

10 技術情報



初代細胞培養・培地	369
初代細胞/方法	384
遺伝子導入	395
培地・試薬	419
電気泳動・分析	427
その他	448

技術情報

はじめに	368
初代細胞培養・培地	
Clonetics™ 細胞 – 安全上の注意点	370
培地準備	370
Clonetics™・Poietics™ 細胞培養用培地	372
歯髄幹細胞培地	372
肺上皮細胞培地オプション	373
内皮細胞培地オプション	374
線維芽細胞培地オプション	376
肝細胞培地	376
ケラチノサイト培地オプション	377
乳腺上皮細胞培地, 無血清	378
メラノサイト培地, 無血清	378
神経細胞培地, 低血清	378
前立腺上皮細胞培地, 無血清	379
ラット心筋細胞培地	379
腎臓細胞培地, 低血清	379
網膜色素上皮細胞培地	379
初代神経細胞増殖培地, 無血清	380
ヒト間葉系幹細胞培地	380
ラット間葉系幹細胞培地	381
ヒト脂肪細胞由来幹細胞培地	381
前駆死蔵細胞増殖培地	381
破骨細胞増殖培地	381
神経前駆細胞増殖培地	382
骨格筋細胞培地	382
骨格筋細胞培地, 低血清	382
平滑筋細胞培地	383
間質細胞培地	383
初代細胞/方法	
解凍 – 単核細胞および造血前駆細胞	382
接着細胞型 – セットアップ	385
接着細胞型 – 細胞の解凍	385
Cryopreserved Hepatocytes Protocol	386
接着細胞型 – 播種	388
接着細胞型 – 増殖	388
接着細胞型 – 継代	389
96ウェルプレートへの継代	391
凍結保存のインストラクション	392
継代培養中に細胞の回収率と生存率を上げるには	393
カスタム細胞単離サービス	394

遺伝子導入

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	395
遺伝子発現に重要なベクターの要素	397
遺伝子導入実験に必須のプラスミド DND の調整	401
安定型細胞株作成のガイドライン	402
Nucleofection™ を使った siRNA 実験のデザイン	409
Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集	413

培地・試薬

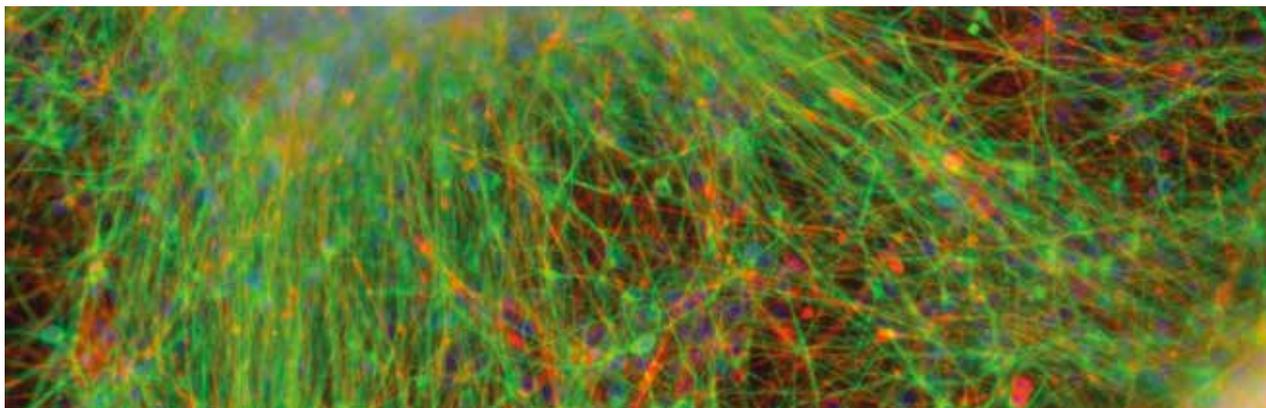
細胞培養の技術情報	419
無血清培地への馴化	419
細胞培養のウィーニングプロトコル	420
凍結保存と再融解	421
細胞数の決定	422
粉末培地の調整	424
哺乳類細胞の継代培養のための準備	425

電気泳動・分析

AQ	427
アガロースの種類	431
アガロースゲルの調製	432
ローディングバッファー	436
アガロースゲルでの DNA の検出と分離	437
GelStar®, SYBR® Green I, II 核酸ゲル染色による DNA の検出	439
エチジウムブロマイドによる DNA の検出	441
アガロースゲルからの DNA の回収	442
アクリルアミドゲルによるタンパク質の分離	444
アクリルアミドゲルからのタンパク質のプロットティング	446
電気泳動理論	447

その他

安全と環境への対策	448
特定化学品の危険有害性	448
Trademarks and Patents	450
Terms and Conditions	450



はじめに	368
初代細胞培養・培地	369
初代細胞/方法	384
遺伝子導入	395
培地, 試薬, 血清	419
電気泳動・分析	427

はじめに

初代細胞、培地、遺伝子導入、細胞単離の分野において長年培われた信頼のブランドと共に、ロンザ製品は研究業界の標準であり続けています。また、技術サポートによるカスタマーサポートの面でも、業界をリードする努力を欠かしません。グローバルな技術サポートチームによるサポートだけでなく、基礎研究から応用研究まで、様々な用途に用いられる多彩な支援ツールを提供しています。以下の章では、研究を支援するさまざまな技術的ヒントやガイドラインを提供するとともに、ロンザのウェブサイトから入手可能な多くの支援ツールの概要を説明します。

ロンザがここで提供または推奨した技術的な助言または指針は、その完全性や正確度およびその利用により得られる結果に関して、ロンザが保証したり、表明したり暗示したりするものではありません。ご質問がございましたら、下記のご連絡先までお問い合わせください。

初代細胞と培地

初代細胞と細胞株、いずれを使用する研究の場合でも、細胞培養を成功させるための製品ソリューションと技術支援ツールを取りそろえています。一般的な細胞培養ワークフローガイドラインや培地調製手順に加えて、伝統的な培地調製、解凍、セットアップに関するプロトコルや、無血清培地ウィーニング手順といった情報を提供します。

遺伝子導入

本セクションには、効率の高い遺伝子導入を達成するための細胞の調整法の重要なガイドラインが示されています。基質の調製や細胞の取り扱いに関するヒントに加えて、siRNAの実験と安定型クローンの作製を成功に導くガイドラインを提供します。詳細については、ロンザウェブサイトでも豊富に提供されている実験ガイドをご覧ください。いずれも、ロンザの技術サポートチームが、遺伝子導入を成功させるための重要な検討事項について議論を重ねて作成したものです。



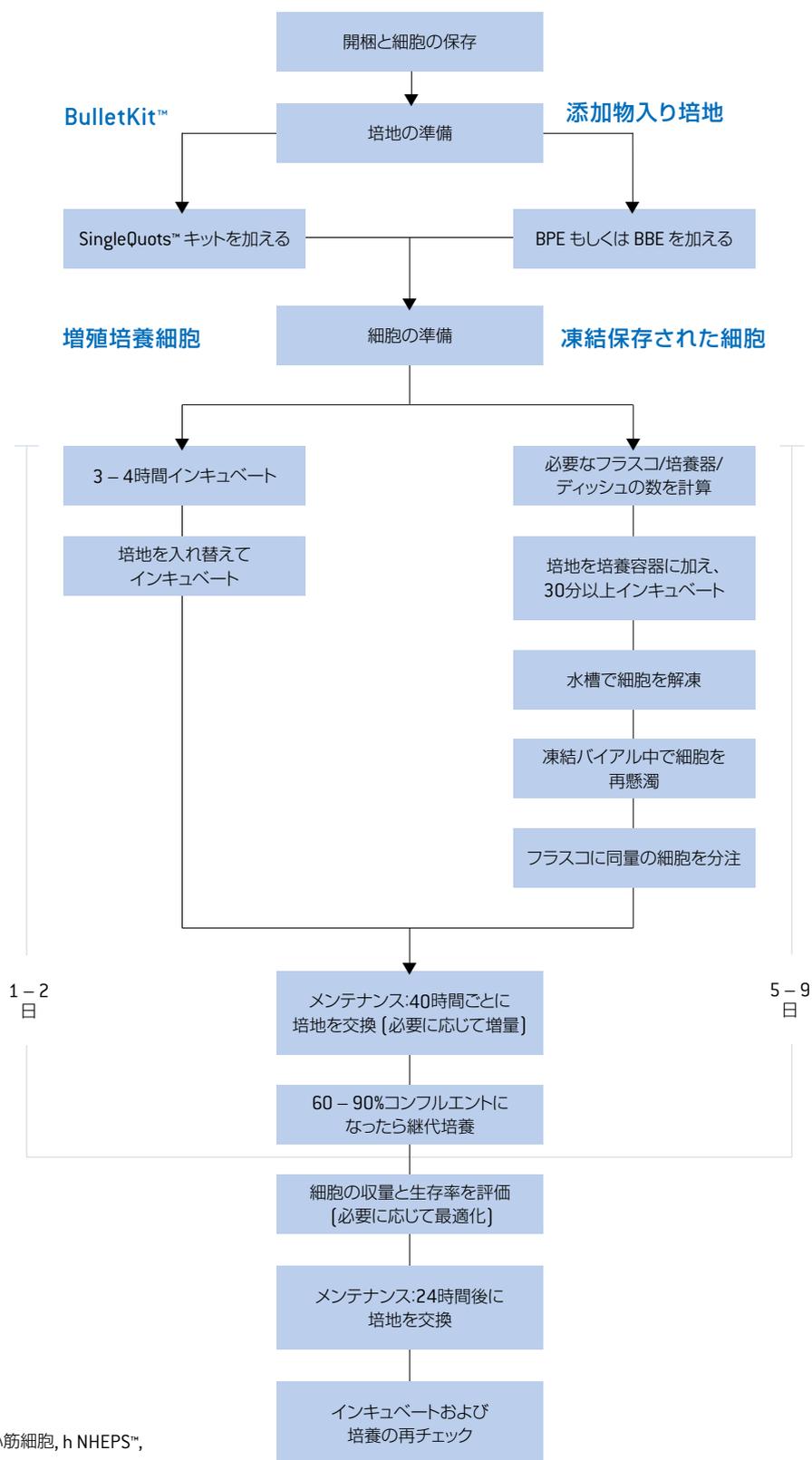
www.lonza.com/technical-library

電気泳動と分析

アガロースやサイズマーカの詳細な情報から、DNA抽出やタンパク質のウェスタンブロットングの具体的手順まで、ロンザはアガロースやポリアクリルアミドゲル中で核酸やタンパク質を分離、検出、分析するのに必要な基本的なニーズに対応しています。

本セクションでは、ロンザのオンライン「電気泳動法ソースブック」に掲載されている情報の一部を紹介します。

初代細胞培養・培地



Clonetics™ 細胞 – 安全上の注意点

- 汚染予防の一環として、「組織培養法 (Tissue Culture Methods)」J 項の、「人体組織を使用する研究施設における、感染性物質による研究員汚染を予防するためのガイドライン (Guidelines to Avoid Personnel Contamination by Infective Agents in Research Laboratories That Use Human Tissues)」に従ってください。
- どのような材料を取り扱う際も、常に手袋と安全眼鏡を着用してください。凍結保存細胞を取り扱う際にご注意ください。急速な温度変化は、液体窒素の飛散を引き起こすおそれがあります。
- 実験後はよく手を洗うようにしてください。
- 試薬や細胞を取り扱っている場所で喫煙や飲食をしないでください。
- 口を使ったピペット吸引は決して行わないでください。
- ヒト由来や動物由来の製品は生物学的災害を招くおそれがあります。提供されるヒト細胞は HIV-1、B および C 型肝炎ウイルス陰性ですが、適切な予防措置を取って不慮の接触を防いでください。

 <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>

 注意: Clonetics™ と Poietics™ 製品はヒト由来物質を含んでいます。感染の可能性があります。

培地準備

はじめに

培地や細胞の調製を開始する前に、以下の手順に従ってください。

1. 無菌環境を用意します。
 - 無菌環境は、アクセス用前面開口部とフィルター付き層流通気口をもつ、クラス II の生物学的に安全なキャビネット、または同等の装置から構成されます。
2. 必要な培地量を決定します。
 - 使用する培地量を決定するには、表「プラスチック容器の増殖面積」を確認してください。[377ページ参照]
3. 必要な滅菌器具と容器
 - 使い捨て滅菌血清用ピペット
 - マイクロピペットおよび滅菌ピペットチップ
 - マルチチャンネル容量可変ピペットまたはリピーティングピペット
 - マルチチャンネルピペットとセットで使用する滅菌容器
 - 15 ml 遠心分離用滅菌チューブ
 - 細胞培養フラスコ、またはマルチウェル/平底組織培養プレート
 - 血球板または細胞計数器
4. その他に必要なもの
 - 70%アルコール(エタノールまたはイソプロパノール)
 - 増殖培地(細胞型特異的なもの)
 - 防護用手袋および衣類
 - トリパンプルー
5. 初期セットアップを計画して準備します。
 - 製品添付の「試験成績書」に記載された細胞数に基づいてセットアップを行います。
6. 加湿培養器の目盛りを確認します。培養器は加湿し、5% CO₂、95%空気存在下、37°Cに設定してください。

培地準備

続き

無菌環境で以下の手順を実行

必要な添加因子をすべて加えた培地で、以下を実行します。

1. 必要に応じて、ウシ脳抽出物(BBE)またはウシ脳下垂体抽出物(BPE)を500 ml ボトル入りの基本培地に添加します。
2. 培地ボトルから BBE または BPE 添加因子を取り外します。
3. エタノールまたはイソプロパノールでバイアルおよび培地ボトルを消毒します。
4. バイアルの中身すべて(約2 ml)をピペットで培地に添加します。培地でバイアルをすすぎ、ピペットで中身を500 ml ボトルに戻します。
5. キャップを交換し、培地ボトル数回軽く回転させて混合します。
6. 培地ボトルのラベルに、BBE または BPE が添加された日付を記入します。調製済みの「完全培地」は30日以内に使用してください。添加因子をすべて加えたこの培地は「増殖培地」と呼ばれます。

BulletKit™ 培地では以下の手順を実行してください。

1. SingleQuots™ 冷凍保存バイアルと基本培地ボトル外表面をエタノールまたはイソプロパノールで消毒します。
2. 各冷凍保存バイアルを無菌的に開封し、ピペットで全量を基本培地に添加します。
3. 培地で各冷凍保存バイアルをすすぎます。各冷凍保存バイアルの記載量を全量を回収できない可能性もありますが、最大10%を失った場合でも、添加因子を加えた培地の細胞増殖特性に影響することはありません。
4. 各キットに同梱されているラベルを添加因子入りの基本培地ボトルに貼ります。これを使用して、添加された各添加因子の分量と日付を記録します。混乱や重複した添加を避けるために、基本培地ラベルの上に記入したラベルを重ねて貼るよう推奨されます。
5. 製品の期限に基づいてラベルに新しい有効期限を記録します。完全に調製した BulletKit™ は30日以内に使用してください。添加因子をすべて加えたこの培地は「増殖培地」と呼ばれます。

注記: 添加過程において無菌状態が損なわれたおそれがある場合は、完全に調製した増殖培地全体を再度フィルターにかけて、無菌性を確保できます。再度フィルターにかける場合は0.2ミクロンのフィルターを使用してください。各フィルター作業においてタンパク質の一部が失われる可能性があるため習慣的にフィルターすることは推奨されません。

プラスチック容器の増殖面積

フラスコ	効果的な増殖面積	培養に必要な培地量	2,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	3,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	5,000 cells/cm ² の時の使用細胞数
T-25	25 cm ²	5 ml	62,500	87,500	125,000
T-75	75 cm ²	15 ml	187,500	262,500	375,000
T-150	150 cm ²	30 ml	375,000	525,000	750,000

ディッシュ	効果的な増殖面積	培養に必要な培地量	2,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	3,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	5,000 cells/cm ² の時の使用細胞数
35 mm	9.6 cm ²	2 ml	20,000	28,000	40,000
60 mm	21 cm ²	5 ml	52,500	73,500	105,000
100 mm	55 cm ²	11 ml	137,500	192,500	275,000
150 mm	148 cm ²	30 ml	370,000	518,000	740,000

マルチウェルプレート	ウェル当たりの効果的な増殖面積	培養に必要な培地量 (ウェル当たり/全量)	10,000 cells/cm ² にするために最初に必要な細胞数
6 ウェル	9.60 cm ²	2 ml / 12 ml	96,000
12 ウェル	3.80 cm ²	1 ml / 12 ml	38,000
24 ウェル	2.00 cm ²	0.5 ml / 12 ml	20,000
48 ウェル	0.75 cm ²	150 μl / 7 ml	7,500
96 ウェル	0.32 cm ²	100 μl / 10 ml	3,200

Clonetics™・Poietics™ 細胞培養用培地

培地仕様

培地は、特定の型のヒト初代細胞を最適に増殖させるよう配合されています。添加因子なしの基本培地として購入することもできますが、添加因子をすべて加えた増殖培地、またはパッケージ化された便利な BulletKit™ 培地を購入することもできます。後者では、ユーザーが添加因子の種類や濃度を調整できます。各種の培地は検査によって、ヒト初代細胞を記載通りに増殖及び分化が保証されています。

各培地に対して、生化学試験および無菌試験が実施されています。すべての培地製品について、要望に応じて「試験成績書」が発行されます。

基本培地

基本培地は、特定の型のヒト初代細胞向けに最適化されています。基本培地には、細胞増殖に必要な増殖因子は含まれていません。播種効率と細胞増殖を強化するには増殖因子を追加する必要があります。最適化された組成によって、様々なヒト初代細胞型の研究に対応できます。ロンザの長年の培地開発の成果をカスタマー自身の研究において活用することができます。

完全培地

完全培地とは、完全に添加因子を添加された増殖培地(BPE と BBE は別梱包です)であり、培養で特定のヒト初代細胞型を増殖させるのに必要なすべての増殖因子と添加因子を含んでいます。可能な限り組成の曖昧な添加因子は避け、必要な時に最低限の量のみ使用するようにしましょう。すべての増殖培地の標準組成には抗菌剤が含まれています。リクエストに応じて抗菌剤を含まない培地の注文も可能です。

BulletKit™ 培地

BulletKit™ 培地は、最終的な培地組成を柔軟に調整できるため製品の使用期限をコントロールできます。各 BulletKit™ 培地には、基本培地および1回使用分で計量済みの分取量で提供される増殖因子や抗菌剤(SingleQuotes™)が含まれており、必要に応じて完全に添加因子が加えられた増殖培地を作製することができます。

歯髄幹細胞培地 (DPSC BulletKit™ 培地)

歯髄幹細胞(DPSC)培地はヒト歯髄由来間葉系幹細胞の増殖に最適化されています。基本培地の成分と増殖用添加因子は最適な増殖のために調整されています。

DPSC BulletKit™ 培地

- ヒト歯髄由来間葉系幹細胞の増殖に使用する基礎培地と添加因子セットのキット製品

カタログ番号	製品名	内容
PT-3005	DPSC BulletKit™ Medium	500 mL DPSC 基本培地および PT-4516 SingleQuotes 添加因子セット
PT-3927	DPSC 基本培地	Dental Pulp Stem Cell 基本培地 (500 mL)
PT-4516	DPSC SingleQuotes 添加因子セット	増殖因子 50 mL, L-グルタミン 10 mL, アスコルビン酸 5 mL, ゲンタマイシン 0.5 mL

肺上皮細胞培地オプション

肺上皮細胞培地は、無血清培地であり、特定の細胞の増殖と分化のために最適化されています。基本培地の各成分と各増殖用添加因子の量は、最適な増殖のために調整されています。ロンザは、気道細胞の増殖に適した数多くの種類の培地を提供しており、必要な性能と形成に柔軟に対応することができます。使用する培地を選択する際は特定の培地に関する推奨項目を参照するか「技術サポート」にお問い合わせください。

