

ScreenFect™A plus

ヒトiPS細胞201B7株へのトランスフェクション プロトコル (例)

< 条件 >

- 〔細胞数〕 : 5x10⁵ cells/well
- 〔プラスミドDNA量〕 : 1ug/assay
- 〔トランスフェクション試薬混合比率〕
プラスミドDNA量 (μg) : ScreenFect™A plus reagent (μL) = 1 : 2
- 〔well format〕 : 12well プレート(coating:)
(* 上記条件はあくまで参考であり、適宜調節してください)

※下記に掲載している培地、分散剤、コーティング剤は一例です。

< トランスフェクション溶液の調製 : 1 μg プラスミドDNAの場合 >

1. 滅菌処理した1.5mL容チューブを2本用意する。
2. 1で用意した1本のチューブにOpti-MEM®を78μL添加する。
3. 2に2.0μLのScreenFect™A plus reagentを添加する。 溶液 (A)
4. 1で用意した1本のチューブにOpti-MEM®を79μL添加する。
5. 4に1.0μLのプラスミド溶液を添加する。 溶液 (B)
(プラスミド溶液の濃度は1μg/μLとする。)
6. 3の溶液 (A) のチューブに工程5で調液した溶液 (B) 全量を添加する。
7. 混合したチューブをタッピングで良く混合し、卓上遠心機でスピンドアウンする。
8. 室温で5分から20分インキュベーションする。 : Lipoplex溶液
(この間下記の細胞懸濁液の調製が終わるまでインキュベーションしておいて構いません。)

< Matrigel®によるプレートコーティング >

9. Matrigel® hESC-Qualified Matrixを4℃で溶解する。室温で溶解すると凝固するため避ける。
10. Matrigel® 300μL を冷却したD-MEM/Ham's F-12 25mLで希釈する。
11. 希釈した Matrigel® 溶液を 12well プレートに 1mL/well 加える。
12. 室温で1時間以上インキュベートする。

< 細胞懸濁液の調製 >

13. mTeSR™1培地を2~8℃で数時間から一晩かけてゆっくり融解する。37℃では解凍しない。2週間以内に使用する。
14. mTeSR™1培地は使用前に室温に戻す。温浴は使用しない。
15. Y-27632をmTeSR™1培地へ終濃度10μmol/Lとなるように添加する (以下、ROCKi+培地という)。
16. hiPS細胞を培養中のプレートより、培地を除去し、細胞をPBS(-)で一度洗浄する。
* 細胞は80%程度のコンフルエントとなった対数増殖期の状態でトランスフェクションしてください。
17. PBS(-)を除去し、StemPro® Accutaseを添加する。
18. 37℃、5% CO₂インキュベーターで5分間静置する。
19. ROCKi+培地を添加し、P1000 マイクロピペットを用いて、コロニーを剥がし、シングルセルへ分散する。
20. 15 mLチューブに移す。

21. 1,000 rpm (約170 x g)で3分間、室温で遠心する。
22. 上清を除去する。ROCKi+培地で再懸濁する。
23. 生細胞数を計測する。
24. ROCKi+培地で 5×10^5 cells/mLに細胞濃度を調製する。

<トランスフェクション>

25. 8でインキュベートしているチューブに24で調製した細胞懸濁液を1mL添加する。(注)
26. ピペティングでよく混合して、全量を12wellプレートに播種する。
27. CO₂インキュベーターで24時間から72時間培養し、実験に供する。

※播種から24時間経過時に培地交換を行う。このときの培地はY-27632を含む必要はありません。
 (注)工程25でLipoplex溶液と細胞懸濁液を混合しますが、細胞懸濁液をウェルプレートに予め添加し、そこにLipoplex溶液を添加しても問題ございません。ただし、添加した細胞が接着する前にLipoplexを添加してください。

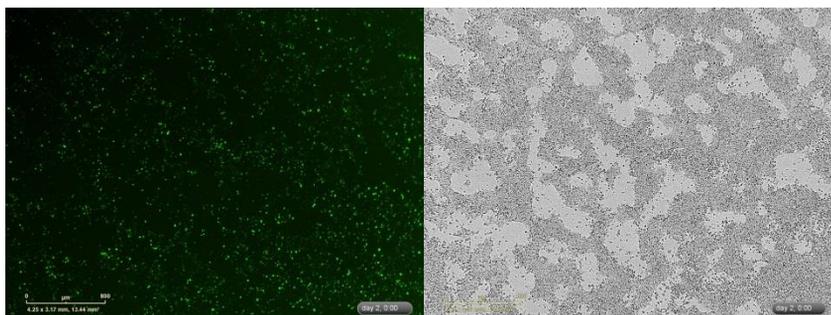
<使用上の注意>

- ヒトiPS細胞への遺伝子導入は、シングルセルの状態で行うことをお勧めします。
- 遺伝子導入時の細胞数は約 5×10^5 cells/wellをお勧めします。
- プラスミドDNA量が多いとき、導入遺伝子の発現量が高いことにより細胞死が引き起こされることがあります。

リバーストランスフェクション (1-STEP)

mTeSR™ 1培地使用

ScreenFect™ A plus



導入効率 : 38%

ScreenFect™ A plusのトランスフェクション条件

- 〔細胞数〕 : 5×10^5 cells/well
- 〔プラスミドDNA量〕 : 1ug/assay
- 〔トランスフェクション試薬混合比率〕
 pDNA量 (μg) : ScreenFect™ A plus reagent (μL) = 1:2
- 〔well format〕 : 12well プレート
- 〔備考〕 : SFA plus reagent および plasmid DNAはOpti-MEM®で希釈しました。

72時間後にFCM解析を実施した所、GFP陽性細胞は38%になり、Viabilityも良好でした。実験の目的に応じて適宜DNA量のご検討をお願い申し上げます。



富士フイルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所 ● 中国営業所
- 東海営業所 ● 横浜営業所
- 筑波営業所 ● 東北営業所
- 北海道営業所



フリーダイヤル 0120-052-099

試薬URL : <https://labchem-wako.fujifilm.com>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA
 TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791

■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
 Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany
 TEL: +49-2131-311-0 FAX: +49-2131-311-100