

細胞培養のコツ：細胞株および初代細胞 – 遺伝子導入の前に

続き

細胞を増殖用容器から剥離したら、以下のいずれかを添加してトリプシンを不活性化してください。

- 血清を含む増殖培地
- ReagentPack™ (CC-5034、18ページ参照) のトリプシン中和液
- PBS/0.5% BSA

生化学的遺伝子導入試薬（例：HiFect™ 遺伝子導入試薬、215ページ参照）を使用する場合、細胞を増殖用容器から剥離する必要はありません。

必要以上に細胞にトリプシンが残留すると、細胞膜を損傷し、多くの細胞死につながるため、トリプシン処理の間細胞をモニタリングすることが重要です。

細胞の取扱業者の別段の指定がない限り、単層をこすり落とさないでください。細胞をこすり落とすと、細胞に機械的損傷を与えるおそれがあります。また単細胞懸濁液とはなりません。

浮遊細胞で作業を行う場合、剥離は必要ありません。必要な細胞数を遠沈させ、細胞ペレットから可能な限り残余増殖培地を取り除きます。Nucleofection™ の場合、細胞はNucleofector™ 溶液で再懸濁されます。

余計なピペット作業や不必要な洗浄手順を避けることも重要です。細胞を攪拌しないでください。推奨項目以外の余計な作業は、細胞を傷つけ、多量の細胞死を招く可能性があります。

接着細胞について役立つヒント

接着性の高い細胞株で作業している場合は、より強力なトリプシン溶液を使用できます。市販の0.25%および0.5%のトリプシン溶液を利用できます。トリプシン添加前にPBSで単層を洗浄する代わりに、洗浄液としてトリプシン溶液を使用できます。トリプシンを吸引して新しいトリプシン溶液と交換し、細胞が剥離するまで培養器に入れます。

細胞の接着が弱い場合は、EDTAのみで洗浄を行うことができます。これで細胞の剥離には十分な場合があります。または、以下の手順を試みることもできます。細胞をPBSで洗浄し、トリプシンを添加した後、直ぐにトリプシン溶液を吸引して取り除きます。細胞が剥離するまで、残余トリプシン溶液と共に細胞を培養器に入れます。または、細胞の接着が著しく弱い場合は、低温のPBSで細胞を洗浄することもできます。

脂質および遺伝子導入に関する重要な注記

ほとんどの脂質は浮遊細胞に使用できません。遺伝子導入の間、培地に脂質を含む抗生物質を追加しないでください。細胞死を引き起こすことがあります。

抗生物質は、遺伝子導入後に増殖培地に添加できます。場合によっては、12~24時間細胞をならしてから抗生物質を添加すると効果的です。

遺伝子導入後に増殖培地や遺伝子導入溶液中に血清が含まれる場合があります。リポソーム複合体の形成を阻害する

ため、複合体形成の間は血清を含まない状態にします。

脂質を使用すれば、脂質、DNA、細胞および培地量を培養容器の相対表面積に比例して変化させることで、遺伝子導入の規模を拡大することも可能です。

正確なガイドラインについては使用する脂質専用のプロトコルを確認してください。

遠心分離についての重要な注記

Nucleofection™ では、Amaxa™ 最適化プロトコルに明記されている通りの遠心分離ガイドラインに従うことが重要です。遠心分離の基準は90 X g です。90 X g を実現するために選択される速度は使用するローターの種類によって異なるため、プロトコルにはRPMを使用していません。90 X g を実現するのに必要な速度を決定するにはカスタマーの遠心分離機またはローターの操作マニュアルを参照してください。マニュアルがない場合は、以下のリンクより重力加速度からRPMを変換する早見表をご参照ください。

<http://aquaticpath.umd.edu/nomogram.html>

その他の方法として、ローターの最大半径を測定し、Brinkmannウェブサイトにある表に情報を入力することにより、正しいローター速度を計算することができます。

<http://www.sciencegateway.org/tools/rotor>

遠心分離速度と重力加速度は、他の遺伝子導入方法（標準的なエレクトロポレーションや脂質など）ではNucleofection™ におけるほど重要ではないため、多くのプロトコルで遠心速度を指定していません。

細胞の由来

最適な遺伝子導入の結果を得るために、履歴が明らかな細胞＝継代数が少なくまた汚染されていない細胞の使用が推奨されています。

初代細胞については、ロンザのClonetics™ およびPoietics™ 細胞の使用をおすすめします。

遺伝子発現に重要なベクターの要素

はじめに

ロンザの技術サポートチームには、よく次のような質問が寄せられます。「さまざまなベクターバックボーンを使用した場合同じ遺伝子発現レベルが得られないのはなぜか？」1つのベクターに対し、遺伝子発現レベルに影響を与える可能性のある成分が数多く存在します。以下は、ベクターに着目した場合に考慮すべき10の最も重要な要素です。