BEGM™ BulletKit™ 培地

- 抗菌剤を含む培地中の通常または患者のヒト気管支上皮細胞 (NHBE および DHBE) の増殖を最適化

SAGM™ BulletKit™ 培地

- ヒト小気道上皮細胞である SAEC の増殖を強化

B-ALI™ BulletKit™ 培地

- 気液界面培養における気管支上皮細胞の分化

S-ALI™ BulletKit™ 培地

- 気液界面培養における小気道上皮細胞の分化

カタログ番号	製品名	内容
CC-3170	BEGM™ BulletKit™	気管支上皮増殖培地 BulletKit™, 無血清
CC-3171	BEBM™ 基本培地	気管支上皮細胞基本培地, 無血清
		添加により BEBM™ を BEGM™ として使用可能
CC-4175	BEGM™ SingleQuots™ キット	BPE, 2 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; hEGF, 0.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; トリヨードチロニン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml; レチノイン酸, 0.5 ml
CC-3118	SAGM™ BulletKit™	小気道上皮細胞増殖培地 BulletKit™, 無血清
CC-3119	SABM™ 基本培地	小気道上皮細胞基本培地, 無血清
		添加により SABM™ を SAGM™ として使用可能
CC-4124	SAGM™ SingleQuots™ キット	BPE, 2 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; hEGF, 0.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; トリヨードチロニン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml; レチノイン酸, 0.5 ml; BSA-FAF, 5.0 ml
		気管支気体-液体界面培地 BulletKit™, 無血清
00193514	B-ALI™ BulletKit™	B-ALI™ BulletKit™: 250 ml ボトル入り B-ALI™ 増殖基本培地, 500 ml ボトル入り B-ALI™ 分化用基本培地, B-ALI™ SingleQuots™ キット
00193516	B-ALI™ 増殖基本培地	気管支気体-液体界面基本培地増殖用, 無血清
00193517	B-ALI™ 分化用基本培地	気管支気体-液体界面基本培地分化用, 無血清
		添加により B-ALI™ 基本培地を増殖および分化用培地として使用可能
00193515	B-ALI™ SingleQuots™ キット	トランスフェリン, B-ALI™ 誘導体, 1 ml; BPE, 3.3 ml; エピネフリン 0.9 ml; GA-1000, 0.9 ml; hEGF, 0.9 ml; ヒドロコルチゾン, 0.9 ml; インスリン, 0.9 ml; レチノイン酸, 0.9 ml; トリヨードチロニン, 0.9 ml
		小気道気液界面培地 BulletKit™, 無血清
CC-4539	S-ALI™ BulletKit™	S-ALI™ BulletKit™: 250 mL ボトル入り S-ALI™ 増殖基本培地, 500 ml ボトル入り S-ALI™ 分化用基本培地, S-ALI™ SingleQuots™ キット
CC-3281	S-ALI™ 増殖基本培地	小気道-気液界面基本培地増殖用, 無血清
CC-3282	S-ALI™ 分化基本培地	小気道-気液界面基本培地分化用, 無血清
		トランスフェリン, B-ALI™ 誘導体, 0.9 ml; BPE, 3.2 ml; エピネフリン 0.9 ml; GA-1000, 0.9 ml; hEGF, 0.9 ml; レチノイン酸, 0.9 ml; ヒドロコルチゾン, 0.9 ml; トリヨードチロニン, 0.9 ml, ウシ血清アルブミン-脂肪酸不含 8.0 ml
CC-4538	S-ALI™ SingleQuots™ キット	

内皮細胞培地オプション

上皮細胞培地は上皮細胞の増殖に最適化された低血清培地です。基本培地の各成分と各増殖用添加因子の量は、最適な増殖のために調整されています。現在ロンザは、上皮細胞増殖用に4つの Clonetics™ 培地を提供しており、必要な性能と形成に柔軟に対応することができます。使用する培地を選択する際は特定の培地に関する推奨項目を参照するか「技術サポート」にお問い合わせください。

EGM™ 完全培地および EGM™ BulletKit™ 培地

- EGM™ 完全培地は添加因子が加えられた増殖用培地にウシ脳抽出物(BBE)が別のバイアルで添付
- EGM™ BulletKit™ には基本培地と添加因子、増殖因子がそれぞれ凍結分取量として添付
- 最終血清濃度は2%
- EGM™ の使用によりすべての Clonetics™ 上皮細胞を増殖可能(微小血管、冠状動脈、臍動脈および腸骨動脈を除く)

EGM™ Plus BulletKit™ 培地

- VEGF 不含
- 最終血清濃度は2%
- EGM™ Plus にて単離した HUVEC 細胞の増殖に使用

EGM™ MV BulletKit™ 培地

- 微小血管および冠状動脈の上皮細胞のために開発
- 基本培地は EGM™ と同じ
- 最終血清濃度は5%
- EGM™-MV の使用によりほとんどの Clonetics™ 上皮細胞を増殖可能

EGM™-2 BulletKit™ 培地

- 基本培地と増殖因子を改善
- BBE 不含
- 最終血清濃度は2%
- EGM™-2における細胞増殖を改善
- EGM™-2の使用によりすべての Clonetics™ 上皮細胞を増殖可能(微小血管、冠状動脈、臍動脈および腸骨動脈を除く)

EGM™-2MV BulletKit™ 培地

- 肺毛細内皮細胞の増殖を強化するために開発
- BBE 不含
- 最終血清濃度は5%まで増加

内皮細胞培地オプション

続き

カタログ番号	製品名	内容
CC-3125	EGM™ MV BulletKit™	微小血管内皮細胞増殖培地 BulletKit™ 5% FBS 含む
CC-3121	EBM™ 基本培地	内皮細胞基本培地, 無血清
CC-4143	EGM™ MV SingleQuotes™ キット	添加により EBM™ を EGM™ MV として使用可能 BBE, 2 ml; hEGF, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; FBS, 25 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3202	EGM™-2 MV BulletKit™	微小血管内皮細胞増殖培地-2 BulletKit™ 5% FBS 含む
CC-3156	EBM™-2 基本培地-2	内皮細胞基本培地-2, 無血清
CC-4147	EGM™-2 MV SingleQuotes™ キット	添加により EBM™-2 を EGM™-2 MV として使用可能 hEGF, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.2 ml; FBS, 25 ml; VEGF, 0.5 ml; hFGF-B, 2 ml; R3-IGF-1, 0.5 ml; アスコルビン酸, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml (BBE なし)
CC-3024	EGM™ 完全培地	内皮細胞増殖培地 2% FBS 含む
CC-3124	EGM™ BulletKit™	内皮細胞増殖培地 BulletKit™ 2% FBS 含む
CC-3121	EBM™ 基本培地	内皮細胞基本培地, 無血清
CC-4133	EGM™ SingleQuotes™ キット	添加により EBM™ を EGM™ として使用可能 BBE, 2 ml; hEGF, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; FBS, 10 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3129	EBM™-PRF	EBM™ フェノールレッド含まない
CC-3162	EGM™-2 BulletKit™	内皮細胞増殖培地-2 BulletKit™ 2% FBS 含む
CC-3156	EBM™-2 基本培地	内皮細胞基本培地-2, 無血清
CC-4176	EGM™-2 SingleQuotes™ キット	添加により EBM™-2 を EGM™-2 として使用可能 hEGF, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.2 ml; FBS, 10 ml; VEGF, 0.5 ml; hFGF-B, 2 ml; R3-IGF-1, 0.5 ml; アスコルビン酸, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml, ヘパリン, 0.5 ml (BBE なし)
00190860	EBM™-2 基本培地 (1L)	内皮細胞基本培地-2 (1L)
CC-5035	EGM™-Plus BulletKit™	内皮細胞増殖培地™ BulletKit 2% FBS 含む
CC-5036	EGM™-Plus 基本培地	内皮細胞基本培地, 無血清
CC-4542	EGM™-Plus SingleQuotes™ キット	BBE 1ml; L-グルタミン 25 ml; hEGF 0.5 ml; ヒドロコルチゾン 0.5 ml; FBS 10 ml; GA-1000 0.5ml; アスコルビン酸 0.5 ml; ヘパリン 0.5 ml

線維芽細胞培地オプション

線維芽細胞培地は線維芽細胞の増殖用に最適化されています。基本培地の各成分と各増殖用添加因子の量は最適な増殖のために調整されています。線維芽細胞増殖用に3種類の培地を提供しており、必要な性能と形成に柔軟に対応することができます。使用する培地を選択する際は特定の培地に関する推奨項目を参照するか「技術サポート」にお問い合わせください。

FGM™ BulletKit™ 培地

- FGM™ は既知組成培地で血清不含有

FGM™-2 BulletKit™ 培地

- 最終血清濃度を2%とした FBS のバイアルを含む

FGM™-3 BulletKit™ 培地

- 心臓線維芽細胞の増殖用に特別調製
最終血清濃度を10%とした FBS のバイアルを含む

FGM™ CD BulletKit™ 培地

- 既知組成培地で血清不含有
- 動植物由来の未知成分不含有

カタログ番号	製品名	内容
CC-3132	FGM™-2 BulletKit™	線維芽細胞増殖培地 BulletKit™-2, 2% FBS 含む
CC-3131	EBM™ 基本培地	線維芽細胞基本培地
CC-4126	FGM™-2 SingleQuots™ キット	添加により FBM™ を FGM™-2 として使用可能 hFGF-B, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml FBS, 10 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3130	FGM™ BulletKit™	線維芽細胞増殖培地 BulletKit™, 既知組成
CC-3131	EBM™ 基本培地	線維芽細胞基本培地
CC-4134	FGM™ SingleQuots™ キット	添加により FBM™ を FGM™ として使用可能 hFGF-B, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-4526	FGM™-3 BulletKit™	線維芽細胞増殖培地 BulletKit™ (心臓線維芽細胞用)
CC-3131	EBM™ 基本培地	線維芽細胞増殖培地培地 SingleQuots™ 添加因子および増殖因子 (心臓線維芽細胞用)
CC-4525	FGM™-3 SingleQuots™ キット	インスリン, 0.5 ml; rhFGF-B, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml; FBS, 50 ml
00199041	FGM™ CD BulletKit™	線維芽細胞増殖培地 BulletKit™, 無血清, Xeno-フリー
00199019	FBM™ CD 基本培地	線維芽細胞培地-既知組成
00199020	FGM™ CD SingleQuots™ キット	添加により FBM™ CD を FGM™ CD として使用可能: 添加因子 5.0 ml

肝細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
MCAT50	Animal Hepatocyte Thawing Medium	For non-rodent cryopreserved cells
MCHT50	Human Hepatocyte Thawing Medium	For cryopreserved cells
MCHT50P	Pooled Human Hepatocyte Thawing Medium	Medium For cryopreserved cells
MCRT50	Rodent Hepatocyte Thawing Medium	
MCST250	Cryo Human Stellate Cell Growth Media	
MCKP250	Cryo human Kupffer cell plating media	
MCKM250	Cryo human Kupffer cell maint. Media	
MM250	Hepatocyte Maintenance Media	
MP100	Hepatocyte Plating Medium	
MP250	Hepatocyte Plating Medium	
CC-3198	HCM™ BulletKit™	肝細胞培養培地, フェノールレッドフリー
CC-3199	HBM™ 基本培地	肝細胞基本培地, フェノールレッドフリー, 無血清
CC-4182	HCM™ SingleQuots™ キット	添加により HBM™ を HCM™ として使用可能 hEGF, 0.5 ml; トランスフェリン 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; BSA, 10.0 ml; アスコルビン酸 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml, インスリン, 0.5 ml
CC-3197	HMM™ Medium	HMM™, 肝細胞メンテナンス培地, フェノールレッドフリー, 無血清
CC-4192	HMM™ SingleQuots™ キット	HMM™ SingleQuots™, HMM™ で最適な細胞維持のためには添加因子が必要 インスリン; 0.5 ml デキサメタゾン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml

ケラチノサイト培地オプション

ケラチノサイト培地はケラチノサイト増殖用に最適化されています。基本培地の各成分と各増殖用添加因子の量は最適な増殖のために調整されています。ケラチノサイト増殖用に3種類の培地を提供しており、必要な性能と形成に柔軟に対応することができます。使用する培地を選択する際は特定の培地に関する推奨項目を参照するか「技術サポート」にお問い合わせください。

KGM-Gold™ BulletKit™ 培地

- 無血清状態における正常ヒト上皮ケラチノサイト Clonetics™ NHEK のために最適化
- 基本培地と添加因子、増殖因子をそれぞれ凍結状態で添付
- KGM-Gold™ により栄養分に富む培地を提供し、すべての Clonetics™ NHEK (正常ヒト上皮ケラチノサイト) を増殖可能

KGM™-2 BulletKit™ 培地

- 培地内でヒトのケラチノサイトの初代細胞増殖をサポート
- 増殖に必要な基本培地と添加因子を含む

KGM™-CD BulletKit™ 培地

- 培養時にヒトのケラチノサイト初代細胞の単離と増殖をサポート
- 既知組成 - 血清および動植物由来の抽出物は不含
- 動植物由来の成分による影響が原因となる実験結果の誤差を最小化
- 明確で正確な結果を短時間で獲得

カタログ番号	製品名	内容
00192060	KGM-Gold™ BulletKit™	ケラチノサイト増殖培地 BulletKit™
00192151	KGM-Gold™ 基本培地	ケラチノサイト基本培地, 500 ml
00192152	KGM-Gold™ SingleQuotes™ キット	ケラチノサイト増殖培地 SingleQuotes™ ヒドロコルチゾン, 0.5ml, トランスフェリン, 0.5ml, エピネフリン, 0.25ml, GA-1000, 0.5ml, BPE, 2.0ml, hEGF, 0.5ml, インスリン, 0.5ml
00195769	KGM-Gold™ BulletKit™ Ca ⁺⁺ 不含	ケラチノサイト増殖培地 カルシウムフリー BulletKit™
00195130	KGM-Gold™ 基本培地 Ca ⁺⁺ 不含	ケラチノサイト基本培地 - カルシウムフリー
00192152	KGM-Gold™ SingleQuotes™ キット	ケラチノサイト増殖培地 SingleQuotes™ ヒドロコルチゾン, 0.5ml, トランスフェリン, 0.5ml, エピネフリン, 0.25ml, GA-1000, 0.5ml, BPE, 2.0ml, hEGF, 0.5ml, インスリン, 0.5ml
CC-3107	KGM™-2 BulletKit™	ケラチノサイト増殖培地-2 BulletKit™, 無血清
CC-3103	KGM™-2 基本培地-2	ケラチノサイト基本培地-2
CC-4152	KGM™-2 SingleQuotes™ キット	添加により KBM™-2 を KGM™-2 として使用可能 BPE, 2 ml; hEGF, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3108	KGM™-2 Ca ⁺⁺ 不含 BulletKit™	ケラチノサイト増殖培地 - 無血清, 非動物由来成分
CC-3158	KBM™-2 Ca ⁺⁺ 不含	ケラチノサイト基本培地-2, カルシウムフリー, 無血清
CC-4152	KGM™-2 SingleQuotes™ キット	添加により KBM™-2 を KGM™-2 として使用可能 BPE, 2 ml; hEGF, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-4455	KGM™-CD BulletKit™	ケラチノサイト増殖培地 - 無血清, 非動物由来成分
CC-3255	KBM™-CD 基本培地	ケラチノサイト基本培地 - 既知組成
CC-4456	KGM™-CD SingleQuotes™ キット	添加により KBM™-CD を KGM™-CD として使用可能 リコンビナントヒトインスリン 1 ml; 増殖添加因子, 5 ml

乳腺上皮細胞培地, 無血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-3150	MEGM™ BulletKit™	乳腺上皮細胞増殖培地 BulletKit™, 無血清
CC-3151	MEBM™ 基本培地	乳腺上皮細胞基本培地, 無血清
CC-4136	MEGM™ SingleQuotes™ キット	添加により MEBM™ を MEGM™ として使用可能 BPE, 2 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; hEGF, アスコルビン酸, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3051	MEGM™ 完全培地	乳腺上皮細胞増殖培地, 無血清, 完全培地
CC-3153	MEBM™-PF free	乳腺上皮細胞基本培地 フェノールレッドフリー, 無血清
CC-3152	MEBM™-Bicarb free	乳腺上皮細胞基本培地 炭酸水素ナトリウムフリー, 無血清

メラノサイト培地, 無血清

Clonetics™ メラノサイト培地は正常なヒトのメラノサイトの初代細胞の培養における成長と増殖のために最適化されています。この培地システムは、既存の培地システムと比較して、優れた結果をもたらすことが示されています。メラノサイトは培養時、Lドーパからドーパ-メラニンへの変換によって、90%以上の機能を維持します。メラノサイト培地システムではまた、低温保存からの復元後や連続継代培養全体を通じて、正常な形態と増殖能力の維持を可能とします。

MGM™-4 BulletKit™

- メラノサイト増殖培地は NHEM と共に認定、試験済みで最適な性能を提供
- 培地システムは BulletKit™ (基本培地と個別に梱包された増殖因子) として提供されるため研究プロジェクトに柔軟に対応可能
- 成人メラノサイトには Et-3 (CC-4510) の添加が必要 (別売)

カタログ番号	製品名	内容
CC-3249	MGM™ BulletKit™	メラノサイト増殖培地
CC-3250	MBM™-4基本培地-4	メラノサイト基本培地, 無血清
CC-4435	MGM™-4 SingleQuotes™ キット	添加により MBM™-4 を MGM™-4 として使用可能 CaCl ₂ , 1.0 ml; hFGF-B, 1.0 ml; PMA, 0.5 ml; rhインスリン, 1.0 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; BPE, 2.0 ml; FBS, 2.5 ml; ゲンタマイシン/アンホテリシン B, 0.5 ml

神経細胞培地, 低血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-3186	AGM™ BulletKit™	アストロサイト増殖培地 BulletKit™, 3.0% FBS 含む
CC-3187	ABM™ 基本培地	アストロサイト基本培地, 無血清, L-グルタミン含まない
CC-4123	AGM™ SingleQuotes™ キット	添加により ABM™ を AGM™ として使用可能 インスリン, 1.25 ml; rhEGF, 0.5 ml; FBS, 15.0 ml; アスコルビン酸, 0.5 ml; L-グルタミン, 5.0 ml; GA-1000, 0.5 ml

前立腺上皮細胞培地, 無血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-3166	PrEGM™ BulletKit™	前立腺上皮細胞増殖培地 BulletKit™, 無血清
CC-3165	PrEBM™ 基本培地	前立腺上皮細胞基本培地, 無血清
		添加により PrEBM™ を PrEGM™ として使用可能
CC-4177	PrEGM™ SingleQuotes™ キット	BPE, 2.0 ml; ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; hEGF, 0.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; レチノール酸, 0.5 ml; トリヨードチロニン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml

ラット心筋細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
CC-4515	RCGM BulletKit™	ラット心筋細胞増殖培地 BulletKit™
CC-3275	RCBM 基本培地	ラット心筋細胞増殖培地
		添加により RCBM を RCGM 増殖培地として使用可能
CC-4516	RCGM SingleQuotes™ キット	馬血清 15ml; FBS 15 ml, GA-1000, 0.2 ml

腎臓細胞培地, 低血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-3190	REGM™ BulletKit™	腎臓上皮細胞増殖培地 BulletKit™, 0.5% FBS 含む
CC-3191	REBM™ 基本培地	腎臓上皮細胞基本培地, 無血清
		添加により REBM™ を REGM™ として使用可能
CC-4127	REGM™ SingleQuotes™ キット	ヒドロコルチゾン, 0.5 ml; hEGF, 0.5 ml; FBS, 2.5 ml; エピネフリン, 0.5 ml; トリヨードチロニン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3146	MsGM™ BulletKit™	メサンギウム細胞増殖培地 BulletKit™, 5% FBS 含む
CC-3147	MsBM™ 基本培地	メサンギウム細胞基本培地, 無血清
		添加により MsBM™ を MsGM™ として使用可能
CC-4146	MsGM™ SingleQuotes™ キット	FBS, 25 ml; GA-1000, 0.5 ml

網膜色素上皮細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
00195409	RtEGM™ BulletKit™	網膜色素上皮細胞培地 BulletKit™
00195406	RtEBM™ 基本培地	網膜色素上皮細胞基本培地
		添加により RtEBM™ を RtEGM™ として使用可能
00195407	RtEGM™ SingleQuotes™ キット	L-グルタミン, 4 ml; FBS, 4 ml; bFGF, 1 ml; GA-1000, 0.5 ml

