

PGC のトランスフェクション

トランスフェクション

1.5x10⁵cell あたり

LF2000 1.5 μL/25 μL Opti-MEM

DNA 1 μg/25 μL Opti-MEM

(Piggybac の場合、標的:トランスポザーゼ=4:1 が標準)

を混ぜて 15min おく

↓細胞回収

↓1000rpm, 5min (エッペンチューブをスイングローターで回す)

↓上清を抜き、PBS 1ml で懸濁→Cell Count

↓2min おく (PBS は細胞の凝集をなくす)

↓1000rpm, 5min

↓上清を抜き、Opti-MEM で懸濁

↓1000rpm, 5min

↓上清を抜く

↓1.5 x 10⁵cell あたり 100 μL の Opti-MEM で懸濁

↓24well プレートに 1well あたり 900μl のヘパリン抜き培地を入れる

(1ml 培地に 5 μL の「ヘパリン非添加サイトカイン Mix」を入れる)

↓細胞を 1well あたり 100 μL ずつ入れる

↓LF2000+DNA 混合液を 50 μL ずつ入れる

↓38°Cでインキュベート (培養)

2 回



<備考>

- ・導入は LF2000 が良い
- ・アングルローターでは細胞が壁に結合して回収率が大きく下がる
- ・トランスフェクション時に少しでもヘパリンが残っていると導入できない。洗浄時に上清を完全に除くのが重要
- ・ヘパリンなしでも通常の培養が可能
- ・Puromycin は 1ug/ml の濃度でトランスフェクション翌日から添加