適切な発現ベクターを選択することは効率的な遺伝子発現を行うのに非常に重要です。図1をご覧ください。

ロンザは、異なるバックボーンと発現カセットで同一のルシフェラーゼを発現する10の異なるベクターを試み、極めて変化に富む発現レベルを得ました。

■ プロモーター強度

ご使用のプロモーターは目的の細胞型に適したものですか？ 表1では、ロンザがAmaxa™最適化プロトコルを有する多様な細胞のCMVプロモーター強度の相対パーセントとして、プロモーター強度が示されています。CMVプロモーターの活性度は、参考文献のCATアッセイ値をもとに100%に設定されています。CMVは多くの哺乳動物細胞において強力なプロモーターですが、使用する細胞で、別のプロモーターがさらに強力な発現を惹起する場合があります（例：BHK-21細胞におけるプロモーターSV40）。

■ イントロン

多くの研究者は、構造的に接合されたイントロンが最適な遺伝子発現には不可欠であると考えています。しかしこの考えは常に正しいとは限りません。イントロンの位置と強度は、転写、mRNAの核外輸送およびポリアデニル化に影響を与える可能性があります。このように、その位置によってはイントロンが遺伝子発現を弱めることさえあります。

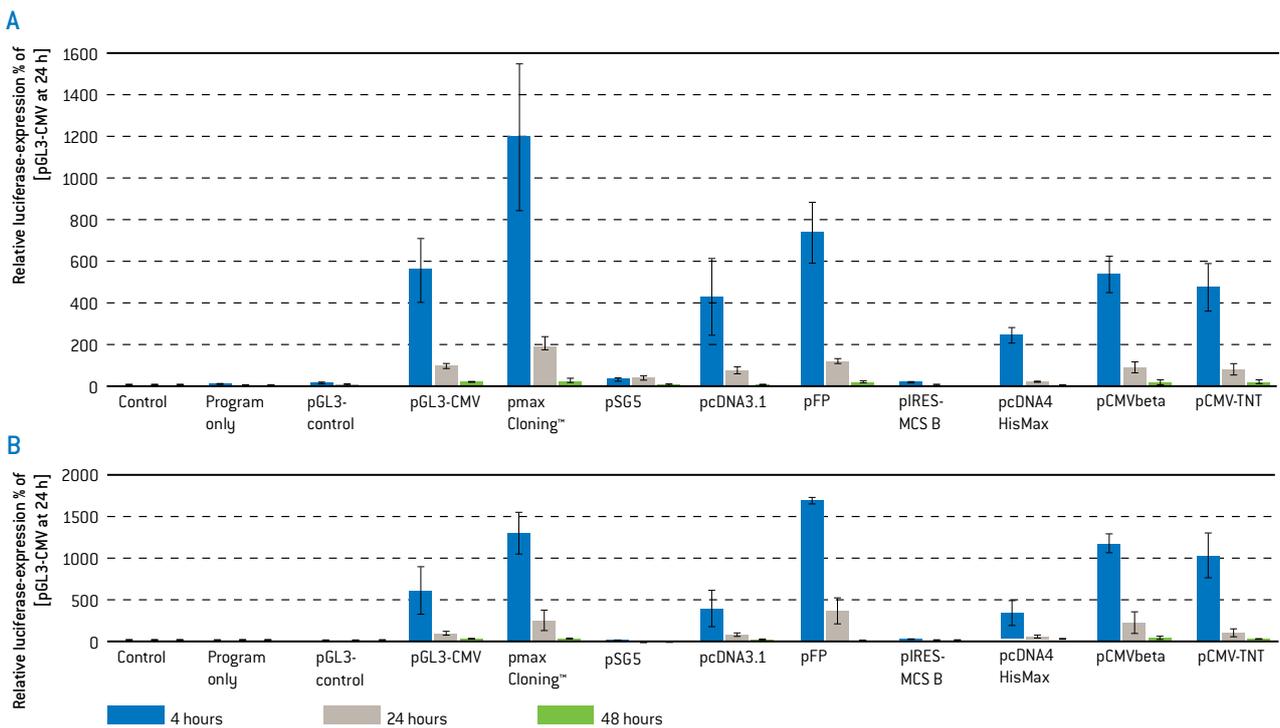


図1. Luciferase expression levels depend on vector backbones. We looked at luciferase expression at 4, 24 and 48 hours in THP-1 and HUVEC cells. The amount of DNA was held at equimolar amounts based on plasmid size. For THP-1, the DNA amount ranged from 0.3 – 0.5 µg per reaction [A]. For HUVECS, we used 2.5 – 4.4 µg of plasmid [B].