初代神経細胞増殖培地, 無血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-4461	PNGM™ BulletKit™	初代神経細胞増殖培地 BulletKit™
CC-3256	PNBM™基本培地	初代神経細胞基本培地
CC-4462	PNGM™ SingleQuots™ キット	添加によりPNBMをPNGM™として使用可能 NSF-1, 4 ml; L-グルタミン, 2 ml; GA-1000, 0.2 ml
CC-4512	PNGM™-A BulletKit™	初代神経細胞増殖培地-成人 [CC-3256, CC-4462およびCC-4511含む]
CC-3256	PNBM™基本培地	初代神経細胞基本培地
CC-4511	PNGM™-A SingleQuots™キット	添加によりPNGMをPNGM™-成人として使用可能 OA, 0.5 ml; PA, 1.5 ml
CC-4462	PNGM™ SingleQuots™ キット	添加によりPNBMをPNGM™として使用可能 NSF-1, 4 ml; L-グルタミン, 2 ml; GA-1000, 0.2 ml

ヒト間葉系幹細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
PT-3001	MSCGM™ BulletKit™	間葉系幹細胞増殖培地 BulletKit™
PT-3238	MSCGM™ 基本培地	間葉系幹細胞基本培地
PT-4105	MSCGM™ SingleQuots™ キット	添加により MSCBM を MSCGM™ 増殖培地として使用可能 MCGS, 50 ml; L-グルタミン, 10 ml; GA-1000, 0.5 ml
PT-3002	hMSC 分化キット – 骨芽細胞	間葉系幹細胞分化キット – 骨芽細胞
PT-3924	hMSCBM – 骨芽細胞基本培地	間葉系幹細胞基本培地 – 骨芽細胞
PT-4120	hMSC SingleQuots™ キット – 骨芽細胞	添加により骨芽細胞基本培地を骨芽細胞分化用培地として使用可能 デキサメタゾン, 1 ml; β-グリセロリン酸, 2 ml; アスコルビン酸, 1 ml; ペニシリンストレプトマイシン, 2 ml; MCGS, 20 ml; L-グルタミン, 4 ml
PT-3003	hMSC 分化キット – 軟骨細胞	間葉系幹細胞分化キット – 軟骨細胞
PT-3925	hMSCBM – 軟骨細胞基本培地	間葉系幹細胞基本培地 – 軟骨細胞
PT-4121	hMSC SingleQuots™ キット – 軟骨細胞	添加により軟骨細胞基本培地を軟骨細胞分化用培地として使用可能 ITS+, 2 ml; ビルビン酸ナトリウム, 2 ml; プロリン, 2 ml; デキサメタゾン, 1 ml; アスコルビン酸, 2 ml; GA-1000, 0.2 ml; L-グルタミン, 4 ml
PT-4124	TGF-β3	必要成分 (別売)
PT-3004	hMSC 分化キット – 脂肪細胞	間葉系幹細胞分化キット – 脂肪細胞
PT-3102A	hMSC 脂肪細胞メンテナンス培地	間葉系幹細胞メンテナンス培地 – 脂肪細胞
PT-3102B	hMSC 脂肪細胞誘導培地	間葉系幹細胞誘導培地 – 脂肪細胞
PT-4122	hMSC メンテナンス SingleQuots™ キット – 脂肪細胞	添加により脂肪細胞メンテナンス培地を脂肪細胞分化用培地として使用可能 rh インスリン, 2 ml; GA-1000, 0.2 ml; MCGS, 20 ml; L-グルタミン, 4 ml
PT-4135	hMSC 誘導 SingleQuots™ キット – 脂肪細胞	添加により脂肪細胞メンテナンス培地を脂肪細胞分化用培地として使用可能 インドメタシン, 0.4 ml; IBMX, 0.2 ml; rh インスリン, 2 ml; デキサメタゾン, 1 ml; GA-1000, 0.2 ml; MCGS, 20 ml; L-グルタミン, 4 ml
00190632	MSCGM™ CD BulletKit™	間葉系幹細胞培地BulletKit™, 無血清, Xeno-フリー
00190620	MSCBM™ CD Basal Medium	間葉系幹細胞培地-既知組成
00192125	MSCGM™ CD SingleQuots™ Kit	添加により MSCBM™ CD を MSCGM™ CD として使用可能 添加因子5.0ml

ラット間葉系幹細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
00192853	Rat MSC 増殖培地 BulletKit™	ラット間葉系幹細胞増殖培地 BulletKit™
PT-3238	MSCGM™ 基本培地	間葉系幹細胞基本培地
00192820	R-MSCGM™ SingleQuots™ キット	添加により MSCBM をラット MSC 増殖培地として使用可能 FBS, 50 ml; rh インスリン, 2 ml; L-グルタミン, 10 ml; GA-1000, 0.5 ml
00192855	rMSC 分化キット – 脂肪細胞	ラット間葉系幹細胞分化キット – 脂肪細胞
PT-3102A	MSC 脂肪細胞メンテナンス培地	間葉系幹細胞メンテナンス培地 – 脂肪細胞
PT-3102B	MSC 脂肪細胞誘導培地	間葉系幹細胞誘導培地 – 脂肪細胞
00192828	rMSC メンテナンス SingleQuots™ キット – 脂肪細胞	添加により脂肪細胞 メンテナンス培地を脂肪細胞分化用培地として使用可能 rh インスリン, 2 ml; GA-1000, 0.2 ml; FBS, 20 ml; L-グルタミン, 4 ml
00192827	hMSC 誘導 SingleQuots™ キット – 脂肪細胞	添加により脂肪細胞 メンテナンス培地を脂肪細胞分化用培地として使用可能 インドメタシン, 0.4 ml; IBMX, 0.2 ml; rh インスリン, 2 ml; デキサメタゾン, 1 ml; GA-1000, 0.2 ml; FBS, 20 ml; L-グルタミン, 4 ml

ヒト脂肪細胞由来幹細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
PT-4505	ADSC-GM BulletKit™	脂肪細胞由来幹細胞増殖培地 BulletKit™
PT-3273	ADSC 基本培地	脂肪細胞由来幹細胞基本培地
PT-4503	ADSC-GM SingleQuots™ キット	添加により ADSCBM を ADSC 増殖培地として使用可能 FBS, 50 ml; L-グルタミン, 5 ml; GA-1000, 0.5 ml

造血前駆細胞増殖培地

カタログ番号	製品名	内容
PT-8002	PGM™-2 BulletKit™	造血前駆細胞増殖培地-2 BulletKit™
PT-8202	PBM™-2 基本培地-2	造血前駆細胞基本培地-2
PT-9502	PGM™-2 SingleQuots™ キット	添加により PBM™-2 を PGM™-2 として使用可能 FBS (10%), 50 ml; L-グルタミン, 5 ml; GA-1000, 0.2 ml, 5 ml; rh インスリン, 2 ml; デキサメタゾン, 0.2 ml; インドメタシン, 0.4 ml; IBMX, 0.2 ml

破骨細胞増殖培地

カタログ番号	製品名	内容
PT-8001	破骨細胞増殖培地 BulletKit™	破骨細胞増殖培地 BulletKit™
PT-8201	OPBM 基本培地	破骨細胞基本培地
PT-9501	破骨細胞増殖培地 SingleQuots™ キット	添加により OPBM を破骨細胞増殖培地として使用可能 FBS (10%), 10 ml; L-グルタミン, 1 ml; ペニシリン/ストレプトマイシン, 1 ml; M-CSF, 0.1 ml; 可溶性 RANK リガンド, 2 µg

神経前駆細胞増殖培地

カタログ番号	製品名	内容
CC-3209	NPMM™ BulletKit™	神経前駆細胞メンテナンス培地 BulletKit™
CC-3210	NPBM™ 基本培地	神経前駆細胞基本培地
CC-4242	NPDM™ SingleQuotes™ キット	添加により NPBM™ を NPMM™ (分化用) として使用可能 NSF-1, 4 ml; GA-1000, 0.4 ml
CC-4241	NPMM™ SingleQuotes™ キット	添加により NPBM™ を NPMM™ (メンテナンス用) として使用可能 rhEGF, 0.4 ml; rhFGF, 0.4 ml
CC-3229	NPDM™ BulletKit™	神経前駆細胞分化用培地 BulletKit™
CC-3210	NPBM™ 基本培地	神経前駆細胞基本培地
CC-4242	NPDM™ SingleQuotes™ キット	添加により NPBM™ を NPDM™ (分化用) として使用可能 NSF-1, 4 ml; GA-1000, 0.4 ml

骨格筋細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
CC-3207	OGM™ BulletKit™	骨芽細胞増殖培地 BulletKit™, 10% FBS 含む
CC-3208	OBM™ 基本培地	骨芽細胞基本培地, 無血清
CC-4193	OGM™ SingleQuotes™ キット	添加により OBM™ を OGM™ として使用可能 FBS, 50 ml; アスコルビン酸, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-4194	OGM™ 分化用 SingleQuotes™ キット	骨芽細胞分化・骨石灰化誘導 ヒドロコルチゾン-21-ヘミコハク酸, 0.5 ml; β-グリセロリン酸, 5.0 ml
CC-3216	CGM™ BulletKit™	軟骨細胞増殖培地 BulletKit™
CC-3217	CBM™ 基本培地	軟骨細胞基本培地
CC-4409	CGM™ SingleQuotes™ キット	添加により CBM™ を CGM™ として使用可能 R3-IGF-1, 1.0 ml; bFGF, 2.5 ml; インスリン, 1.0 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; FBS, 25 ml
CC-3225	CDM™ BulletKit™	軟骨細胞分化用培地 BulletKit™, 無血清
CC-3226	CDM™ 基本培地	軟骨細胞分化用基本培地
CC-4408	CDM™ SingleQuotes® Kit	添加により CDM™ 基本培地を CDM™ 分化用培地として使用可能 TGF-β, 1.25 ml; R3-IGF-1, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; トランスフェリン, 0.5 ml; FBS, 12.5 ml; GA-1000, 0.25 ml

骨格筋細胞培地, 低血清

カタログ番号	製品名	内容
CC-3160	SkGM™ BulletKit™	骨格筋細胞増殖培地 BulletKit™, 無血清
CC-3161	SkBM™ 基本培地	骨格筋細胞基本培地, 無血清
CC-4139	SkGM™ SingleQuotes™ キット	添加により SkBM™ を SkGM™ として使用可能 hEGF, 0.5 ml; インスリン, 5 ml; BSA, 5 ml; フェチュイン, 5 ml; デキサメタゾン, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml
CC-3245	SkGM™-2 BulletKit™	骨格筋芽細胞増殖培地-2 BulletKit™, 10% FBS 含む
CC-3246	SkBM™-2 基本培地-2	骨格筋芽細胞基本培地-2, 無血清; L-グルタミンなし
CC-3244	SkGM™-2 SingleQuotes™ キット	添加により SkBM™-2 を SkGM™-2 として使用可能 FBS, 50.0 ml; GA-1000, 0.5 ml; rhEGF, 0.5 ml; デキサメタゾン, 0.5 ml; L-グルタミン, 10.0 ml

平滑筋細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
CC-3182	SmGM™-2 BulletKit™	平滑筋細胞増殖培地-2 BulletKit™ 5% FBS 含む
CC-3181	SmBM™ 基本培地	平滑筋細胞基本培地, 無血清
CC-4149	SmGM™-2 SingleQuots™ キット	添加により SmBM™ を SmGM™-2として使用可能 hEGF, 0.5 ml; インスリン, 0.5 ml; hFGF-B, 1 ml; FBS, 25 ml; GA-1000, 0.5 ml

間質細胞培地

カタログ番号	製品名	内容
CC-3205	SCGM™ BulletKit™	間質細胞増殖培地 BulletKit™, 5% FBS 含む
CC-3204	SCBM™ 基本培地	間質細胞基本培地, フェノールレッド, 無血清含まない
CC-4181	SCGM™ SingleQuots™ キット	添加により SCBM™ を SCGM™ として使用可能 hFGF-B, 0.5 ml; インスリン 0.5 ml; FBS, 25 ml; GA-1000, 0.5 ml

初代細胞/方法

解凍 – 単核細胞および造血前駆細胞

1. 10% FBS または1% BSA を含む培地を温めます。単核細胞および造血前駆細胞には、DNase I (20 U/ml) も添加してください。*
2. 37°C の水槽で凍結細胞のバイアルを速やかに解凍します。70%のエタノールでバイアルの外側を清拭します。
3. 最大2 ml の細胞懸濁液を50 ml 円錐チューブに無菌的に移します。100万個以下の細胞に対しては、15 ml 円錐チューブを使用します。
4. バイアルを1 ml の培地ですすぎます。円錐チューブをゆっくりと回しながら、細胞にすすいだ培地を加えます(約1分)。
5. 培地を数滴追加する度に、総量が5 ml になるまで、チューブをゆっくり回しながら十分な量の滴を細胞に徐々に追加します(約3分)。
6. 培地を数滴追加する度に優しくチューブを回しながら、1~2 ml 量の培地滴を追加して、ゆっくりとチューブを満たします(約5~10分)。
7. 細胞懸濁液を室温で 200 x g で15分間遠心分離機にかけます。
8. ピペットで上清の大部分を慎重に除去し(2本目のチューブに保存して)、細胞塊がくずれないように少量だけ残します。残りの培地にある細胞塊を再度ゆっくりと懸濁します。50 ml チューブを使用している場合は、細胞を15 ml 円錐チューブに移して、50 ml チューブを 5 ml の培地ですすぎます。チューブをゆっくりと回しながら、洗浄液として使用した5 ml の培地を、細胞懸濁液に追加します。
9. 1~2 ml の量の培地を追加して、その度そっとチューブを回しながら、ゆっくりとチューブを満たします。
10. 細胞懸濁液を室温、200 x g で15分間遠心分離機にかけます。
11. 洗浄液として使用した培地 2 ml のみを残して、ピペットですべての中身を慎重に除去します。残りの培地 2 ml 内の細胞塊をゆっくりと再懸濁させ、細胞数をカウントします。細胞数が予想よりも少ない場合は、手順8で保存された洗浄用培地をより高速で遠心分離機にかけ、細胞数をカウントし、必要に応じて上記の細胞群に追加します。
12. 細胞を 37°C および 5% CO₂ 条件下で1時間静置します。2度目の細胞数カウントを行います。これで細胞を培養する準備が整いました。

* DNase を追加する場合は、10% FBS および20 U/ml の DNase I (Sigma D 4513) を含む20 ml の培地を調製してください。DNase を含む培地を使用して、上記のように細胞を希釈します。細胞を遠心分離機にかけ、手順8を繰り返します。

接着細胞型 – セットアップ

これらの手順は全ての細胞に適応されません。
下記にアクセスをお願いします。

 www.lonza.com/cellbioinstructions

詳細は個別の手順に従ってください。

1. フラスコ数を計算して準備します。凍結保存バイアルの正確な細胞数については、試験成績書を参照してください。この計算の調整方法については、377ページ「プラスチック容器における増殖面積」の表を参照してください。

以下の計算方法を使用して容器数を決定し、推奨播種密度として2,500細胞/cm²、3,500細胞/cm²または5,000細胞/cm²を設定します。

$$\frac{\text{細胞数} \times \text{生存率}}{\text{推奨播種密度}} = \text{最大播種面積 (cm}^2\text{)}$$

$$\frac{\text{最大播種面積 (cm}^2\text{)}}{\text{フラスコの増殖面積}} = \text{フラスコ数}$$

例:細胞数520,000で80%の生存率の HMVEC-L の凍結細胞の場合

$$\frac{520,000 \times 0.80}{5,000} = 83 \text{ cm}^2$$

T-25のフラスコで増殖面積が25 cm²の場合

$$\frac{83 \text{ cm}^2}{25 \text{ cm}^2} = \text{フラスコ3つ}$$

接着細胞型 – 細胞の解凍

推奨された量の培地をフラスコに無菌的に加え、5% CO₂、37°Cの培養器で少なくとも30分間平衡化します。

1. 解凍前にマイクロピペットを準備します。
2. 細胞入りの凍結保存バイアルを取り出します。開封前に、エタノールまたはイソプロパノールで凍結保存バイアルを拭きます。無菌環境内で、キャップを軽く4分の1回転して、内圧を緩和してから再度締め直します。完全には開封しないでください。
3. 凍結保存バイアルを持ち、その下部4分の3を37°Cの水槽に浸して、1~2分間ゆっくりと回しながら内容物を解凍します。凍結保存バイアルを注意深く観察してください。最後の氷片が溶けたら取り出します。また容器を完全に水槽に沈めないでください。細胞の解凍時間が2分以上の場合、最適な結果が得られない可能性があります。
4. 凍結保存バイアルを直ぐに取り出し、拭いて乾かします。その後無菌環境に移します。平衡化されたフラスコを準備します。70%のアルコールで凍結保存バイアルを洗浄し、余分なアルコールをふき取ります。

25 cm²の実質増殖領域をもつ T-25を使用する場合大きなフラスコとは対照的に、最初の冷凍保存バイアルからこの数の T-25 フラスコを用意する利点は、大多数の細胞を失うリスクを軽減することにあります。つまり、最初の T-25 フラスコのトリプシン処理に問題が生じた場合には、別の T-25 フラスコを使用できるということです。

2. 継代数、細胞型、ロット番号、日付を明記したラベルを各フラスコに貼ります。
3. 無菌環境で添加因子入り増殖培地のボトルを注意深く開封し、フラスコ表面5 cm²毎に1 ml の増殖培地を追加することにより、培地を新しい培養容器に無菌的に移します。
例:25 cm² フラスコに対して5 ml 増殖培地
4. 容器の通気口付きキャップを締めます。通気口付きキャップが使用されていない場合、キャップを一旦締めてから約半回転緩めます。培養容器を37°C、5% CO₂ 存在下で温めて平衡化し、培養器内で少なくとも30分間加湿します。

5. 解凍後の凍結保存バイアルの色に注目してください。理想的には、解凍後の凍結保存バイアルの色はピンクとなります。ピンクでない場合は、その色を記録し、播種が成功しない場合は技術サポートに報告してください。

注記:

- 2つ以上の冷凍保存バイアルを解凍する場合、1回に1本の凍結保存バイアルを解凍し、他の凍結保存バイアルは使用準備が整うまで液体窒素内に保管します。
- 凍結保存された細胞は非常に痛みやすくなっています。これらを解凍して復元する場合は可能な限り早く、最小限の手順で行ってください。
- 凍結細胞を取り扱う際は、保護眼鏡を着用してください。急速な温度変化によって液体窒素が飛び散るおそれがあります。
- 遠心分離を行って凍結細胞から懸濁液細胞を分離しないでください。これを行うと、培養中の DMSO 残余による影響よりも重大なダメージが起きます。
- 凍結細胞を直接、ガラススライド、チャンバースライド、グリッドプレートまたはマルチウェルプレート(6、12、24、96...) で解凍することは推奨されません。最適なパフォーマンスを得るには、凍結保存状態からの最初の播種を T-25 フラスコに対して行います。詳細な手順については、提供されている細胞培養手順書内のセットアップのセクションに記載された指示に従ってください。細胞特異的なプロトコルについては、技術サポートにお問い合わせください。

Cryopreserved Hepatocytes Protocol

このプロトコールは、浮遊型および接着型の肝細胞を解凍するための手順です。

以下すべてのプロトコールに目を通してからご使用してください。良い状態の肝臓細胞を調整するためには、以下手順に従って使用していただく事が大変重要です。

解凍手順

1. 製品の種類と用途に基づき、次の培地を37°Cの水浴中で温めます。

注記:肝細胞メンテナンス培地(MM250)、ヒト肝細胞播種培地(MP250)および動物融解・播種培地(MATP250)には、同梱のサプリメントを必ず添加してください。

- 1.1. ヒト 接着型 肝細胞:
MCHT50【ヒト肝細胞用 融解培地(単ドナー用)】
MP100【肝細胞 播種培地(接着用)セット】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.2. ヒト 浮遊型 肝細胞(単ドナー用):
MCHT50【ヒト肝細胞用 融解培地(単ドナー用)】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.3. ヒト 浮遊型 肝細胞(複数ドナー用):
MCHT50P【ヒト肝細胞用 融解培地(複数ドナー用)】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.4. 動物 浮遊型 肝細胞(げっ歯類除く):
MCAT250【動物肝細胞用 融解培地(げっ歯類除く)】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.5. 動物 接着型 肝細胞(げっ歯類除く):
MCAT250【動物肝細胞用 融解培地(げっ歯類除く)】
MP100【肝細胞 播種培地(接着用)セット】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.6. 動物(げっ歯類) 浮遊型 肝細胞:
MCRT【動物肝細胞用 融解培地(げっ歯類用)】、
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】
- 1.7. 動物(げっ歯類) 接着型 肝細胞:
MCRT【動物肝細胞用 融解培地(げっ歯類用)】、
MP100【肝細胞 播種培地(接着用)セット】
MM250【肝細胞メンテナンス培地セット】

