド DNA/ Dilution Buffer 溶液の混合にはボルテックスミキサーを使用しないでください。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DNA:	A												
50 ng	B				1	2	3	4	5	6			
60 ng	C				7	8	9	10	11	12			
70 ng	D				13	14	15	16	17	18			
80 ng	E				19	20	21	22	23	24			
90 ng	F				25	26	27	28	29	30			
100 ng	G				31	32	33	34	35	36			
	H												
					ScreenFect™	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	µl	
					or A plus								

4. DNA-lipid complex と細胞の混合 (トランスフェクション)

培養細胞の剥離には、トリプシン-EDTA または Accutase®を使用してください。

- 1-Step 法 (リバーストランスフェクション法) の場合
細胞懸濁液 100µl (例えば 40,000 個の HEK293 細胞)を、上記 DNA-lipid complex に添加し、緩やかにピペッティングで混合してください。
- 2-Step 法 (フォワードトランスフェクション法) の場合
細胞培養用培地 100µl を DNA-lipid complex に添加してください。細胞培養に使用していた古い培地を除去し、そこへ作製した各希釈系列の DNA-lipid complex/細胞培養用培地を添加してください。

トラブルシューティング

トランスフェクション効率が低い場合、以下の内容を参考にしてください。

考えられる問題	推奨する解決方法
plasmid DNA	<ul style="list-style-type: none"> • コンタミネーションに注意してください。トランスフェクション効率を著しく低下させる恐れがあります。 • プロトコールの最適化を行ってもトランスフェクション効率が改善しない場合、DNA、ScreenFect™A or A plus Transfection Reagent、培地を含む全ての試薬をスケールアップしてください。 • 陰イオン交換カラムもしくは塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した plasmid DNA の使用を推奨します。
DNA-lipid complex	<ul style="list-style-type: none"> • ScreenFect™A or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液と plasmid DNA / Dilution Buffer 溶液を混合した後、ピペッティングですばやく混ぜてください。また、DNA-lipid complex を形成させている間、緩やかにボルテックスすることでDNA-lipid complex の形成が促進されることがあります。 • DNA-lipid complex の液量が 200µl を超えている場合、複数のチューブへ小分けし、チューブあたりの液量を減らすことでDNA-lipid complex の形成が促進されることがあります。 • ScreenFect™A or A plus Transfection Reagent / Dilution Buffer 溶液と plasmid DNA / Dilution Buffer を混合した後、インキュベーション時間が短いとトランスフェクション効率が低下する場合があります。
ScreenFect™A or A plus 濃度	<ul style="list-style-type: none"> • プロトコールの最適化、DNA 量と ScreenFect™A or A plus 試薬の混合比率を最適化してください。
保存条件	<ul style="list-style-type: none"> • 冷蔵で保存してください。室温で長時間放置したり、凍らせたりしないでください。
細胞	<ul style="list-style-type: none"> • マイコプラズマに感染していない細胞を使用してください。 • ネガティブコントロールや細胞のみのコントロール実験を行い、細胞の状態に問題がないか検討してください。

考えられる問題	推奨する解決方法
細胞密度 および 継代	<ul style="list-style-type: none"> • トランスフェクション時には、60-80%コンフルエントな細胞を使用してください。 • 指数増殖期の細胞を使用してください。 • 2-step 法においては、トランスフェクションを行う 15-24 時間前に継代を行ってください。 • 過度な継代はトランスフェクション効率を下げる恐れがあります。また、再現性を得るためには継代回数を統制してください。 • 継代培養中は抗生物質の使用を推奨します。 • 血清は本品の性能に影響を与えませんが、トランスフェクションを行う際には、EDTA や硫酸デキストランのような陰イオン阻害物質の使用を避けることを推奨します。また、トランスフェクション時に抗生物質の使用を避けることで、トランスフェクション効率が改善されることがあります。
ベクター	<ul style="list-style-type: none"> • 使用する細胞でベクターのプロモーターが機能するか確認してください。 • DNA 配列を確認してください。 • GFP 発現プラスミドを使用し、トランスフェクション効率を確認してください。