

Transfection (Lipofectamine2000) ※1dish (For 4~5 cover slips) by 山崎博幸

1. MEM 100 μ l に Lipofectamine2000 (L2000) 2~4 μ l を mix。 ※死ぬ細胞が多い場合は、少なめにする。
2. MEM 100 μ l に DNA 1-3 μ g を mix。
3. 5min 経過したら、1 と 2 を混合。20min 放置。
4. L2000&DNA mixture を Transfection メディウム 1800 μ l と混合する。
5. 90mm dish に上記の溶液のドロップをつくる。(Cover slip の数だけ)
6. Cell (cover slip) をドロップ中に入れるか、細胞を下にしてドロップの上に浮かせる。
7. 1 時間程度インキュベートしてからグリアに戻す。

Tips

1. DIV10 を超すと段々と効率が悪くなる。(DIV3-8 くらいが調子いいが、経験的に DIV7 くらいが最も効率が良い。)
2. DIV14-16 になるとさらに効率悪くなり、数個しか入らない事が多い。
3. 調子の悪い culture の場合は、早い時期でも効率は悪い。
4. 細胞が死ぬことが多い時は、Lipofectamine2000 の量を半分(2 μ l)にすると改善する。
5. DNA の量は任意。何パターンか行って最適量を決めても良い。
6. インキュベートの時間も任意。30 分でも結果は変わらない事も多々あり。
7. 4 の Transfection メディウム:conditioning された元の dish(グリアフィーダーdish) のメディウムと Neural MEM を、2:1 で混合したもの。グリアフィーダーdish のメディウムをそのまま使っても良い(しかし、量が足りない事が多い)。古い conditioning medium (例えば、DIV10 でトランスフェクションする時に、DIV7 で回収したものをを使うとき)で行う時は、事前に 30 分ほど neuron とインキュベートして異常が起こらないかどうかチェックしたほうが無難。DIV7 でトランスフェクションする時にその日に回収した conditioning medium を使った時では、今のところ問題は起こっていない。さらに万全を期すならば、APV (100 μ M) 等を加えておいて excite toxicity を抑える方法もある。B27 サプリメントには高濃度のグルタミン酸が添加されているので注意が必要です。