注記:MP100【肝細胞 播種培地(接着用)セット】、MM250培地【肝細胞メンテナンス培地セット】は、同梱のサプリメントを必ず添加してください。

2. 指定の「融解培地」を加温後、外装の梱包容器70%エタノールで拭き取るか、スプレーして滅菌してからクリーンベンチへ移します。
3. 「凍結保存肝細胞」を保存容器(出荷用ドライシッパー、もしくは保存用液体窒素タンク)から速やかに取り出して、バイアルを温浴中で穏やかに溶解します。この時、できる限りバイアルは垂直にして、キャップが常に水面の上に位置するようにすることが重要です。
4. 凍結バイアルは、約2分以内に解凍してください。バイアルの内容物が溶解するにしたがって、外側から内側に向かって溶解するので紡錘状の氷が小さくなる様子を確認できるようにしましょう。
5. 解凍後、バイアルの外装を滅菌してからクリーンベンチへ移します。肝細胞溶解液を解凍培地50 mLが入った遠心管へそのまま注ぎ入れるか、先端孔径が大きいピペットを使って移し入れます。すべての肝細胞を確実に回収するた

め、約1 mLの解凍培地を元の凍結バイアルにピペットで戻し入れ、残りの細胞も解凍培地50 mLが入った遠心管へ回収してください。

6. 細胞が入った50 mLの遠心管を2-3回穏やかに手で持ちながら転倒混和して、細胞と培地を混ぜ合わせます。
7. 細胞種ごとに表1のガイドラインに従って室温で遠心します。

表1: Spin Speed and Duration by Species

Species	Spin Speed [g]	Duration [min]
Human	100	8
Rodent	55	3
Dog and non-human primate	65	4

8. 遠心機から50 mL 遠心管を取り出し、滅菌してからクリーンベンチへ移し、静かに上澄み液だけを廃棄物ボトルへ注ぎ入れてください。
9. 総細胞数 1×10^6 個ごとに(分析証明書を参照)、約1 mLの「播種培地」(接着肝細胞用)または「メンテナンス培地」(浮遊肝細胞用)を加え、細胞ペレットと穏やかに混和します。

浮遊型肝細胞の手順

10. HepatoMeter またはトリパンブルー染色を用いて肝細胞の生存率および収量を求めます。(参照:トリパンブルー染色プロトコール:Cell Counting Protocol - Trypan Blue Exclusion Method)
11. 細胞を実験用途ごとに必要とする密度に調整するため、「メンテナンス培地」を加え再調整します(最も一般的な濃度は 1×10^6 個/mL)。
12. 37°Cインキュベーター内で、120 rpm のオービタルシェーカーで浮遊型肝細胞を10分間集積させます。これで肝細胞を使用する準備が完了です。

接着型肝細胞の手順

13. HepatoMeter またはトリパンブルー染色を用いて肝細胞の生存率および収量を求めます。(参照:トリパンブルー染色プロトコール:Cell Counting Protocol - Trypan Blue Exclusion Method)
14. 細胞を実験用途ごとに所定の細胞密度*に調整するため、以下の式を用いて細胞ストック溶液に加える「播種培地」の容量を求めます(*表2参照)。

生細胞の回収量 ÷ 所定の細胞密度* = 必要な総容量 (mL)

$$\frac{\text{細胞数}}{10^6 \text{個}} \div \text{細胞密度} \times 10^6 \text{個/mL} = \text{必要な総容量 (mL)}$$

必要な総容量 - 現在の容量 = 細胞ストックに加える量

$$\text{必要な総容量 (mL)} - \text{現在の容量 (mL)} = \text{細胞ストックに加える量 (mL)}$$

Cryopreserved Hepatocytes Protocol

続き

表2: Desired Cell Density by Species and Plate Format

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
	Cell Density [10^6 cells/mL]				
Human, Rat & Dog	0.9 – 1.1	0.8 – 1.0	0.7 – 0.9	0.6 – 0.8	0.9 – 1.1
Monkey	1.1 – 1.3	1.0 – 1.2	0.9 – 1.1	0.8 – 1.0	1.1 – 1.3
Mouse	0.5 – 0.7	0.4 – 0.6	0.3 – 0.5	0.2 – 0.4	0.5 – 0.7

15. 肝細胞をマルチウェルプレートへ分注します。各マルチプレートウェルごとの適切な容量と細胞数は、以下の表3および表4を参照してください。

注記:96ウェルプレートの場合、各ウェルにブランク播種培地50 μ Lを加えた後、細胞ストック50 μ Lを加えます。この方法によって、肝細胞を播種培地へ均等に分散させることが出来ます。

16. プレートを37°C/5% CO₂のインキュベーターに入れます。96ウェルを使用する場合を除き、プレート全体を上から手で押さえるようにつかみ、インキュベーターの棚の上で水平の状態のまま、プレートを前後左右に穏やかに動かして細胞を分散させます。

注記:96ウェルのプレートの場合、振らずに直接インキュベーターに置きます。4~6時間インキュベートします。

17. コラーゲン重層法を行う場合は、次のセクションに参ります。使用しない場合には、実験ガイドラインに従って加温した維持培地に交換、または使用用途ごとの適切な培地へ交換します。

18. 以下の表5に従って維持培地を毎日交換します。

表3: Cell Volume Per Well

Plate Format	Cell Volume Per Well (mL/well) – All Species
6-well	2.0 mL/well
12-well	1.0 mL/well
24-well	0.50 mL/well
48-well	0.20 mL/well
96-well	0.050 mL blank media/well + 0.050 mL/well

表4: Approximate Number of Cells Per Well

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
	Approximate Number of Cells Per Well				
Human, Rat, Dog	2.0×10^6	0.9×10^6	0.4×10^6	0.175×10^6	0.050×10^6
Monkey	2.4×10^6	1.1×10^6	0.5×10^6	0.225×10^6	0.060×10^6
Mouse	1.2×10^6	0.5×10^6	0.2×10^6	0.075×10^6	0.030×10^6

表5: Maintenance Medium Volume Per Well

Plate Format	Media Volume Per Well (mL/well) – All Species
6-well	2.0 mL/well
12-well	1.0 mL/well
24-well	0.50 mL/well
48-well	0.20 mL/well
96-well	0.10 mL/well

マトリクス重層法

19. 重層用のコラーゲン溶液、およびその希釈に用いる維持培地は、4°C以下に保っておいてください。調製中はすべてのものを氷上で保冷し、静置しておいてください。

20. プレートへ入れる「メンテナンス培地」の容量を計算します。一般的な容量は、プレート当たり12 mLですが、重層溶液を余剰させる目的で、2-3 mL 多目に加えるようにしてください。

$$\frac{(\text{必要な培地容量} \times 0.3 \text{ mg/mL}) \div \text{重層マトリクス濃度}}{=} = \text{加える重層マトリクスの容量}$$

$$\text{_____ mL} \times 0.3 \text{ mg/mL} \div \text{_____ mg/mL} = \text{_____ mL}$$

21. 重層用コラーゲン溶液のタンパク質濃度を、製品添付の規格シートで確認しておいてください。以下の式を用いて「メンテナンス培地」に加える重層用コラーゲン溶液の容量を計算します。重層マトリクスの推奨終濃度は、0.25 mg/mL~0.35 mg/mLです。

22. 計算した量の重層マトリクスを氷上にある低温の「メンテナンス培地」に加えます。ピペッティングを数回行って十分に混合します。

23. 表3および表4で示す、ウェルあたりの容量、および細胞数に従って、接着型肝細胞に対して重層マトリクス溶液を重層します。

24. 少なくとも2時間以上インキュベートしてから使用してください。「メンテナンス培地」は毎日交換してください。

接着細胞型 – 播種

内部を指でさわらないようにキャップを取り外す。

- 1,000 μl のマイクロピペットを800 μl に設定して使用し、先端を凍結保存バイアルに入れて、優しく、ゆっくりと、一定のリズムでピペットを最大5回上下させながら、細胞を再懸濁します。再懸濁は急いで行わないでください。ピペットの先端をバイアルの下部近くに保ち、気泡の発生を防いでください。
- 〔細胞バイアルの推奨播種密度と数〕[355ページ参照]で指定されている通り細胞を同量ずつ、事前に準備しておいたフラスコに移します。4つの T-25フラスコを準備した場合は、マイクロピペットを250 μl に設定して移してください。8つの T-25フラスコを準備した場合は、マイクロピペットを125 μl に設定して移してください。
注記:凍結保存バイアルの全量を1つの T-25フラスコに使用しないでください。
- キャップまたはカバーを取り外し、容器をそっと振り、細胞を均等に分散させます。ガス交換を行う必要がある場合は、キャップを緩めます。
- 培養容器を、5% CO_2 の37°Cの培養器に戻します。容器を棚に平らに並べ、接着する細胞の表面積が最大になるようにします。細胞はフラスコ底部に堆積します。

播種後

細胞は急速な温度変化や栄養の欠乏した培地に耐性がありません。温めた新鮮な増殖培地で増殖を行うことによって、問題を回避できます(必要な分量だけ温めるようにしてください)。週末や休日の間も、以下に従って細胞の確認と培地追加を行ってください。

- 播種後は2日毎に増殖培地を交換してください(残余DMSO および未接着の細胞を取り除くため)。ただし毎日状態をチェックしてください。

注記:培地の交換を行うには、細胞が接着しているフラスコの反対面で滅菌ピペットによる吸入を行い、培地を除去する必要があります。その後、温かい新しい培地を追加します。

- 培養に成功し回収された細胞は以下のようなものとなります。
 - 2.1. 透明の非顆粒細胞質をもつ細胞
 - 2.2. 2日目以降に多数の分裂核
- 細胞がコンフルエントな状態になったら、より多い分量の培地を追加します。ガイドラインとして以下を参照してください。

細胞の状態:	指定の培地分量:
25%コンフルエント未満...	5 cm^2 につき1 ml
25~45%コンフルエント...	5 cm^2 につき1.5 ml
45%コンフルエント超...	5 cm^2 につき2 ml

- 60~90%コンフルエントな状態になるまで細胞への培地追加を続けます。特定の細胞型がコンフルエントになり過ぎた場合(表皮細胞など)、3日以上コンフルエントな状態を保つ場合、不可逆的な接触阻止が発生し、フラスコから剥離する、またはトリプシン処理が難しくなる、あるいはその両方が生じる可能性があります。

接着細胞型 – 増殖

- 培養細胞を顕微鏡検査し、輸送中の損傷(剥離、ラウンドアップまたは異常な形態)がないかを確認します。相対細胞密度を確認し、コンフルエンスを%で予測します。受領時、培養細胞の密度は30~100%となっているはずですが、いくつかの細胞が剥離している場合がありますが、これは正常です。細胞が大きく損傷を受けているように見える場合は、直ぐに技術サポートに電話でご連絡ください。
- 70%エタノールまたはイソプロパノールで拭き取り、細胞培養フラスコまたはマルチウェルプレートの外部表面を滅菌します。
- 密封したフラスコまたはマルチウェルプレートを37°C、5% CO_2 の条件で3~4時間インキュベートし、平衡化します。
- 適量の増殖培地を滅菌容器で37°Cまで温めます。ボトル全体を温めると培地の有効期限が短くなる可能性があります。温流水またはその他温度制御不能な方法で培地を温めないでください。電子レンジは使用しないでください。
- 無菌環境で注意深く細胞培養フラスコまたはマルチウェルプレートを開封し、培地を除去して、温かい、新鮮な培地と交換します。微生物による汚染を防ぐため、容器の首まわりやキャップ内にある培地を無菌的に取り除いてください。
- 通気口のないキャップのついたフラスコを使用している場合は、キャップをゆるめ、フラスコを5% CO_2 の37°Cの加湿培養器内に最低24時間置きます。

接着細胞型 – 継代

継代培養試薬の保存方法

1. 継代培養試薬は滅菌フィルターをかけた後、発送されるまで-20℃で保管されます。
2. 継代培養試薬は輸送中に解凍する可能性があります。一度であれば再凍結が可能です。
3. 一旦解凍して再凍結した継代培養試薬は-20℃で有効期限まで保管できます。
4. 解凍後、トリプシン/EDTAの鮮度と活性を保つために、滅菌遠心分離用チューブに小分けして-20℃で再凍結できます。トリプシン/EDTAは有効期限まで凍結状態で保存できます。
5. 一旦4℃まで解凍された HEPES-BSS およびトリプシン中和液は、1ヶ月以内に使用するようお勧めします。

準備

以下は25 cm² フラスコを使用する場合の手順です。その他のサイズのフラスコでは、適宜全量を調節してください。

最初のフラスコを継代培養する準備

1. 60～90%コンフルエントで、全体に多くの分裂核を含む場合、細胞を継代培養します。
 2. 継代培養される25 cm²の細胞
 - a. 2 ml のトリプシン/EDTA を解凍し、室温に戻します。
 - b. 7～10 ml の HEPES 緩衝生理食塩溶液 (HEPES-BSS) を室温に戻します。
 - c. 4 ml のトリプシン中和液 (TNS) を室温に戻します。
 3. 4℃から増殖培地を取り出し、そのまま室温になるまで置きます。
 4. 新しい培養容器を用意します。
 - 4.1. 1～3本の T-75 フラスコを準備します。必要なフラスコ数は、細胞のコンフルエンスと総収量によって異なります。その後の継代培養に使用されるプラスチック容器と時間を節約するために、大きめのフラスコを使用できます。小さなフラスコを使用すれば、培養の多くを失うリスクを軽減できます。
 - 4.2. 前回と同様、各フラスコには継代数、ロット番号、細胞型、日付を明記したラベルを貼ります。
 - 4.3. 無菌環境で、注意深くボトルを開封し、フラスコの表面5 cm² 毎に1 ml の増殖培地を追加し、新しい培養容器に増殖培地を移します。
- 例:** 75 cm² のフラスコ15 ml の増殖培地
- 4.4. 通気口付きキャップを使用していない場合は、フラスコのキャップを緩めてください。新しい培養容器を、5% CO₂、37℃の加湿培養器に入れ、少なくとも30分間平衡化します。一度に継代培養するのは1つのフラスコのみに行ってください。最初のフラスコの後のすべてのフラスコは、本プロトコルのうちの最適なもの(本手順の後半で説明されます)に従って継代培養します。これは計算された細胞数、生細胞率、播種密度に基づいています。

注記: Clonetics™ トリプシン/EDTA のみを使用してください。他の販売業者のトリプシン/EDTA 濃度は、ロンザ製品の10倍に達する場合があります。これは Clonetics™ の細胞に悪影響を与えます。

無菌環境において:

(例として T-25 フラスコを使用。他のフラスコではその容量に比例して使用量を増やします)。

1. 培養容器から培地を吸引します。
2. 細胞を5 ml の室温の HEPES 緩衝生理食塩溶液 (HEPES-BSS) ですすぎます。この手順は必ず行ってください。培地にはトリプシンを中和する様々なタンパク質が含まれています。
3. フラスコから HEPES-BSS を吸引します。
4. 2 ml のトリプシン/EDTA 溶液で細胞を覆います。
5. キャップを締めて顕微鏡下でフラスコのモニターを始めます。
6. 顕微鏡で細胞層を継続的に確認します。
 - 6.1. 約90%の細胞がラウンドアップするまでトリプシン処理が継続するようにします。

注記: ラウンドアップされた細胞は球状で、滑らかな境界面をもち、屈折性があるか光沢を帯びています。細胞にフラスコに接着する突出した結節が存在する場合、トリプシン処理をさらに必要としています。このプロセス全体にかかる時間は細胞型によって異なりますが、概ね2～6分です。
 - 6.2. この時点で、手のひらでフラスコを軽く叩き、細胞の大部分が培養表面から剥がれ落ちるようにします。剥離した細胞がわずかしかない場合は、トリプシン処理の時間が足りなかった可能性があります。30秒待って、再度フラスコを軽く叩きます。細胞がまだ剥離しない場合、30秒待って軽く叩く動作を繰り返します。

注記: 強く叩くことによってすべての細胞を一度に剥離しようとししないでください。細胞を損傷させるおそれがあります。
7. 細胞を剥離後、4 ml の室温のトリプシン中和液でフラスコ内のトリプシンを中和します。細胞の大部分が7分以内に剥離しない場合、トリプシンが十分温められていないか、または細胞を剥離させるほど十分な活性がありません。上記のように培養容器から細胞を回収し、新鮮で温かいトリプシン/EDTA 溶液で再度トリプシン処理を行うか、またはトリプシン中和液ですすいでから新鮮で温かい培地を培養容器に追加後定温に戻し、新しいトリプシン処理試薬を利用できるようにします。
8. 剥離した細胞を滅菌15 ml 遠心分離用チューブにすばやく移します。
9. 2 ml の HEPES-BSS でフラスコの最終的なすすぎを行い、残余細胞を回収します。その後、すすぎに使用したこの液体を遠心分離用チューブに追加します。
10. 細胞の回収が行われたフラスコを顕微鏡下で観察し、残った細胞数を確認して細胞率を確認します。細胞の残存量は5%未満となるようにしてください。

接着細胞型 – 継代

続き

11. 回収した細胞を220 X g で遠心分離します。5分間の遠心で細胞を沈殿させます。

20.1. 100 µl~200 µl を除き、上清の大部分を吸引します。

20.2. 指で遠心分離用チューブを軽く叩き、沈殿物を懸濁させます。

12. 4 ml~5 ml の増殖培地で細胞を希釈し、希釈した細胞懸濁液の総量を記録します。

注記:取り扱っている細胞から最良の結果を取得するには、トリパンブルーで細胞収率や生細胞率を評価してください。

13. 血球板または細胞カウンターで細胞数をカウントし、総細胞数を計算します(上記の手順を参照)。後で使用するために、細胞の収量を記録します。

注記:細胞懸濁液は、最高精度で250,000~1,000,000細胞/ml とはならずです。

14. 必要に応じて、浮遊液を HEPES 緩衝生理食塩液(HEPES-BSS)で適切な「細胞/ml」に希釈し、細胞を再カウントしてください。

15. トリパンブルーを使用して生細胞率を評価します。

16. 以下の式を使用して、生細胞の総数を算出します。

細胞カウント総数×パーセント生存 = 総生細胞数

例:1,000,000細胞×60% = 600,000生細胞

17. 以下の式を使用して、細胞を播種するフラスコの総数を算出します。必要なフラスコ数は、細胞の収量や播種密度によって異なります。大きなフラスコを使用すれば、その後の継代培養で使用されるプラスチック容器や時間を節約できます。小さなフラスコを使用すれば、汚染が発生した場合に、培養の大部分を失うリスクを軽減できます。

推奨播種密度は、フラスコでは2,500細胞/cm²、3,500細胞/cm²または5,000細胞/cm²であり、ウェルプレートでは10,000細胞/cm²です。

$$\frac{\text{総生細胞数}}{\text{推奨接種密度} \times \text{フラスコサイズ}} = \text{総フラスコ数}$$

$$\frac{600,000 \text{ 生細胞}}{75 \text{ cm}^2 \times 2,500 \text{ 細胞/cm}^2} = \frac{\text{T-75 フラスコ 3つ (75 cm}^2 \times 2,500 \text{ 細胞/cm}^2 \text{ の端数が切り捨てられて最も近い整数になります)}}{}$$

18. 以下の式を使用して細胞懸濁液量を計算し、フラスコに播種します。

$$\frac{\text{希釈細胞懸濁液の総量}}{\text{手順26で指定されたフラスコ数}} = \text{播種量}$$

$$\frac{4.3 \text{ ml の希釈細胞懸濁液}}{\text{T-75 フラスコ 3つ}} = 1.43 \text{ ml / T-75 フラスコ}$$

19. 各フラスコに継代数、ロット番号、細胞型、日付を明記したラベルを貼って準備します。

20. 培地ボトルを慎重に開封し、フラスコ表面5 cm²毎に1 ml の増殖培地(1 ml / 5 cm²)を追加することによって、増殖培地を新しい培養容器に移します。

