

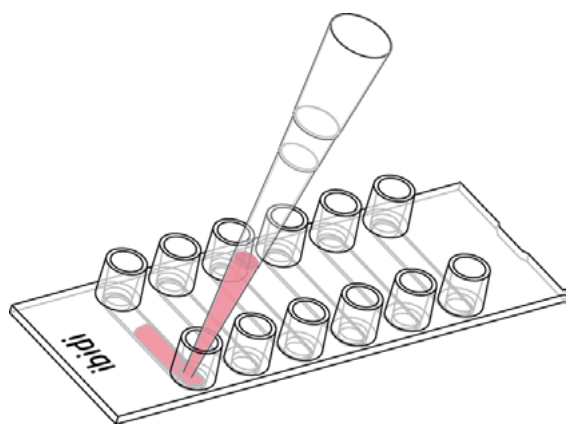
ibidi μ -Slide を使った細胞のトランスフェクションのためのプロトコール

トランスフェクション方法はさまざまですが、このアプリケーションノートでは μ -Slides VI^{0.4} 内で行うDNAトランスフェクションの例について示します。同様の方法により、ibidi μ -Slide内でのあらゆるトランスフェクションプロトコールに応用できます。

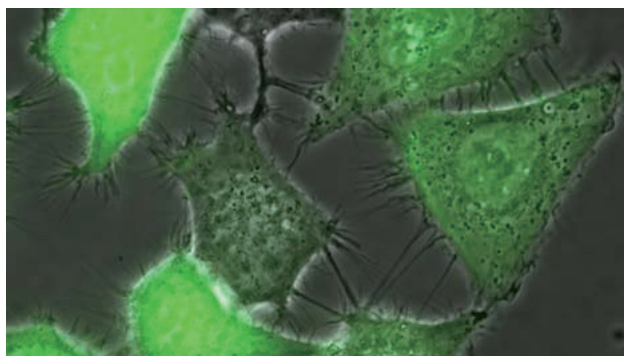
このプロトコールで使用されているトランスフェクション試薬 Metafectene μ Fluo[®] は、細胞による試薬の取り込みを直接トラッキングできます。Metafectene μ Fluo[®] は、蛍光顕微鏡で検出可能な蛍光タグ（ローダミン）で標識された脂質です。

1 原理

最初のステップでは、プラスミドが脂質に付着していわゆるリポプレックスを形成します。細胞懸濁液に添加されたリポプレックスはエンドサイトーシスによって取り込まれます。細胞内腔でDNAがリポプレックスから放出され、次の細胞分裂で核に取り込まれます。



ibidi μ -Slide VI^{0.4}



μ -Slide VI^{0.4} 内で GFP をトランスフェクションした細胞

材料

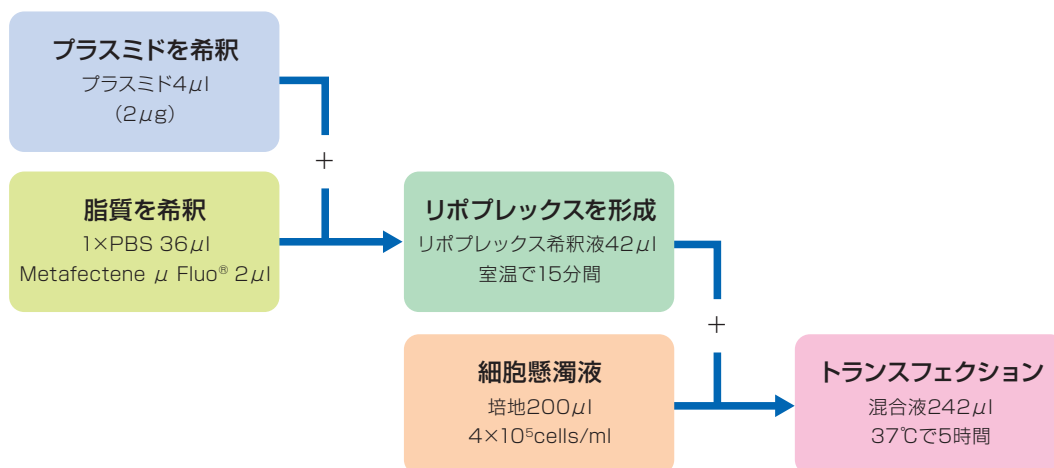
細胞：	HepG2
培地：	DMEM 10% FCS
バッファー：	PBS (1×)
トランスフェクション試薬：	Metafectene μ Fluo [®] (Biontex Laboratories GmbH)
プラスミド：	pCMV-GFP (0.5 mg/ml)
チューブ：	ポリプロピレンチューブ
スライド：	μ -Slide VI ^{0.4} , ibiTreat

