

COS-7 細胞への発現プラスミド DNA の導入 (エレクトロポレーション)

1. buffer を調製する。

x10 K-PBS Mg (-) (ストック)

NaCl	0.9	g
KCl	4.5	g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1.45	g
KH ₂ PO ₄	0.1	g
fill up to	50.0	ml

オートクレーブ

1M MgCl₂ (ストック)

MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0.9	g
fill up to	50.0	ml

オートクレーブ

x1 K-PBS

x 10 K-PBS Mg (-)	2.0	ml
1M MgCl ₂	100.0	μl
滅菌水	17.9	ml
合計	20.0	ml

2. COS-7 細胞を PBS で洗浄する。
3. トリプシン 0.5 ml + PBS 2.0 ml で細胞をはがす (希釈するのは穏やかな条件ではがして細胞へのダメージを減らすため)。
4. 血清入りの培地でトリプシンを止め、遠心する。
5. PBS で洗浄し、遠心する。
6. x1 K-PBS で洗浄し、遠心する (血清を良く除くことが必要らしい)。
7. 細胞を 1.0×10^7 cells/ml の濃度で x1 K-PBS に懸濁する。
8. キュベット内で細胞と DNA を混合する。

COS-7	5 x 10 ⁶ cells in 500 μl x1 K-PBS
DNA	15.0 μg (1 μg/μl の場合 15 μl)

9. キュベットを氷上に 10 分間静置する。
10. キュベットの周りの水分を良くふき取った後、チャンバーに入れて、960 μFD, 220 V パルスをかける。

11. 氷上で 10 分間静置する。
12. 500 μ l の serum-free medium を加え、室温で 10 分間放置する。
13. 40 ml の 10%FBS-DMEM に懸濁し, 10 ml dish 4 枚に接種する。
14. 2-3 日後に回収する。

<以上>