21. 75 cm² フラスコに対して15 ml の増殖培地

22. 5 ml のピペットで希釈細胞を攪拌して懸濁液を均一化した後、上記で計算された液量を、用意した継代培養用フラスコに移します。

23. 細胞を入れたフラスコを軽く振って、細胞が容器内にまんべんなく行き渡るようにします。

24. 通気口付きのキャップを使用していない場合は、フラスコのキャップを緩めてください。新しい培養容器を5% CO₂、37℃の加湿培養器に入れます。

96ウェルプレートへの継代

ヒト細胞の培養フラスコでは、トリプシン処理やその後のトリプシン阻害処理で細胞を回収します。細胞を遠心分離し、増殖培地で再懸濁させて、数をカウントします。その後適切な細胞数を、滅菌済み96ウェル組織培養プレートのウェルに追加します。細胞の接着と増殖が起こるよう、プレートを37°C、5% CO₂ 加湿培養器内で1~3日培養します。播種密度は実験要件によって多少異なります。マルチウェルプレートでは10,000細胞/cm² が理想的です。個別の情報については、使用する細胞型に関する『細胞培養手順シート』を参照してください。

 www.lonza.com/research

材料:

1. 60%~90%の細胞密度の正常ヒト細胞を増殖させた T-25 フラスコ
2. 96ウェル平底組織培養プレート
3. 5% CO₂ / 95%空気下、37°Cの加湿培養器
4. クリーンベンチまたはその他の滅菌環境
5. マルチチャンネル容量可変ピペット (8または12チャンネル) またはリピーティングピペット
6. マルチチャンネルピペットとセットで使用する滅菌容器

手順

1. 継代培養の準備と継代培養の手順に従います。その後以下の手順2~4に従ってください。
2. 細胞/ml の計算は ml 単位で行われるため、96ウェルプレートに播種を行う前に、細胞濃度を4倍に増やす必要があります (ウェル毎に250 µl の細胞懸濁液を追加する前に1:4の希釈割合に調整します)。細胞懸濁液を作成する際は細胞濃度を増殖培地で調整します。
3. 希釈細胞懸濁液を滅菌容器に移します。滅菌ピペットチップ用のマルチチャンネル (8または12チャンネル) ピペットを使用し、250 µl の希釈細胞懸濁液をラベルの貼られた96ウェル平底組織培養プレートの各ウェルに追加します。

注記:播種を行っている間は、1回おきに数回ピペットを上下させることによって頻りに細胞懸濁液を再懸濁させ、各ウェルに同数の細胞を分配するようにします。

4. 37°C / 5% CO₂ の状態で1~3日間プレートにカバーをかけた培養します (プレート端のウェルから培地が蒸発するため、3日間以上連続の培養は推奨されません)。

注記:96ウェルプレートの培養をバイオアッセイで使用する前に、細胞を顕微鏡下で分裂核の存在を観察し、細胞が活発な増殖を再開したことを確認します。

凍結保存のインストラクション

凍結保存によって、細胞の質と機能が損なわれる場合があります。凍結保存後の細胞の性能は保証できません。これらの手順は肝細胞、bMVEC-B、メラノサイト、マウスおよびラット神経細胞、ラット心臓細胞、および Poietics™ 細胞には適用されません。

手順

1. 細胞培養用定格の0.2ミクロンフィルターを使用し、凍結培地をフィルターにかけて滅菌します。
2. 細胞を回収して遠心分離機で沈降させます。
3. 低温の凍結保存液中で、約500,000~2,000,000細胞/mlの密度で細胞を再懸濁します。作業はすばやく行います。一旦 DMSO に曝されると細胞は非常に痛みやすくなります。
4. ピペット分取量(各 1 ml)を凍結保存バイアルまたはアンブルに入れ、密封します。
5. Styrofoam® またはプロパノール凍結保存キャニスターでそのピペットを絶縁します。
6. 細胞を-70℃で一晩保存します。
7. 12~24時間以内に長期保存用の液体窒素(-200℃)内に入れます。-70℃で長期保存を行うと細胞の品質が損なわれます。

Clonetics™ 細胞の推奨凍結保存溶液

Cell Type	Base Media	DMSO	FBS
General Clonetics™ Cell (see exceptions below)	80% Standard Growth Media	10% DMSO	10% FBS
Articular Chondrocytes (NHAC-kn)	80% CGM without FBS	10% DMSO	10% FBS
Melanocytes (NHEM)	60% MGM-4	10% DMSO	30% FBS
Osteoblasts (NH0st)	80% OGM without FBS	10% DMSO	10% FBS
Skeletal Muscle Cells (SkMC)	70% SkGM	10% DMSO	20% FBS
Skeletal Muscle Myoblasts (HSMM)	70% SkGM-2	10% DMSO	20% FBS

Poietics™ 細胞の推奨凍結保存溶液

Cell Type	Base Media	DMSO	FBS/HSA	Hydroxyethyl Starch
General Poietics™ Cell (see exceptions below)	86.5% IMDM	7.5% DMSO	4% HSA (w/v)*	2% Hydroxyethyl starch (w/v)**
Adipose Derived Stem Cells (ADSC)	90% ADSC-GM	10% DMSO	No FBS/HSA	No Hydroxyethyl starch
Human Dental Pulp Stem Cells (DPSC)	92.5% DPSC-GM	7.5% DMSO	No FBS/HSA	No Hydroxyethyl starch
Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC)	85% MSCBM	10% DMSO	5% HSA (w/v)*	No Hydroxyethyl starch
Preadipocytes (HPrAd)	80% EGM-2MV	10% DMSO	10% FBS	No Hydroxyethyl starch
Rat Mesenchymal Stem Cells (rMSC)	No Base Media	10% DMSO	90% FBS	No Hydroxyethyl starch

*If Human Serum Albumin (HSA) is not available, Bovine Serum Albumin (BSA) can be used at an equal w/v. If HSA and BSA are not available, Fetal Bovine Serum (FBS) may be used at 16% for General Poietics™ Cell or 20% for hMSC by reducing the amount of the base media appropriately.

**If Hydroxyethyl starch is not available, the component can be omitted by increasing the amount of IMDM to 88.5%

継代培養中に細胞の回収率と生存率を上げるには

いくつかの要因、または要因の組み合わせにより細胞数や生細胞率の低下が生じる可能性があります。細胞の収量または生細胞率に満足できない場合は、以下の情報を利用して、今後の培養の成功率を高めるようにしてください。

細胞の収率の改善

細胞の収率が悪い(50%未満)場合、以下の表を使用して原因と対策を特定してください。その後1つ以上のフラスコで継代培養を行い、適切な解決策を適用します。

状態	考えられる原因	改善策
Majority of cells did not detach	1. Inactive or cold Trypsin/EDTA	1. Use Trypsin/EDTA at room temperature
	2. Improper storage of Trypsin/EDTA	2. Store at -20°C until ready for use; thaw and allow it to come to room temperature briefly before subculturing
	3. Exposure time to Trypsin/EDTA was too short	3. Exposure time to Trypsin/EDTA is usually 5 – 6 minutes
	4. Trypsin/EDTA has been neutralized	4. Be sure to rinse the culture completely with HEPES-BSS before trypsinization
	5. Vessel was not rapped firmly	5. Use a moderate amount of force when rapping during trypsinization
Low yield, 95% of the cells detached but the yield was low	Culture was under confluent at trypsinization	Be sure to trypsinize at 60 – 90% confluence with numerous mitotic figures throughout the flask

細胞生存率の改善

生細胞率が低い(50%未満)場合、以下の表を使用して原因と対策を特定してください。その後1つ以上のフラスコで継代培養を行い、適切な解決策を適用します。

低生存率 (<50%)

状態	考えられる原因	改善策
Trypsin/EDTA damaged the cells	1. Used another vendor's Trypsin/EDTA	1. Use only Clonetics™ Trypsin
	2. Exposure time of the cells to Trypsin/EDTA was too long	2. Do not trypsinize longer than 7 minutes
	3. Trypsin/EDTA was used above room temperature. Trypsin becomes more active at temperatures above room temperature	3. Do not use even mildly heated Trypsin/EDTA
	4. Failed to neutralize the trypsin Prolonged exposure to trypsin will damage cells	4. Neutralize the Trypsin/EDTA with Trypsin Neutralizing Solution to eliminate cell damage due to trypsin
	5. Vessel was rapped too firmly during trypsinization. Rapping too hard to release cells causes cell membrane damage	5. Use moderate force when rapping flask to dislodge cells during trypsinization
Culture vessel was too confluent; was completely covered with cells	Culture was too confluent at trypsinization	Be sure to trypsinize at 60 – 90% confluence with about five mitotic figures per field of view
Cell growth slowed before 80% confluence and cells look dull and non-refractile	The most probable cause is failure to increase the volume of medium used as the cell confluency increased The cells become mildly starved and are not able to recover after trypsinization	Change medium and increase volume as recommended. Please observe all guidelines

カスタム細胞単離サービス

カスタマイズされた細胞ソリューションを提供するロンザの膨大な知識と経験をご活用ください。凍結保存、プレート、またはフラスコで培養中の状態で、様々な種類のヒトと動物の初代細胞を選択いただけます。組織取得や単離の失敗、低い細胞収率を回避して、時間とコストを節約しましょう。

品質と経験

細胞培養において高い専門性を誇るロンザは、ISO9001:2008 認証を受けた、カスタマイズされた細胞単離を行う研究所を有しています。ここには世界有数の細胞培養技術者が勤務しており、カスタマーごとの研究ニーズに合わせた多種多様な細胞型を提供しています。ロンザの細胞培養および細胞単離の分野で60年以上におよぶ経験をご活用ください。

■ ロンザは以下の製品およびサービスを提供しています。

- 指定に合わせた、カスタマイズされた専門的な細胞単離ソリューション
 - 豊富な品質検査と細胞特性評価を利用可能
 - 多彩な細胞型における長年の単離実績
 - カスタマイズ可能なフォーマット:凍結保存、プレートまたはフラスコ
 - 高度な細胞単離能力
- **重要な初代細胞の獲得が遅延すると、大きな代償が伴う可能性があります。ロンザのカスタマイズされた最上級の細胞単離をお試しください。**
 - ヒトおよび動物組織からの初代細胞の単離
 - 細胞増殖および試験
 - ドナー適合細胞のセット
 - 凍結保存または増殖の形態で入手可能
 - PCR などの QC および細胞特性評価サービス
 - 正確な注文処理を保証する個別のカスタマー相談
 - **ヒト, ラット, マウス, ブタ, ウシ, サル, その他多くの種からカスタムの初代細胞を受け付けています。これまで単離例には以下のようなものがあります。**
 - ウシ副腎腺毛細血管内皮細胞
 - ウシ胚腎臓細胞
 - ウシおよびブタ造血前駆細胞
 - イヌ臍帯静脈内皮細胞
 - ネコ虹彩平滑筋細胞
 - モルモット腎臓細胞
 - ヒト膀胱上皮細胞
 - ヒト気管支/気管上皮細胞 – 嚢胞性線維症患者
 - ヒト糖尿病患者 CD34⁺ 細胞
 - ヒト微小管網膜内皮細胞
 - ヒト小腸細胞
 - マウス皮膚線維芽細胞
 - ブタメサンギウム細胞

遺伝子導入

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

はじめに

細胞を遺伝子導入前に可能な限り最良の状態にするため、以下の推奨項目を確認してください。これらは製品プロトコルに置き換わるものではありませんが、実験を成功に導くのに有益なヒントとなります。

継代数

継代数の少ない細胞は一般的に継代数の多いものと比べて、遺伝子導入に良好な反応を示し、遺伝子導入効率と生存率が高くなります。効率的な遺伝子導入においては多くの場合、対数増殖段階にあり、(解凍時から)10~15代までの継代の細胞を使用するよう推奨されます。これは細胞株の中に、数多くの継代を経て分化し、その機能を変化させるものがあるためです。凍結保存された初代細胞または細胞株に遺伝子導入する場合は、遺伝子導入前に適切に増殖を開始するよう、少なくとも2世代継代したものを使用するよう推奨されます。凍結保存初代血球は、遺伝子導入前に少なくとも1~2時間は増殖培地で培養してください。

増殖条件

接着細胞 – 接着細胞の遺伝子導入では、通常細胞は70~85%の細胞コンフルエンスまで増殖します。遺伝子導入前の培養細胞コンフルエンスは重要です。推奨されているよりも高いコンフルエンス、または最大100%のコンフルエンスまで細胞の増殖が可能な場合、プロトコルに記載される以外の遺伝子導入結果が得られる場合があります。また実験に必要な細胞コンフルエンスが得られるよう、遺伝子導入の2~4日前に細胞を継代させるよう推奨されます。Nucleofection™ (157ページ参照)のようにエレクトロポレーションで接着細胞の遺伝子導入を行う場合、従来は細胞を培養容器から遊離させ、専用のキュベットに移す必要がありました。しかし、最新の革新技術である Nucleofector™ テクノロジーを使用することにより、いくつかの細胞型では接着した状態で遺伝子導入できるようになりました (159ページ参照)。

がん細胞および Nucleofection™ についての重要な注記: 固形腫瘍細胞の Nucleofection™ では、細胞の継代数が3未満の場合、初代細胞キットを使用できます。継代数が3以上の場合、細胞株用 Nucleofector™ キットの使用が推奨されます。白血病細胞のような浮遊細胞では、細胞の継代数が5未満の場合、初代細胞用 Nucleofector™ キットを使用できます。細胞の継代数が5以上の場合、細胞株用 Nucleofector™ キットの使用が推奨されます。

浮遊細胞 – 浮遊細胞は対数増殖期に入る時に遺伝子導入を行ってください。一般的に2~5×10⁵ 細胞/ml の密度に相当します。いくつかの細胞型の Nucleofection™ ではさらに高細胞密度が推奨されます。ご使用の細胞型については Amaxa™ 最適化プロトコルをご確認ください。実験に必要な密度を得るために細胞を遺伝子導入の2~4日前に継代します。

接着細胞および浮遊細胞の両方において、培養細胞が正しく増殖し、細胞が適切な形態学的特徴を維持しているか確認することが重要です。これらが正しく行われていない場合は、バクテリア、真菌、マイコプラズマなどの汚染の可能性があります。マイコプラズマは培養で増殖する細胞の一般的な汚染源であり、

5~35%の培養細胞が汚染されていることが研究で指摘されています。マイコプラズマ感染は、細胞機能や遺伝子発現に数多くの重大な変異をもたらす上に除去が難しく、従来の方法で検出することは困難です。20分間で完了する便利な蛍光マイコプラズマ検査 – MycoAlert™ マイコプラズマ検出キット(カタログNo.LT07-118、148ページ参照)の使用が推奨されます。マイコプラズマが検出された場合、細胞を廃棄するようお勧めします。細胞の交換が不可能な場合は、MycoZap™ マイコプラズマ除去試薬(カタログNo.LT07-818、150ページ参照)がゆるやかに効果的な選択肢となります。

 www.lonza.com/mycoplasma

細胞の回収

細胞を健康に保ちつつ、実験を成功に導くため、回収を行う際に細胞を適切に取り扱うことは極めて重要です。細胞回収前に単層を洗浄し、残余増殖培地だけでなくカルシウムやマグネシウムイオンも取り除きます。ほとんどの場合、カルシウムまたはマグネシウムを含まない PBS または HBSS を使用できます。他の洗浄液も同様に使用できますが、使用する細胞特性によって効果は異なります。例えば、0.5 mM~1 mM の EDTA 溶液またはトリプシン溶液で最初に洗浄すれば、複数の層を容易に剥離できる可能性があります。

浮遊状態で行う Nucleofection™ では、遺伝子導入を行う前に、培養容器から接着細胞を剥離する必要があります。細胞株では、0.05% (0.5 mg/ml) の濃度のトリプシンと、0.48 mM (0.2 mg/ml) の EDTA を、カルシウムとマグネシウムを含まない平衡塩類溶液で使用するよう推奨されます。

Clonetics™ 細胞のような初代細胞は、細胞株よりもさらに慎重に取り扱う必要があります。例えば、Clonetics™ ReagentPack™ (CC-5034、44ページを参照)の使用が推奨されます。この製品にはトリプシン溶液、HEPES 緩衝生理食塩水、トリプシン中和液が含まれています。その他の分解酵素も使用できます。ただし、繰り返しになりますが、効果は細胞の特性によって異なります。例えば、コラーゲンに富む培地には、コラーゲナーゼ分解が必要となる場合があります。個別の推奨項目については細胞の取扱業者者に確認してください。

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、44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。

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

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。

細胞の取扱い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。リボ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的な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 Xg です。90 Xg 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 Xg 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://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/infocentrif/nomocentrif.pdf

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。

 www.sciencegateway.org/tools/rotor.htm

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。

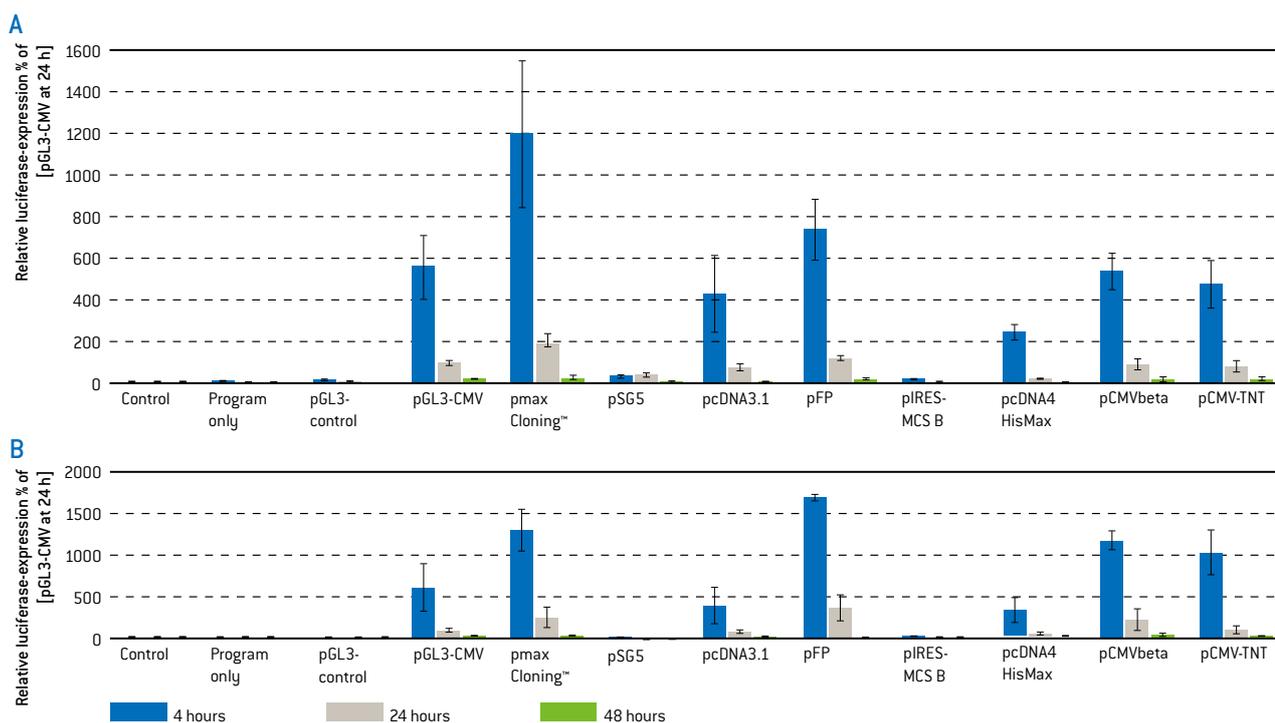


図1. Luciferase expression levels depend on vector backbones. We looked at luciferase expression at 4, 24 and 48 hours in THP-1 and HUVEC cells. The amount of DNA was held at equimolar amounts based on plasmid size. For THP-1, the DNA amount ranged from 0.3 – 0.5 µg per reaction [A]. For HUVECs, we used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

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

表 1: 細胞型別プロモーター強度

細胞株	細胞源	SV40	EF1a	RSV	CMV	参考文献
293	ヒト胚腎臓	5%		74%	100%	4, 6
BHK-21	ハムスター腎臓	200%		200%	100%	4
C6	ラット神経膠腫	44%			100%	5
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣	16%		11%	100%	2, 4, 5
Cos-7	アフリカミドリザル腎臓	7%	15%	7%	100%	1, 2, 4, 5, 8
HeLa	ヒト子宮頸がん	43%	73%	29%	100%	2, 3, 4, 5, 6, 8
N2A (Neuro-2A)	マウス神経芽腫	50%			100%	5
NIH-3T3	マウス線維芽細胞	67%	143%	107%	100%	2, 3, 7, 8