2 前日に調製するもの

- スライドをインキュベーター内に一晩入れ、チャンネル内をガス交換します。
- 同様の方法で、培地も平衡化させます。小分けした容器をインキュベーター内に入れ、フタを少し開けて余剰の圧力を逃がします。

3 トランスフェクション溶液の調製

- トランスフェクション試薬、プラスミド溶液およびPBSバッファーを室温に戻します。
- トランスフェクション試薬 (Metafectene μ Fluo[®]) 2 μ l を1×PBS 36 μ l で希釈し、ピペットでゆっくりと吸引・吐出して混合します。
- 試薬希釈液にプラスミド溶液4 μ l を添加し、ピペットでゆっくりと吸引・吐出して混合します。
- リポプレックスを形成するために混合液を室温で15分間静置します。この間に細胞懸濁液を調製します。



4 細胞懸濁液の調製

- 通常の方法で細胞を剥離および計数します。細胞懸濁液が4×10⁵ cells/mlとなるようにDMEM培地を添加します。
 μ -Slide VI の6個のチャンネルを満たすためには、細胞懸濁液200 μ l を調製します。(細胞懸濁液30 μ l / 1チャンネル)

5 トランスフェクション

- リポプレックス溶液 (42 μ l) を細胞懸濁液 (200 μ l) に添加し、再度ピペットで穏やかに混合します。
- この混合液30 μ l を各チャンネルに注入し、細胞を37℃、5% CO₂で5時間インキュベートします。蒸発が最小限に抑えられていることを確認してください。最終的には、 μ -Slideを水に浸したワイブと一緒に別のペトリ皿に入れます。
- インキュベーション中、倒立顕微鏡上での生細胞イメージングによってリポプレックスの取り込みを観察することができます。
- 5時間後、細胞を顕微鏡で確認します。細胞は十分に接着しているはずですが。
- 培地を新鮮な培地と交換します：新鮮な培地120 μ l をチャンネルウェルの1つに入れます。培地はチャンネルを通過して反対側のウェルに流れ込みます。反対側のウェルからピペットで120 μ l を吸引します。チャンネルのインレットから培地を直接吸引することは避けてください。
- 最初のウェルに新鮮な培地120 μ l を添加後、細胞を観察します。

