

DEAEーデキストラン共重合体(DDMC)によるトランスフェクション プロトコール A

1. トランスフェクションの1日前より被形質変換細胞を100mmシャーレ中で培養する。被形質変換細胞の100mm培養シャーレ中、細胞は 8×10^5 を目安にする。(今回はCOS-1細胞(SV40で形質転換されたアフリカ緑ザル腎細胞)をDMEM培地(抗生物質剤、胎児血清を10%含む)を用い37°C、5%CO₂下で培養を行った。)

2. 洗液の1×PBS(リン酸緩衝塩剤、phosphate-buffered saline (Dulbecco & Vogt(1954)))を準備する。この洗液の1×PBS液とDEAEーデキストラン共重合体(DDMC)液等の陽イオン性多糖類共重合体液を37°Cに加温する。

3. 10×PBS液を使用して、1×PBS液に希釈する。トランスフェクション液を次のような手順で準備する。100mm培養シャーレを用いて、滅菌チューブ中に組み替えDNAとしてルシフェラーゼをコードしたプラスミド(pGL3-コントロール、Control pGL3-Control (プロメガ Promega Madison WI)) 20 μgを1×PBS液で540 μlに希釈する。そして陽イオン性多糖類共重合体液(DDMC)(陽イオン性多糖類として10mg/ml)の28 μlを加える。よく混ざるように滅菌チューブを指でたたくようにする。

4. 被形質変換細胞のCOS-1細胞が存在する培養シャーレから培養液を除く、100mm培養シャーレでは被形質変換細胞を洗液の1×PBSの10mlで2回洗浄する。

5. 3.で調整されたDNAー陽イオン性多糖類共重合体複合体(DDMC)液をこの被形質変換細胞に加える。よく行き渡るように培養シャーレでは被形質変換細胞をかきまぜるように強くゆらす†。

6. 培養シャーレを37°Cで30分間インキュベートする。ときどき培養シャーレをゆらしてみる。

7. 100mm培養シャーレでは成長培地(DMEM培地)6mlを培養シャーレに加える。培養シャーレを37°Cで2時間30分間インキュベートして、細胞毒性(cytotoxicity)を発現させる。成長培地を取換え、さらに37°Cで48-72時間インキュベートする。††

8. 発現効率

COS-1細胞の形質変換の発現効率は組み込まれている発現ルシフェラーゼ活性によった。すなわちルシフェラーゼアッセイキット (luciferase assay kit (Promega Madison WI)) を使用し、ルミノメータ (Turner model TD-20e luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA)) により、TLU値 (Turner light units (TLU)) を求め、DEAE-デキストラン塩酸塩 (Mw 50万、窒素含量5%) のその値を1として各サンプルを比較した。

† 共重合体はチクソトロピー性がすぐれているが、これはせん断力がかかるとみかけの粘度が低下して流動して細胞をよく濡らすことであり、培養シャーレを強く揺らし transfection 液が細胞に行き渡るように工夫しなければならない。

†† 必要なら、トランスフェクション後、3~7時間後を目安に、培地に $0.1\mu\text{l}$ - $5\mu\text{l}$ の SDS を添加することで、細胞毒性を低減します。

プロトコールB

1. トランスフェクションの1日前より被形質変換細胞を35mmシャーレー中で培養する

被形質変換細胞の35mm培養シャーレー中、細胞は 3×10^5 個を目安にする。293細胞 (ヒト胎児腎細胞) をDMEM培地 (抗生物質剤、牛胎児血清を10%含む) を用い、5%CO₂下で37℃下で培養を行う。

2. 洗液の1×PBS (phosphate-buffered saline (Dulbecco & Vogt(1954))) を準備する。この洗液の1×PBS液と塩基性多糖類共重合体液を37℃に加温する。

3. 10×PBS液を使用して、1×PBS液に希釈する。トランスフェクション液を次のような手順で準備する。35mm培養シャーレーを用いて、滅菌チューブ中に組み替えDNAとして pCMV-β-Gal プラスミド (Invitrogen) $10\mu\text{g}$ を1×PBS液で $270\mu\text{l}$ に希釈する。そして各塩基性多糖類共重合体液 (DDMC) (塩基性多糖類として $10\text{mg}/\text{ml}$) の $14\mu\text{l}$ を加える。よく混ざるように滅菌チューブを指でたたくようにする。

4. 被形質変換細胞の293細胞 (ヒト胎児腎細胞) が存在する培養シャーレーから培養液を除く、35mm培養シャーレーでは被形質変換細胞を洗液の1×PBSの2mlで2回洗浄する。

5. 3. で調整されたDNA-塩基性多糖類共重合体液をこの被形質変換細胞に加える。よく行き渡るように培養シャーレーでは被形質変換細胞をかきまぜるように強くゆらす†。

6. 培養シャーレーを37℃で30分間インキュベートする。ときどき培養シャーレーをゆらしてみる。

7. 35mm培養シャーレーでは成長培地（DMEM培地）3mlを培養シャーレーに加える。培養シャーレーを37℃で2時間30分間インキュベートして、cytotoxicityを発現させる。成長培地を取換え、さらに37℃で48-72時間インキュベートする。††

8. 発現効率

β-ガラクトシターゼ染色（X-gal染色）により遺伝子の発現を確認する。

DEAE-デキストラン塩酸塩を1として染色部分の面積よりトランスフェクションを評価する。

† 共重合体はチクソトロピー性がすぐれているが、これはせん断力がかかるとみかけの粘度が低下して流動して細胞をよく濡らすことであり、培養シャーレーを強く揺らし transfection 液が細胞に行き渡るように工夫しなければならない。

†† 必要なら、トランスフェクション後、3~7時間後を目安に、培地に0.1μl-5μlのSDSを添加することで、細胞毒性を低減します。