■ IRES プラスミド

IRES プラスミドによって、プロモーターは2つの遺伝子発現を惹起します。これらは複製される遺伝子(通常は上流遺伝子)と GFP タンパク質をコードするレポーター遺伝子(下流遺伝子)です。IRES プラスミドから発現する mRNA は2シストロン性のメッセージです。つまり、両遺伝子とも同じ mRNA 分子上に出現します。各遺伝子のコード mRNA は等量ずつ母集団に出現します。しかし、2つの遺伝子の翻訳開始効率は大きく異なっています。上流遺伝子の開始領域に対するリボソーム結合は非常に効率的ですが、IRESは 下流遺伝子のリボソーム結合と翻訳開始をしばしば著しく低レベルにします。下流遺伝子は通常 GFP であるため、GFP の発現レベルは、IRES 配列のないプラスミドと比較した場合は通常見られ

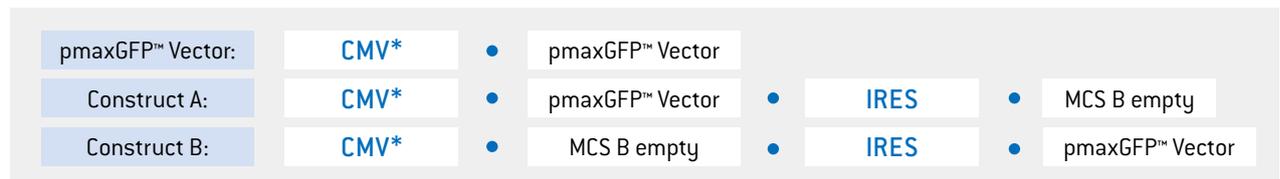
るよりも低くなります。目的のタンパク質と GFP は、両タンパク質の結合、2つの発現カセットを含むコンストラクト、または共遺伝子導入によって、等量ずつ取得できます。

ロンザは、IRES の多重クローニング部位(MCS)の上流(コンストラクト A)または IRES の下流(コンストラクト B、図2)いずれかで複製されたレポーター(GFP)を有する、pIRES 発現ベクター(Clontech)に着目しました。

図2B は、GFP が IRES の下流に位置する場合に GFP 発現が著しく減少することを示しています。この研究は GFP レポーター遺伝子について示されているものですが、ルシフェラーゼを用いても行われ、同様の結果が得られています。

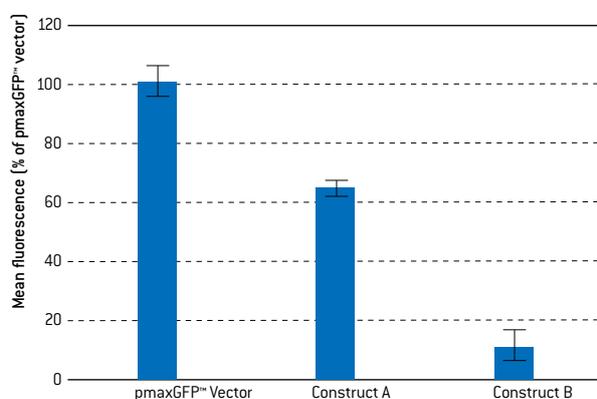
ご使用のプラスミドには IRES 配列が含まれていますか？

A



B

HL-60 における発現



HUVEC における発現

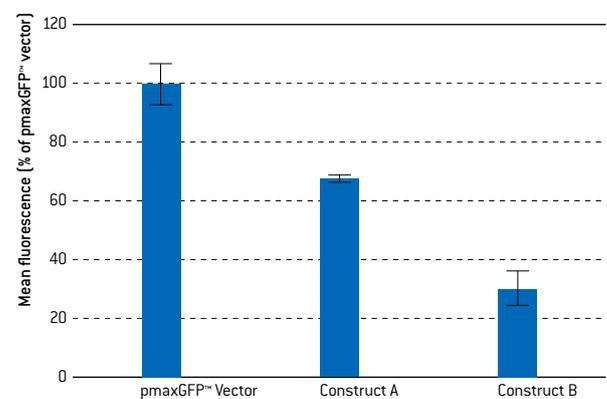


図2. Reporter gene expression is dependent on the position in an IRES expression vector. HL-60 and HUVEC cells were transfected by Nucleofection™ with either pmaxGFP™ Vector or pIRES variants containing maxGFP™ Reporter Protein cloned in either the Multiple Cloning Site (MCS) upstream (construct A) or downstream of the IRES sequence (construct B; 2A). Figure (2B) shows reduced GFP expression using IRES plasmids especially if GFP is located downstream of the IRES sequence.

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

その場合、どこで使用していますか？ 2シストロン性 mRNA の安定性は、挿入された遺伝子のいずれかによって影響される可能性があります。第一および第二遺伝子で発現されるタンパク質のレベルは特定できません。またこれによって、分析や解釈に問題が生じる可能性があります。結果的に、プラスミドの真の効率を使用するレポーターの低い発現レベルにより、過小評価される場合があります。IRES の下流にあるレポーター遺伝子については、高感度の検出方法を使用するようにしてください。

■ LTR (ウィルス性長末端反復)

発現プラスミドの中には、レトロウイルスの長末端反復配列 (LTR) から得られるプロモーターやエンハンサーを利用するものがあります。またこれらの発現プラスミドが特定の細胞に遺伝子導入される場合、複製される遺伝子の発現がその細胞によって抑制される可能性があります。抑制のメカニズムは完全には明らかになっていませんが、レトロウイルスの LTR に由来するプロモーターまたはエンハンサーを含むプラスミドが、初代細胞や特定の細胞株で十分に機能しない可能性は高いといえます。Nucleofection™ が初代細胞における唯一の効果的な方法であることも多いため、このような抑制効果が Nucleofection™ においてより頻繁に観察される場合があります。効果的な代替手段として挙げられるのは、研究対象の遺伝子を CMV (例: pmaxCloning™ Vector)、EF1a または SV-40 などの従来型プロモーターを使用する別の発現プラスミドに、再クローニングすることです。

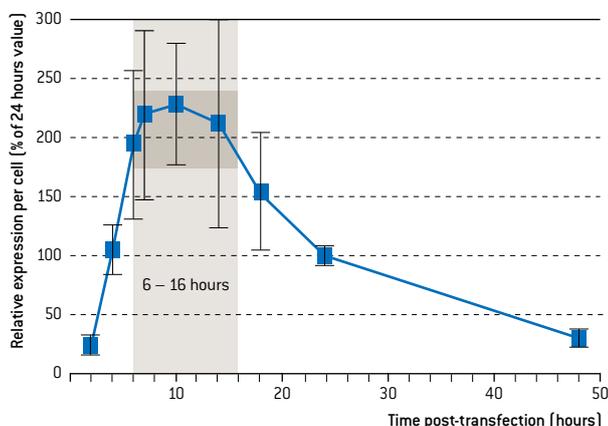
■ ベクターのサイズ

ロンザの研究所では、4~7 kb のプラスミドが日常的に使用されており、Nucleofection™ 可能なプラスミドは最大で約 20 kb に達する場合もあります。これより大きなプラスミドを使用すると遺伝子導入効率が低下する可能性が非常に高くなります。原則として、プラスミドが大きくなるほど細胞内への導入が難しくなります。これはエレクトロポレーションまたは脂質媒介型遺伝子導入の両方にあてはまります。それでもなお、Nucleofection™ を用いたいくつかの結果において、遺伝子導入効率は低いものの BAC ベクターでも同様に導入されることが示されています。^{9,10}

■ レポーター

どのような種類のレポーターを使用していますか？ 安全で再現性があり、定量的で、かつ感度が良好であることが必要です。使用するレポーターは、細胞によって内生的に高レベルで発現するものではなく、カスタマーの下流アッセイにおいて十分に機能するものを選択します。レポーターを変更する場合、または遺伝子導入方法を変更する場合、現行の遺伝子導入方法を用いたそのレポーターの発現動態を評価し、最適な時点で分析を行う必要があります。例えばルシフェラーゼは、遺伝子導入が Nucleofection™ (遺伝子導入後 6~16 時間で最大の発現) によってなされるか、または脂質媒介型遺伝子導入 (遺伝子導入後 24 時間で最大の発現) によってなされるかによって、大きく異なる発現カイネティクスをもちます。ロンザは、ルシフェラーゼの発現カイネティクスが遺伝子導入方法に関連しており、ベクターのバックボーンや使用される細胞型には関係しないことを発見しました。レポーターの発現動態は mRNA やタンパク質の安定性にも依存するため、ロンザは Nucleofection™ 後のルシフェラーゼの発現力

HUVEC におけるルシフェラーゼ発現のカイネティクス (タンパク質 / ウェル、24 時間の値 = 100%)



HUVEC における β -gal 発現のカイネティクス (タンパク質 / ウェル、24 時間の値 = 100%)

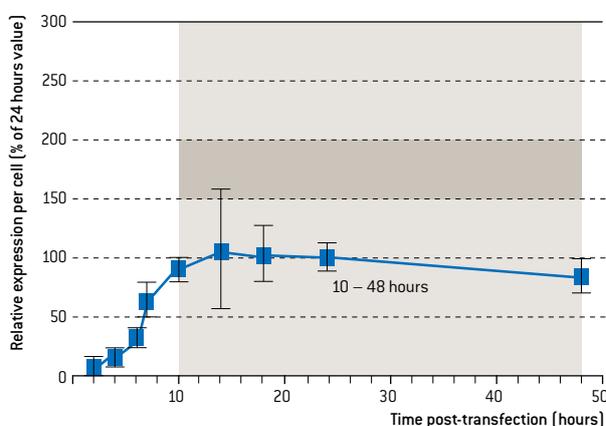


図3. Expression kinetics are reporter gene dependent. HUVEC cells were transfected by Nucleofection™ with either a luciferase or a β -gal expression vector. While luciferase expression shows a maximum 6 – 16 hours post-transfection, β -gal expression is sustained for several days after transfection.

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

イネティクスを、 β -gal と比較しました(図3)。これらのデータは、ルシフェラーゼベクターおよび β -gal ベクターを用いた、HUVEC 細胞の共遺伝子導入から取得したものです。

両レポーターとも、非常に高レベルでは過小評価される可能性があります。しかし、各レポーターの発現カイネティクスは大きく異なります。ルシフェラーゼは、遺伝子導入後16時間後に発現が非常に顕著に低下します。

しかし β -gal の発現は遺伝子導入の10時間後に最大に達し、その後一定に保たれます。例えば24時間といった1点を選択される場合、ルシフェラーゼの最大発現は観察されず、ベクターの導入効率も過小評価される可能性があります。

結論として、ロンザは Nucleofection™ の6~16時間後にルシフェラーゼ解析を行うようお勧めします。一方 β -gal または GFP の発現は、Nucleofection™ の10~48時間後が最適な解析のタイミングとなります。

■ 検出方法

検出方法はレポーターごとに規定されています。レポーターの中には、複数の方法で測定できるものがあります。例えば GFP は、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光プレートリーダーによる読み取りが可能です。定性的画像が1つ必要なだけなら、蛍光顕微鏡が費用対効果の高い選択肢となります。定量的データが必要な場合はフローサイトメーターまたは蛍光プレートリーダーによって、より正確なデータが得られます。

■ 融合ベクター vs. 共遺伝子導入

融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の折り畳みや安定性だけでなく、タンパク質の局在化、転写と翻訳にも依存します。

発現を改善するには、タンパク質が融合する末端を変更することが望ましい場合があります。融合ベクターの代わりに、共遺伝子導入を使用することもできます。

1つ目のプラスミドにはレポーター遺伝子(すなわち GFP)が含まれ、2つ目のプラスミドに発現する遺伝子が含まれます。プロモーターの強度やベクターの大きさに応じて2つのベクターの比率を最適化する必要があります。

■ 遺伝子産物におけるヘアピン構造

RNA において形成されるヘアピン構造は遺伝子の翻訳に影響を与える可能性があります。例えば、発現させる遺伝子に変異を導入する場合にはこの点を考慮する必要があります。

■ コザック配列

コザック配列はリボソームによるスキャニング速度を低下させる場合があります。また ATG 開始コドンでの翻訳開始を認識することによって、その確率を高める可能性があります。コザック配列が ATG 開始コドンから連続している場合、目的遺伝子の翻訳と全体的発現効率を著しく増大させる可能性があります。

■ 参考文献

1. Cheng *et al.*, [1995] *Int J Radiat Biol* 67 (3): 261-267
2. Foeking *et al.*, [1986] *Gene* 45 (1): 101-105
3. Davis *et al.*, [1988] *Biotechnol Appl Biochem* 10 (1): 6-12
4. Liu *et al.*, [1997] *Anal Biochem* 246 (1): 150-152
5. Wenger *et al.*, [1994] *Anal Biochem* 221 (2): 416-418
6. Kronman *et al.*, [1992] *Gene* 121 (2): 295-304
7. Thompson *et al.*, [1993] *In Vitro Cell Dev Biol* 29A (2): 165-170
8. Thompson *et al.*, [1990] *Gene* 96 (2): 257-262
9. Marshall *et al.*, [2005] *J Biol Chem* 280 (39): 33357-33367
10. Wang *et al.*, [2006] *J Virol* 80 (12): 6003-6012

遺伝子導入実験に必須のプラスミド DNA の調整

精製と品質

遺伝子導入に使用される DNA の質は、実験の成功において非常に重要になります。

プラスミド精製には、高品質な製品を使用するように特にお勧めします(例: Qiagen® EndoFree® プラスミドキット)。精製される DNA は、使用前に滅菌脱イオン水または TE 緩衝液 (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で再懸濁させる必要があります。エンドキシンフリー以外のキットで精製された DNA は、いくつかの細胞型で低い生細胞率をもつ可能性があることが実証されています。同様の効果は、エンドキシンが純粋な DNA 精製物に添加される場合にも観察される場合があります。フェノール:クロロホルムまたはその他の有機物を DNA 精製に使用することは推奨されません。これらは生細胞に有害であり、完全に除去することが非常に困難だからです。

単球、マクロファージ、樹状細胞のようなリポ多糖による活性化に対して高感度の細胞では、PEG 沈殿を使った特別な精製手順が有効です。100 µl DNA 溶液に対して、750 µl 5.0 M NaCl および 750 µl 40% w/v PEG 8000 を追加します。数回反転させてチューブの内容物を混合し、氷上で 1 時間インキュベートします。4℃で 15 分間、微小遠心分離機の最高速度の遠心分離します。上清を取り除き、100 µl の水に沈殿物を溶かしてから PEG 沈殿を再度行います。上清を慎重に取り除きます。沈殿物を、500 µl の氷と同程度に低温の 70% エタノールですすぎます。3 分間遠心分離します。上清を取り除きます。沈殿物を空気乾燥させてから 20 µl の滅菌水または TE で再懸濁します (『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』(第三版) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas 共著を一部改変)。

DNA の質と濃度の測定

DNA 純度は、260 および 280 nm での吸光度 (A) 比によって測定してください。遺伝子導入での利用においては A260/A280 比は 1.6 以上が望ましい値です。さらに、プラスミドをアガロースゲル上で DNA の切断や分解の有無を確認してください。少なくとも DNA の 90% は超らせん構造となっている必要があり、分解産物が視認されてはなりません。濃度を求めるには、260 nm の波長で吸収度を測定し、以下の計算を行います。

$$A_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{希釈係数} = \text{DNA 濃度}$$

使用される希釈度は分光光度計の直線範囲にあるようにします。これは通常 0.1~1.0 の OD です。1 cm 未満の路長のマイクロキュベットを使用している場合は、係数を乗じて 1 cm の路長の長さの OD に変換する必要があります。例えば、5 µl キュベットの経路の長さは 0.5 mm または 1/20 cm なので上記の公式に 20 を乗じて濃度を算出する必要があります。

Nucleofection™ に最適な DNA 量

遺伝子導入効率は DNA 量によっても影響を受ける可能性があります。ほとんどの細胞型の Nucleofection™ では、サイズが 4 kb までの pmaxGFP™ ベクターでは反応液 100 µl に対して 1~2 µg DNA を使用します。より大きなコンストラクトでは、さらに大量の DNA が必要かもしれません。そのため DNA 量を調整し、増量が有効かどうか確認することが推奨されます。いくつかのケースでは、プラスミド量をサンプル毎に最大で 10 µg またはそれ以上に増やすことが可能です。

ただし、DNA に対して感受性が高い特定の細胞では DNA の増量は細胞死の増加につながります。特定の細胞型で Amaxa™ 最適化プロトコルにおいて、pmaxGFP™ ベクターの使用を 2 µg 未満にするよう推奨されている場合、その細胞が DNA に対して高感受性をもつ可能性が高いといえます。

注記: DNA 量は最大でも 100 µl の反応液当たり 10 µl までとします。これを過度にまたはキュベットの許容量を超過して基質を追加して Nucleofector™ 溶液を希釈しないよう調整します。過度の希釈は、装置のエラーを引き起こす可能性があります。

高希釈 DNA の取り扱い

DNA 総量を維持し、Nucleofection™ または HiFect™ 遺伝子導入試薬プロトコルへの追加を適切な範囲で行うため、希釈が過剰な場合は、対象の DNA をエタノール沈殿する必要があります。酢酸アンモニウムベースのエタノール沈殿後、70% エタノール洗浄を 2 回行うことによって塩の残留量が最小限になるようにします。手順としては、0.5 倍量の 7.5 M の酢酸アンモニウムと 2 倍量のエタノールを DNA 溶液に追加し、よく混合します。微小遠心分離機で 15 分間、最高速度で遠心分離します。上清を慎重に取り除きます。氷と同程度に低温の 70% エタノール沈殿に相当するボリュームで、沈殿物をすすぎます。5 分間、遠心分離します。上清を除去します。この作業を繰り返します。沈殿物を空気乾燥させ、滅菌水または TE で再懸濁します。一般的に、再懸濁によって約 70% の回収が見込めます。その後、A260 を測定して確認します。

安定型細胞株作成のガイドライン

背景情報

目的の遺伝子の安定的な発現は、遺伝子導入される細胞の核内でエピソーム管理を行うベクターもしくはゲノムにプラスミドが直接組み込まれることによって達成されます。エピソームの安定性はしばしば限定されており、遺伝子導入されるベクターの段階的損失が起こり得ます。これは、プラスミドを喪失した細胞を選択するための抗生物質を使用することによって防ぐことができます。さらに、エピソームプラスミド要素の機能は特定の種ではしばしば制限されています。宿主細胞染色体への組み込みは起こりにくいいため、多くのケースでクローニングは単独で行われる必要がありますが、意図的に遺伝子を組み換えた場合の安定性は通常はるかに高くなります。まず、対象となる遺伝子は細胞(A)に導入される必要があります。その後、核(B)に導入され、最終的に染色体 DNA(C)に組み込まれる必要があります(図1)。

宿主染色体への染色体組み込みは起こりにくいいため、安定型遺伝子導入される細胞は通常さまざまな方法で選択、培養される必要があります。安定型遺伝子導入される細胞の選択には同一コンストラクト上か、または2つ目の共遺伝子導入されるベクター上で選択マーカーを共発現します。遺伝子導入される細胞を選択するために次のようなさまざまなシステムがあります(カナマイシンキナーゼなどの抗生物質に対する耐性、G418、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、またはグルタミン合成酵素(Southern と Berg, 1982年)に対する耐性など)。遺伝子導入後、選択された試薬を含む培地で細胞を培養すると、薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドを組み込まれた細胞のみが生き残り

ます。実験の対象範囲に応じて、安定的な細胞株の作製に使用されるいくつかのオプションがあります(表1を参照)。薬剤耐性細胞の混合群(バッチ培養)を実験分析目的で直接使用できます。これには迅速に結果を得られるという利点と、内容の不明な遺伝子混在の細胞群を取り扱うという欠点があります。クローン細胞を生成するには、単一の単離細胞の培養ができるように耐性のある細胞を希釈する必要があります。例)96ウェルプレートまたはその他の方法によるプレーティング。その後、この選択プロセスが単一細胞の培養に適用されます。100%のクローニングを行うために、単一細胞のクローニング手順が数回繰り返される場合があります。この培養方法によって、内容が明らかで均質な細胞系を用いた研究やスクリーニングの実施が可能となります。全体的な遺伝子導入効率および/または組み込み頻度が低かったため、これまで安定型細胞株の作製は多くの細胞型(例: Jurkat, MCF7または U937)において大きな課題であり続けてきました。遺伝子導入を行いやすい細胞株(例: HeLa, COS-7または CHO)で安定的発現を得るためには、リポフェクションなどの一般的遺伝子導入を使用できますが、遺伝子導入の難しい細胞型で安定した発現を得るには Nucleofection™ が最適な方法です。

安定型遺伝子導入される細胞株の作製は、遺伝子機能の研究(Grimm, 2004年)、創薬アッセイ、または組み換えタンパク質の生成(Wurm, 2004年)など、幅広い用途に不可欠です。一過性の発現とは対照的に、安定的発現によって目的の遺伝子の長期的で明確かつ再現性のある発現が可能となります。

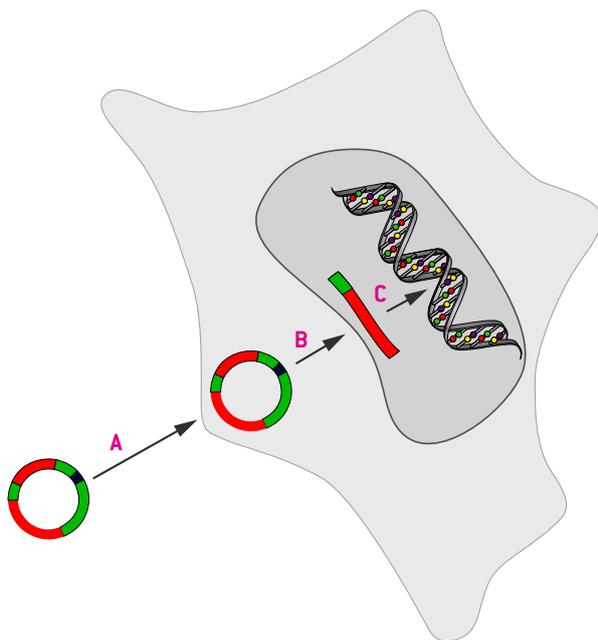


図1. The general path of stable integration.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

表 1：安定型クローン作製の方法

Culture System	Advantage	Application
Batch culture — polyclonal	Fast, useful for cells which do not grow in single cell culture	Overexpression, protein expression systems (e.g., for basic research)
Limiting dilution — monoclonal	Defined cell clones	Studies of gene function, protein production (e.g., for therapeutic applications)

In a batch culture system, a mixed population of drug resistant cells is selected on plates or in flasks and can be used directly for experimental analysis. During a limiting dilution procedure, cells are usually diluted and selected e.g., in a 96-well plate for outgrowth of cell clones or single colony growth. Subsequently, colonies can be picked and used to generate monoclonal cell lines.