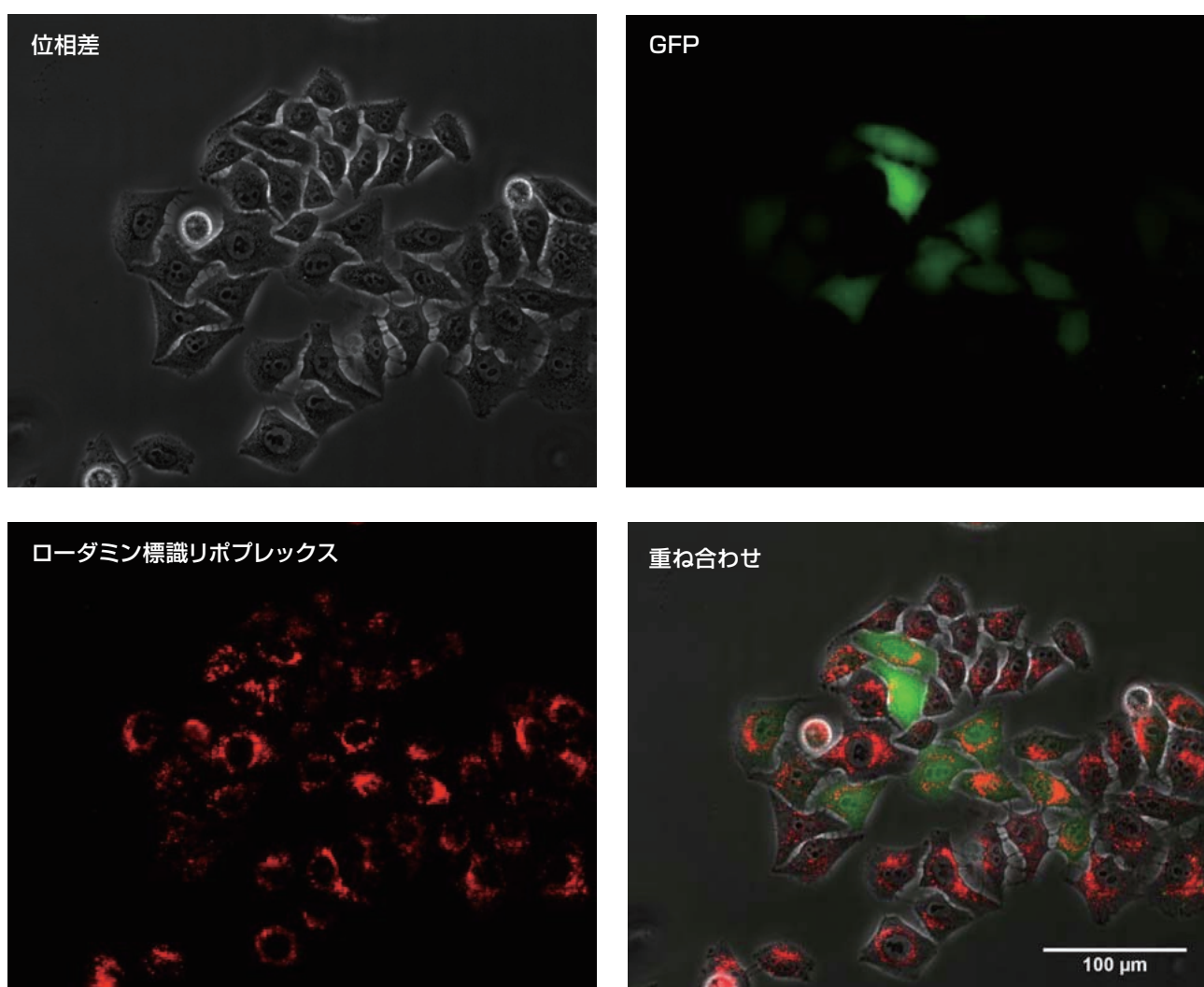
6 トランスフェクション細胞の観察

5までの手順で、細胞はプラスミドDNAが付着したリポプレックスを取り込んでいます。トランスフェクションを成功させるために、リポプレックスはエンドサイトーシス小胞からリリースされており、細胞核内へと輸送されます。リポプレックスの細胞核内への輸送は、主に核エンベロープが消失する細胞分裂中に起こります。

タイムラプス顕微鏡観察を行う場合には、オンステージインキュベーションシステム（例、ibidi ヒーティングシステム）を搭載した倒立顕微鏡にスライドをセットします。10分ごとに写真を撮影します。トランスフェクションしたDNAの発現を視覚化するためにはGFPに適したフィルターセットを、リポプレックスの取り込みをトラッキングするためにはローダミン用のフィルターセットを使用してください。

蛍光画像だけでなく、位相差画像も撮影可能です。細胞がどのように分裂し、その後でどのようにGFPを発現し始めるかを観察することができます。

GFPをトランスフェクションしたHepG2細胞株



GFPをトランスフェクションしたHepG2細胞株：トランスフェクション試薬はローダミン標識されています。細胞内で赤色の小さな集合体として可視化されます。トランスフェクション細胞によって産生されたGFPは細胞質全域に拡散します（鮮やかな緑色）。

写真は、細胞にリポプレックスを添加した24時間後にNikon Ti Eclipseを用いて倍率20倍で撮影したものです。

www.ibidi.comで動画が見れます。

7 影響を及ぼす要因

細胞のトランスフェクションに関しては、 μ -Slideと6ウェルプレートなどの標準的な容器の間に大きな違いはありません。このため、トランスフェクション効率を最大にするためのすべての条件をどちらのタイプの容器でも適用可能です。しかし、ibidi社独自の実験から得られたいくつかのポイントは以下のとおりとなります。

各細胞に最も適したトランスフェクション法が選択された後であっても、以下のような実験的要因に依存してトランスフェクション効率が0%から100%近くまで変動する可能性があります。

- a) **試薬濃度**：すべてのトランスフェクション試薬に多少の毒性があるため、細胞の死亡率が有意に高くない（10%未満でなければなりません）ことが裏付けられた最高濃度を見つける必要があります。多くの場合は、これが最も重要なパラメータとなります。
- b) **インキュベーション時間**：細胞の死亡率が問題であれば、細胞のインキュベーション時間を試薬のマニュアルで推奨される最短時間で実施してください。生存細胞におけるトランスフェクション細胞数が少ない場合には、インキュベーション時間を最長まで延ばします。
- c) **プラスミド濃度**：プラスミド濃度とトランスフェクション効率の間には関連がありますが、標準的なプロトコールにしたがっている限り、このパラメータの影響は低いことが一般的です。
- d) **プラスミド・リポプレックス形成のためのプレインキュベーション時間**：微調整パラメータとしてのみ推奨されます。通常は、試薬のマニュアルに記載されている平均時間にしたがえばよいでしょう。
- e) **プラスミドの純度**：トランスフェクションの成功にとって重要なパラメータですが、一般的なプラスミド精製キットで容易に十分な純度が得られるので、通常はプラスミドの純度が問題となることはありません。