安定型細胞株の作製のための培養条件

選択された細胞型の培養条件(継代数、分割リズムなど)、安定遺伝子導入される細胞株の生成において非常に重要です。最適な結果を得るには、American Type Culture Collection (ATCC®、www.atcc.org)の細胞株を使用し、各細胞型において、ATCC®による細胞培養の推奨項目に従ってください。一般に、良好な増殖と細胞生理を促進するには実験2日前の細胞株の継代を推奨しています。細胞継代数は30を超えてはなりません。継代数の多さを組み込み効率によってカバーすることは可能ですが、細胞型によって条件は異なります。実験の対象に応じて、遺伝子導入後に細胞は多クローン性バッチまたは単クローン性の単細胞クローンとして培養される場合があります。

遺伝子導入方法

安定的な発現は、使用される遺伝子導入方法によって影響を受ける可能性があります。遺伝子導入方法の選択によって安定的組み込みのためにどの細胞型を対象とするかが決定されます。標準的な細胞株には生化学的遺伝子導入試薬(例:HiFect™ 遺伝子導入試薬)を使用して DNA を導入できますが、遺伝子導入が困難なことでよく知られている浮遊細胞株や初代細胞への DNA の効率的な導入はウイルスを用いる方法もしくは Nucleofection™(図2)でのみ可能です。ウイルスを用いる方法には、時間のかかるベクターの作製や安全上の懸念などいくつかの問題点があります(Hacein-Bey-Abinら、2003年)。

ロンザは、Nucleofector™ Technology (168ページ参照) 遺伝子導入の困難な細胞株の遺伝子導入を推奨しています。

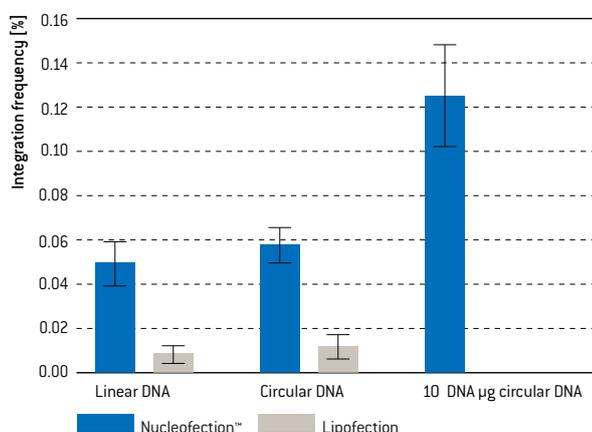
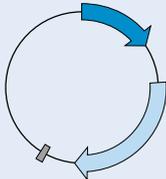
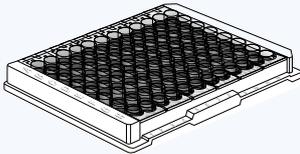
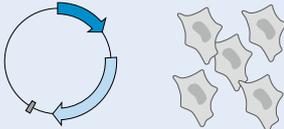
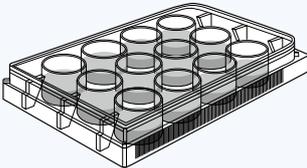
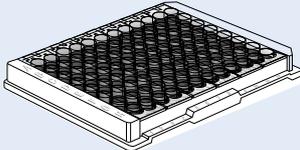
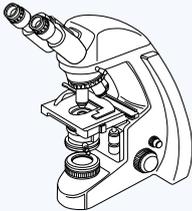


図2. Higher integration rates in difficult-to-transfect cell lines using Nucleofection™. Jurkat cells were transfected using either Nucleofection™ (2 µg DNA) or lipofection Reagent L (0.7 µg DNA) according to the respective manufacturer's instructions. 24 hours after transfection, cells were plated on a 96-well plate containing culture medium supplemented with G418 for selection of stably-transfected cells. 30 days after plating, cells were analyzed for clonal outgrowth (Integration frequency = number of resistant clones per number of living cells seeded). Due to toxic effects, lipofection with 10 µg circular DNA could not be performed.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

実験のアウトライン

	Procedure Outline	Important Information
Step 1 	Design experiment and choose cell type, expression vector and transfection method.	Make sure that transfection method and expression vector are suitable for your cell type.
Step 2 	Determine appropriate cell number per well (only for limiting dilution) and G418 concentration.	Cells differ in their susceptibility to G418. The active concentration of stock G418 can vary from batch to batch.
Step 3 	Transfect expression vector into cells.	Amount of expression vector per experiment is dependent on transfection method and cell type.
Step 4 	Plate transfected cells and cultivate cells in medium without G418.	Do not add G418 to culture medium immediately after transfection as this may drastically increase mortality.
Step 5 	Dilute cells into culture plates and start selection 24 – 48 hours post-transfection. Feed every 2 – 3 days (for batch culture) or 10 days (for limiting dilution) with selection medium.	Choose culture conditions (batch culture, limiting dilution) depending on your experimental design. Refreshed selection medium is important to avoid false positive cells.
Step 6 	Analyze stably transfected cells.	Make sure that the chosen assay is suitable for your application.

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

バッチ培養のためのプロトコル

■ バッチ培養を利用した G418濃度の測定

発現プラスミドが薬剤耐性遺伝子を含んでいる場合、薬剤を培養培地に添加することによって安定型遺伝子導入細胞を選択できます。本実験ではネオマイシン耐性システムについて説明します。これは選択マーカーとして G418に対する耐性を使用します。G418に対する感受性は細胞によって異なります。また細胞型が同じであっても細胞継代数が違えば感受性が異なる場合があります。無血清培地で培養される細胞は、血清含有培地の細胞と比較して必要な G418濃度がずっと少なく済む場合があります。それぞれの細胞型に関する選択条件を実験的に設定する必要があります。細胞増殖を抑制するには、培地に添加する最小レベルの G418を決定する必要があります。ストック G418の活性濃度は、バッチによって著しく異なります。したがって、新規バッチ毎に G418感受性を試験するか、ロット単位で大量購入して選択条件を標準化するよう推奨されます。

1. ATCC® の手順に従い、G418を含まない培養培地を移した12ウェルプレートに細胞を振り分けます。
2. 翌日、増殖培地を吸引し、G418濃度を増やして細胞を培養します（例：0.1 mg/ml～1.5 mg/ml の範囲で G418を滴定します。血清を使用しない培養では範囲を 20 µg/ml まで狭めてください）。
3. 選択した培地で細胞を2～3日培養します。
4. 7～14日後に光学顕微鏡下で細胞死を確認します。
5. 完全な細胞死を示す濃度から0.1～0.2 mg/ml 上乗せした濃度を選択すべき適切な G418濃度として決定します。使用されたうちの最低の濃度で7日後に完全な細胞死が見られた場合は、さらに低い濃度幅で調整を繰り返してください。

■ 遺伝子導入

遺伝子導入については、お使いの遺伝子導入システムの手順書に従い、対象の遺伝子および薬剤耐性遺伝子用配列を含む発現プラスミドを、使用する細胞型に遺伝子導入してください。遺伝子導入後、手順書に従い、細胞をプレーティングします。通常、6ウェルプレートは 10^6 の接着細胞に、12ウェルプレートは 10^6 の浮遊細胞に使用されます。

重要対照群:ネガティブコントロール群として、遺伝子導入していない細胞サンプルを使用するよう推奨されます。また、pmaxFP™-Green ベクターなどの GFP 制御プラスミドでカスタマーの実験の遺伝子導入効率と組み込み頻度を確認することが、強く推奨されています。pmaxFP® Green ベクターは *Pontellina* の緑色蛍光タンパク質 (maxFP™-Green レポータータンパク質) をコード化します。pmaxFP™ Green レポータータンパク質発現細胞は、蛍光顕微鏡検査法またはフローサイトメトリーによって簡単に解析し実験効率をモニタリングできます。

■ 遺伝子導入後の細胞培養

選択条件下では、非耐性細胞に対して耐性細胞が増殖し、安定型発現を行う細胞の多クローン集団が発生します。耐性細胞の異種発現集団は解析に使用できません。

1. 遺伝子導入後、G418に対する耐性を獲得するため非選択条件下において24時間以上タンパク質を発現させます（高感受性の細胞では G418の選択が48時間後に始まる場合があります）。
2. 接着細胞をトリプシン処理もしくは浮遊細胞を直接使用して分析します。可能な場合、ポジティブコントロールサンプルおよび対象とする遺伝子のアリコットについて、遺伝子導入の24～48時間後に遺伝子導入効率を解析してください（一過性遺伝子導入コントロール）。
3. 安定した発現を行う細胞の選択では、細胞型用にあらかじめ試験した適量の G418と添加因子を含む培地で細胞を培養します。
4. ATCC® の手順に従って培養プレートまたはフラスコに細胞を移し、標準条件下で細胞を培養します。
5. 耐性細胞の増殖が十分に拡大するまで培養し必要に応じて分注します。
6. バッチ培養の細胞を回収します。

通常、耐性遺伝子を組み込まなかった細胞は最初の選択から数日で死滅します。耐性細胞の増殖は、通常選択から2週間後に観察することができます。細胞によっては、4週間かかるものもあります。G418は37℃で不安定になります。そのため、2～3日毎に G418を含む培地を交換し、選択圧の損失を補完するよう推奨されます。1～2週間後に G418濃度を低下させることが適切な場合があります。細胞は、非耐性細胞の混入を避けるために選択圧下で少なくとも3週間増殖させてください。ネガティブコントロールウェル（例：発現プラスミドなしのサンプル）は、光学顕微鏡検下で観察し、細胞増殖の兆候が見られないことを確認します。細胞型や細胞の増殖度合いによって異なりますが、選択培養期間は最長で計4～5週間以上に及びることがあります。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

■ バッチ培養の解析

耐性細胞バッチまたはクローン取得後、細胞を増殖させて対象の遺伝子をアッセイします。maxFP™ Green レポータータンパク質発現細胞(ポジティブコントロール)の分析では、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターを使用します。

■ 希釈制限のプロトコル

■ G418濃度と播種密度の決定

発現プラスミドが薬剤耐性遺伝子を含有する場合、薬剤を培養培地に添加することによって安定遺伝子導入される細胞を選択することができます。ここでは、ネオマイシン耐性システムについて説明します。本実験では選択マーカーとしてのG418に対する耐性を使用します。G418に対する感受性は細胞によって異なります。また同じ細胞型でも細胞継代数が違えば感受性が異なる場合があります。無血清培地で培養される細胞は、血清を含む培地の細胞と比較してはるかに低いG418濃度を必要とする場合があります。個別の細胞型に関する選択条件を実験的に設定する必要があります。細胞増殖を抑制するために培養培地に添加する最小レベルのG418を定量します。ストック G418の活性濃度はバッチによって著しく異なることにご注意ください。したがって、新規バッチ毎に G418感受性を試験するか、ロット単位で大量購入し、選択条件を標準化するよう推奨されます。遺伝子導入後の最終播種密度は特定の細胞型の培養条件および G418濃度によって異なります。そのため、G418濃度の調整と細胞数の調整を組み合わせると播種密度の決定を二次元的に行なうことが推奨されます(図3)。

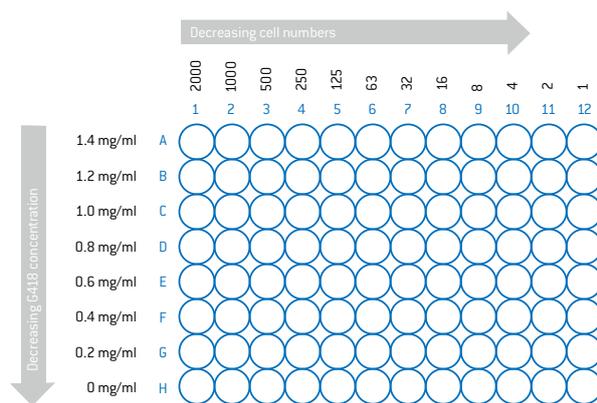


図3. Matrix titration of G418 and titration of cell number for determination of plating density in one 96-well plate.

1. プレートの各ウェルに100 μ l の培地をセットします。
2. ウェル毎に4000の細胞を含む細胞懸濁液を100 μ l 分最初のカラム(#1)に追加します。
3. ピペットを静かに上下させた後100 μ l を次のカラムにキャリーオーバーします。これによって1:2の比率に希釈されます。各連続カラムにおいてこの手順を繰り返します。
4. 完了後、最後のカラム(#12)から100 μ l 分を廃棄します。最初のカラムには約2,000の細胞が含まれ、最後のカラムには平均で1つ未満の細胞が含まれるはずで
5. G418を含む培地を100 μ l 分(2.8 mg G418/ml)最初の列(A)に追加し、G418の最終濃度を1.4 mg/ml にします。
6. G418をそれ以降の列に追加していきますが濃度は順番に0.2 mg/mlずつ減らしていきます。最後の列(H)ではG418なしの培地を添加します。
7. 標準条件下で細胞を培養します。
8. 顕微鏡で細胞の増殖を分析します。細胞の増殖が培地の色の变化として観察されることもあります。
9. G418を含まないウェルで(10日後以降)細胞増殖が観察される場合、これらの細胞が単細胞として増殖を開始したと判断できます。
10. 選択に適切な G418濃度として、完全な細胞死を示すものよりもわずかに高い G418濃度を選んでください。

特定の細胞型では、適切な増殖のために多くの細胞が隣接する必要があります。この場合、限界希釈実験はより高い細胞濃度でのみ行うことができます。これによって、純粋なクローンの獲得はさらに困難になります。このようなケースでは、適切な数の細胞を播種し、フィーダー細胞と同様の非遺伝子導入細胞と混在する耐性クローンを選択して希釈することにより、クローンが作製されます。96ウェルプレートを使って柔らかい寒天またはメチルセルロース上で細胞を培養することが推奨されます。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

■ 遺伝子導入

遺伝子導入については、お使いの遺伝子導入システムに関する手順書に従い、対象の遺伝子および薬剤耐性遺伝子用配列を含む発現プラスミドを使用する細胞型に遺伝子導入してください。遺伝子導入後、手順書に従い、細胞を播種します(例:96ウェル組織培養ウェルプレート)。

重要対照群:ネガティブコントロールとして、遺伝子導入されていない細胞のサンプルを含めるよう推奨されます。

■ 遺伝子導入後の細胞培養

接着および浮遊細胞からの単細胞クローンは、96ウェルプレートの使用またはその他の方法で細胞を希釈することによって作製できます。これによって、選択圧下での単離細胞クローンの増殖が可能となります。

1. 遺伝子導入後、G418に対する耐性を獲得するために非選択条件下において24時間以上タンパク質を発現させます(高感受性の細胞ではG418の選択が48時間後に始まる場合があります)。
2. 標準手順で接着細胞をトリプシン処理または浮遊細胞を直接使用して分析します。可能な場合、ポジティブコントロールサンプルおよび対象とする遺伝子について遺伝子導入の24~48時間後に遺伝子導入効率を解析してください(一過性遺伝子導入コントロール)。
3. トリパンブルー染色などの適切な方法で、生細胞数をカウントします。
4. 細胞型に合わせてあらかじめ試験された、適量のG418と添加因子を含む標準培地を使用し、ウェル毎に少なくとも100 μ lの分量で異なる細胞数(例:10、100、1000)を有する96ウェルプレートに細胞を配置します。事前に決められた細胞濃度に応じて適切な希釈手順を順番に実行してください。播種前に十分に細胞を懸濁させることが重要ですが頻繁なピペット操作は行わないようにしてください。ウェル毎の最小細胞数として事前に決定した下限値を使用します(単細胞クローンの作製では統計的に96ウェルプレート毎に5~20のクローンを産生することが分かっている希釈液を選択し、ウェルに2つ以上のクローンが発生する確率を最小化します)。

5. 標準的条件下で、新鮮な選択培地を使って10~14日間細胞を培養します。
6. 非遺伝子導入コントロールウェルの細胞が完全に死滅したら、細胞を直ぐにクローン解析もしくはさらに増殖させることができます。
7. 選択された細胞集団が単一細胞からのクローンであることをより確かなものにするために、限界希釈法をもう一度行うことが推奨されます。通常、耐性遺伝子を組み込まなかった細胞は選択培養の開始から数日間で死滅します。耐性細胞の増殖は、通常選択培養の開始から2週間後に観察することができます。細胞によっては4週間かかるものもあります。G418は37°Cで不安定になるため、10~14日後にG418を含む新しい培地を追加し、選択圧の損失を補完するよう推奨されます。1~2週間後にG418濃度を低下させた方がいい場合もあります。細胞は選択圧下で少なくとも3週間増殖させ、非耐性細胞の混入を防ぎます。ネガティブコントロールウェル(例:発現プラスミドなしのサンプル)は、光学顕微鏡下で観察し、細胞増殖が無いことを確認します。細胞型や細胞の増殖度合いによって異なりますが、選択培養期間は最長で計4~5週間以上に及びます。

■ 安定型クローンの分析

耐性クローンの同定後、細胞を増殖させて適切な分析方法(例:顕微鏡検査法、フローサイトメトリー、ELISA)で対象の遺伝子を解析します。ポジティブコントロール細胞の解析では、蛍光顕微鏡によって96ウェルプレートを観察します。

安定型細胞株作成のガイドライン

続き

表 2：トラブルシューティング

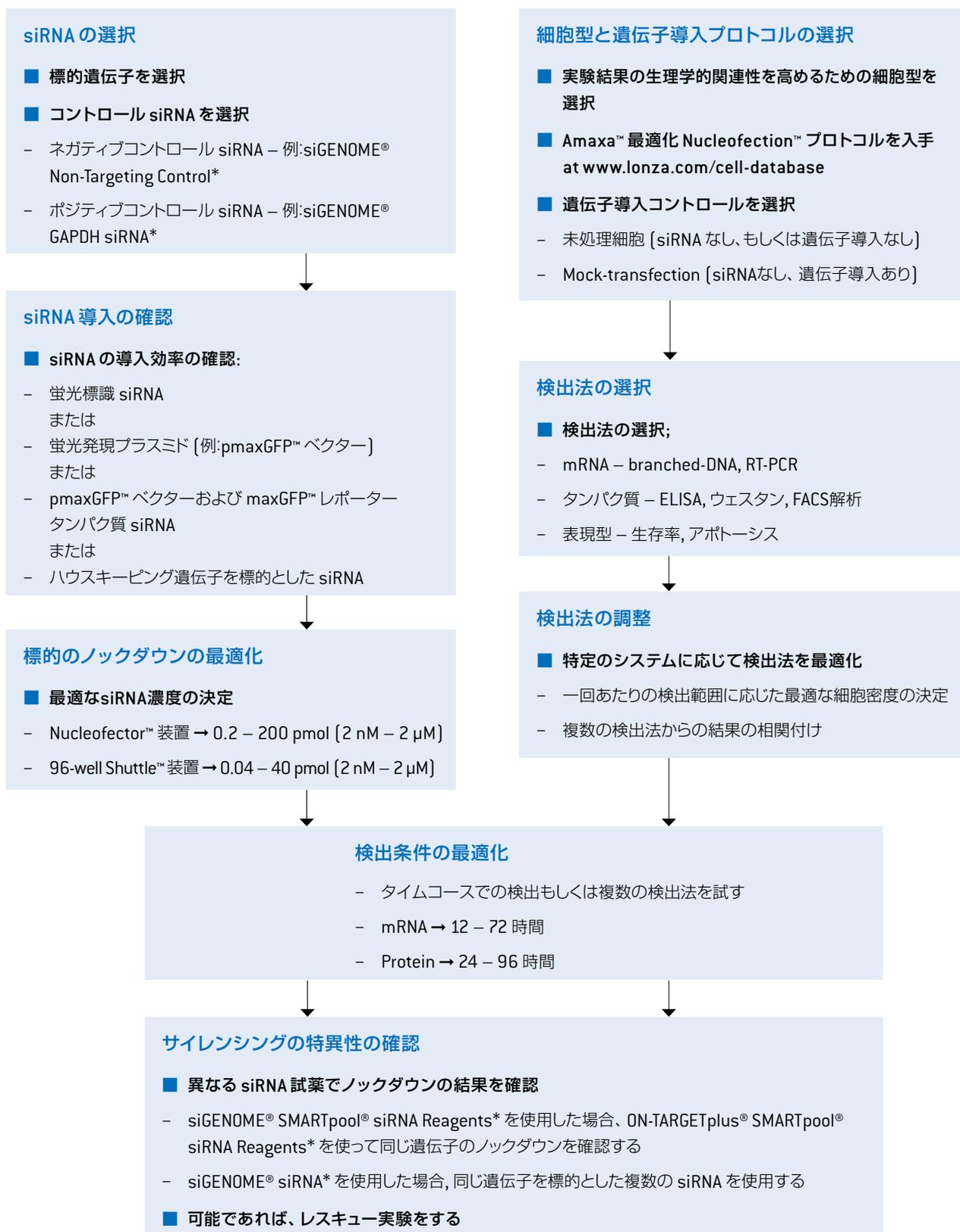
症状	解決策
一過性遺伝子導入効率が低くなっている。	最適な細胞密度は細胞型毎に決定してください。接着細胞では、遺伝子導入時の最適な細胞コンフルエンスは60~80%です。これより高い場合は、コンフルエンスが著しく低い場合と同様、細胞密度が原因で遺伝子導入効率が低下する場合があります。浮遊細胞は対数増殖段階にある細胞を使用する必要があります。適切な遺伝子導入方法を選択します（例：遺伝子導入の困難な細胞株用 Nucleofection™）。
遺伝子導入後 24時間の細胞生存率が 低くなっている。	DNA 感受性が高いことが知られている細胞を使用する場合は DNA 量を減らすようにしてください。細胞型に関して ATCC® 手順書で継代数、分割リズムおよび培地を確認してください。適切な遺伝子導入方法を選択してください（例：遺伝子導入の難しい細胞株には Nucleofection™）。
G418を含まない場合であっても 96ウェルプレートで 遺伝子導入細胞が増殖しない。	細胞増殖の播種密度を再度調整し最適化します。調整しない場合でも、単一細胞増殖の最低細胞数を下回らないようにしてください。使用する細胞型について、ATCC® 手順書で継代数、分割リズムおよび培地を確認してください。接着細胞には平底プレートを使用し浮遊細胞には丸底プレートを使用してください。
96ウェルプレートの 耐性クローン数が 選択後に減少する。	遺伝子導入方法について、一過性遺伝子導入効率を確認してください（例：maxGFP™ レポータータンパク質を対照として使用）。DNA を増量して再度試みます。単一細胞培養における最適な細胞増殖のために G418量を再評価します。より低い G418濃度を試みます。96ウェルプレートで最適な播種密度を再確認します。問題がなければウェル毎の細胞数を増やします。遺伝子導入前に細胞の継代数とコンフルエンスを調整します。適切な遺伝子導入方法を選択します（例：遺伝子導入の難しい細胞株には Nucleofection™）。
選択後、96ウェルプレートに 多くの耐性クローンが 非耐性細胞クローンと混在している。 クローンがネガティブコントロール プレートで増殖する。	遺伝子導入後、新鮮な G418選択培地で少なくとも14日間細胞を増殖させます。最初の G418濃度調整で使用したのと同じ G418バッチを使用してください。96ウェルプレートでの最適なプレATING密度を再確認します。正しければ、ウェル毎の細胞数を減らします。G418濃度の調整、遺伝子導入および選択用の細胞については、継代数が同様になるようにしてください（差異は10以下とすること）。
クローンが選択後に増殖しない。	耐性クローンを回収する前に4~5週間培養し、培養拡大のために十分な細胞数を得るようにします。最初の G418濃度調整に使用したのと同じ G418バッチ（および濃度）を使用します。
クローンには耐性があるものの いくつかのクローンでは 目的の遺伝子が発現しない。	可能な場合、一過性発現アッセイで対象の遺伝子の発現を確認するようにしてください。遺伝子導入前にプラスミドの線形化を試みてください。これによって、組み込み中に目的の遺伝子が切断されるのを防ぐことができます。ATG および停止コドンについて、目的の遺伝子配列を確認してください。
ポジティブコントロールには 多くの耐性クローンがあるものの 目的の遺伝子には耐性がない。	目的の遺伝子が挿入されていることとシーケンシングや制限酵素によってプラスミドへの耐性マーカーが存在することを確認してください。発現される組み換えタンパク質が細胞にとって毒性があるか確認します。

参考文献

- Grimm S. (2004). The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. Nature Rev Gen, 5: 179-189.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulfraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science, 302: 415-419.
- Southern, P. J., Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.
- J Mol Appl Genet, 1: 327-341.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnol, 22: 1393-1398.

Nucleofection™ を使った siRNA 実験のデザイン

Amaxa™ Nucleofector™ テクノロジーは、初代細胞と遺伝子導入の難しい細胞株への siRNA や shRNA ベクターの遺伝子導入に最適です。



Nucleofection™ を使った siRNA 実験のデザイン

続き

pmaxGFP™ ベクターで、Nucleofection™ 条件を確立/検証します。

特定の細胞型に対する最適な Nucleofection™ 条件は、DNA または RNA のどちらを遺伝子導入するかに関わらず同一となります。カスタマーの細胞に最適な Nucleofector™ 溶液およびプログラムを確立/検証するために pmaxGFP™ ベクター(各キットに含まれるポジティブコントロールプラスミド)で予備実験を行うよう推奨されます。条件を決定したら、基質として DNA または RNA のどちらを(あるいは両方同時に)遺伝子導入するかに関わらず、その条件が適用されます。

適切な実験コントロールを特定します。

siRNA の実験から導き出される結果が正確であるようにするため、適切な実験コントロールを設定する必要があります。各 RNAi 実験において、少なくとも4種類の実験コントロールを設定するよう推奨されます。複数の条件下での複数コントロールを使った平行試験は96-well Shuttle™ システムを使用することで簡単に実行できます。

■ siRNA ポジティブコントロール

サイクロフィリン B(PPIB としても知られる)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ラミンなどのハウスキーピング遺伝子を標的とする siRNA プールまたは単体の siRNA を使用します。十分に発現するものの非必須の遺伝子を標的とする良好なポジティブコントロールは生細胞率に影響しない実験パラメータを設定するのに役立ちます。またこれは、研究対象に関連する特定の経路と無関係なネガティブコントロールとして使用することもできます(目的遺伝子に対するアッセイでは表現型が観察されない)。

■ siRNA ネガティブコントロール

siRNA ネガティブコントロールは、選択される細胞型において既知の標的にならないよう生物情報学的に設計、検証されています。これらの試薬は、siRNA の細胞への導入に関連する配列非依存性効果と配列固有のサイレンシングを区別するのに重要です。このような配列非依存性効果の例として、核酸導入に関連する遺伝子導入のプロセスまたは二本鎖 RNA の導入に対する過敏性に起因する毒性があります。ネガティブコントロールが観察可能で、標的とは無関係の意図しない効果を引き起こさないことを実験的に確認するために、各実験システムにおいて複数の候補を試験するよう推奨されます。このため、Thermo Fisher Scientific は複数のネガティブコントロールの製品群を取り揃えています。例えば ON-TARGETplus® Non-Targeting Controls がありますが、これはマイクロアレイ解析によって、HeLa 細胞において標的とは無関係の効果をわずくか又は全く示さないことが確認されています。

■ 未処理の遺伝子導入コントロール

未処理のコントロールサンプルは siRNA で処理されず、遺伝子導入プロセスにも関連しない細胞から構成されています。このコントロールは、他のすべての条件と比較して基準となる細胞活性自体の指標として使用できます。

■ 偽処理コントロール

偽処理のコントロールサンプルは、siRNA を含まずに遺伝子導入を行った細胞です。Nucleofection™ の場合、細胞は Nucleofector™ 溶液と混合され、siRNA を含まない状態で Nucleofection™ 操作を行います。偽処理細胞の分析によって、遺伝子導入プロセス自体が細胞毒性またはその他の非特異的効果を示すかどうか分かります。

精密に調整された特異的 siRNA 配列/濃度

同一の Nucleofection™ 条件を使用すれば、siRNA を予備実験で使用される pmaxGFP™ ベクターに置き換えることができます。(独立した平行サンプル、または siRNA を用いた Nucleofection™ による共遺伝子導入のいずれかで)pmaxGFP™ ベクターを実験間での相対的遺伝子導入効率を比較もしくは遺伝子導入される細胞を選択するための手段として取り入れることができます。DNA を用いた遺伝子導入効率は通常 siRNA と比較してかなり低くなります。蛍光でラベリングしたオリゴヌクレオチドの使用に興味があれば、まずこの文書中補注部分を一読するか、ロンザの技術サポートチームにお問い合わせください。

■ 最適な siRNA 配列の選択

あらかじめ特性が明らかになっていない siRNA 配列を使用している場合は、慎重に配列の選択をするように推奨されます。siRNA を提供している会社の多くは、オリゴヌクレオチドの最適化サービスを提供しています。しかし、遺伝子特異的な siRNA オリゴヌクレオチドをいくつかテストして、標的となる遺伝子を効率的にダウンレギュレートする siRNA オリゴヌクレオチドの同定が必要となる場合もまだ珍しくありません。

Nucleofection™ を使った siRNA 実験のデザイン

続き

表 1: 低濃度 siRNA を用いた Nucleofection™

siRNA濃度	細胞型	標的/解析法	ノックダウン	参考文献
2 nM [0.2 pmol*]	COS-7 [サル腎臓線維芽細胞]	Bruton's チロシンキナーゼ / FACS	96%	5
7 nM [0.7 pmol*]	THP-1 [ヒト単球白血病]	インターフェロン調節因子 (IRF5) / RT-PCR	»強く抑制«	6
1 nM [0.1 pmol*]	HUVEC [ヒト臍帯静脈内皮細胞]	インターフェロンインテグリン 1 / 3 および Akt / ウェスタンブロット	>90%	7

* Per cuvette (100 µl volume)

■ 最適な有効 siRNA 濃度の決定

siRNA 媒介性ノックダウン実験を実行する際、用量反応(濃度)解析によって、mRNA、タンパク質または機能レベルに対して十分なターゲットのノックダウンに必要な siRNA の最小濃度を決定するよう推奨されます。

Nucleofection™ では、最適な siRNA 濃度は 2 nM 以下から 2 µM の間です。最適な濃度は細胞型や mRNA および/またはターゲット遺伝子のタンパク質の半減期など複数の要因によって異なります。研究対象の細胞型やターゲットに最適な濃度を決定するために siRNA 濃度の初期滴定を 2 nM ~ 2 µM の間で実行するよう推奨されます (Nucleofector™ 装置: 0.2~200 pmol/100 µl, 96-well Shuttle™ 装置 0.04~40 pmol/20 µl)。最小濃度決定には 30 および 300 nM を使用してください。使用する siRNA の濃度は脂質媒介型の方法より高いように見えますが、サンプル当たりでは Nucleofection™ は 5x~25x 少ない量で反応を行っています (96-well Shuttle™ 装置では 20 µl, 96ウェルリポフェクションでは 100 µl, 標準 Nucleofector™ 装置では 100 µl, 6ウェルリポフェクションでは 1~2.5 ml)。

注記

1. siRNA 濃度の計算: 100 µl Nucleocuvette™ 中 1 pmol siRNA の Nucleofection™: 1 pmol/100 µl = 20 µl Nucleocuvette™ 中 1 pmol siRNA の 10 nM Nucleofection™: 1 pmol/20 µl = 50 nM 個別の計算については、ロンザのウェブサイトの siRNA 計算式 (www.lonza.com/sirna-calculator) も参照してください。

2. 用量と重量の関係: 1 pmol siRNA は、14 ng siRNA に相当します (21 bp siRNA ds-オリゴヌクレオチドの分子量: 21×660 g/mol 約 14 ng/pmol)。

最適な有効 siRNA 濃度はターゲットおよび細胞型によって異なります。実際、数多くの文献で望ましい遺伝子のノックダウンを導く際に <50 nM siRNA の Nucleofection™ が観察され、報告されています (表 1 を参照)。

ユーザーからは 1 µM よりも高い濃度で満足する結果を得たとの報告もあります。しかし効率的なノックダウンと標的とは無関係な効果の最小化とのバランスを保つことが重要です。siRNA <30 nt を保つことによってプロテインキナーゼ (PKR) および 2',5'-オリゴアデニル酸シンターゼ経路の活性化を避けることができますが、siRNA はそれでも非ターゲット遺伝子の刺激や抑制といった非特異的効果をもたらします。¹

最適な解析タイミングの決定

mRNA やその生成タンパク質の安定性と半減期はさまざまであるため、ターゲットのノックダウンを評価するのに最適なタイミングを実験的に決定することが重要です。例えば、哺乳動物細胞において、mRNA の半減期は数分から 2 日となるのに対し、タンパク質産物の半減期は数分未満から数日です。² このことを考慮すると、siRNA が RISC と結合し、mRNA/タンパク質濃度を目的レベルまで大幅に減少させるための十分な時間がとれるような実験の設計が必要です。通常、ターゲット mRNA を大幅に減少させるための推奨時間幅は 5~72 時間であり、ターゲットタンパク質を適切にノックダウンして表現型の結果を評価するための推奨時間幅は 24~96 時間です。

siRNA 特異性の検証

siRNA 濃度を可能な限り低く保つことで非特異的効果の最小化に役立ちますが、すべての実験に適切なコントロールを使用すること大切です。³ mRNA およびタンパク質レベルにおける遺伝子ノックダウンのモニタリングによって、siRNA 配列が microRNA ではなく従来の RNAi 経路で作用していることが確認されます (標的 mRNA の破壊を目標とするのではなく、少なくとも部分的にその変換を阻害)。RNAi データの信頼性を高めるには、目的の RNA 転写産物中の別々の場所をターゲットとする 2 つ以上の siRNA を用いて同じ結果に導きます。最終コントロールとしてのレスキュー実験は、近年『Nature Cell Biology』³ の論文で示唆されているように、あらゆる RNAi 実験で選択されるコントロールは、siRNA では目的遺伝子の発現抑制に効果が無い場合に有効です。通常、1 つ以上のサイレントな第 3 コドンの点変異もしくは標的配列内の非翻訳領域の欠失を利用します。翻訳上の影響は、3'-非翻訳領域に対してターゲットとされる siRNA を使用して避けることができます。レスキュー実験では、標的遺伝子の siRNA と siRNA 耐性型のプラスミドを共遺伝子導入もしくは標的遺伝子の siRNA 耐性を共発現する shRNA を使用します。

設定した Nucleofection™ 条件を使用して DNA と RNA の両方を遺伝子導入することができるため、Nucleofector™ テクノロジーを利用すれば両方の実験を簡便に行うことができます。

Nucleofection™ を使った siRNA 実験のデザイン

続き

総量	21 bp siRNA ds-オリゴヌクレオチドの分子量: 21×660 g/mol=13860 g/mol = 13.86 ng/pmol = 14 ng/pmol	濃度 100 µl用キュベット	濃度 20 µl用キュベット
1 pmol	14 ng	1 pmol/100 µl = 10 nmol/l = 10 nM	1 pmol/20 µl = 50 nmol/l = 50 nM
5 pmol	69 ng	5 pmol/100 µl = 50 nmol/l = 50 nM	5 pmol/20 µl = 250 nmol/l = 250 nM
10 pmol	140 ng	10 pmol/100 µl = 100 nmol/l = 100 nM	10 pmol/20 µl = 500 nmol/l = 500 nM
20 pmol	277 ng	20 pmol/100 µl = 200 nmol/l = 200 nM	20 pmol/20 µl = 1000 nmol/l = 1 µM
50 pmol	690 ng	50 pmol/100 µl = 500 nmol/l = 500 nM	50 pmol/20 µl = 2500 nmol/l = 2.5 µM
100 pmol	1.4 µg	100 pmol/100 µl = 1000 nmol/l = 1 µM	100 pmol/20 µl = 5000 nmol/l = 5 µM

For individual calculation, also refer to our website www.lonza.com/sirna-calculator

補注

■ 遺伝子導入効率の測定

– 蛍光ラベリングされた siRNA の使用: 蛍光ラベリングされた siRNA を用いた実験では、いくつかの細胞型において遺伝子導入効率が最大で99%を示します。Nucleofection™ 後、蛍光ラベルの多くがすぐに消失してしまうため、共焦点顕微鏡または FACS が使用できない場合は最初のセットアップ実験において蛍光ラベルした siRNA の使用は推奨されません。同様に、蛍光細胞を適切に可視化するために必要な蛍光ラベリング siRNA の量は、機能的反応に最適と思われる量よりもずっと多いことがよくあります。このため、これは高価でありあまり有益ではない実験となっています。さらに、siRNA が細胞膜に接着し、実際は細胞内に入っていないことに起因する誤った陽性結果が顕微鏡観察によって導かれる可能性があります。例えば相対的な遺伝子導入効率の推定を行うために、siRNA と平行して(または同じサンプルとして)、pmaxGFP™ ベクターをサンプルとして遺伝子導入するよう推奨されます。それでもなお、siRNA 分子の遺伝子導入効率は通常高くなることを考慮してください。ラベルした siRNA を実験に使用したい場合は、ロンザの技術サポートチームに連絡して、実験がなるべくスムーズに進むよう支援を受けてください。

■ 遺伝子導入細胞を増やすには

遺伝子導入細胞を増やす方法の1つは、siRNA を蛍光レポーターまたは表面マーカーを発現するプラスミドと共遺伝子導入し、レポーターを発現する細胞を選択することです。このアプローチは、Wu らによって使用されています(2005年)⁴。shRNA 発現ベクターを使用することによって、共発現される蛍光または抗生物質耐性マーカーを使用し、遺伝子導入された細胞を選択できます(下記参照)。しかし、プラスミド DNA の遺伝子導入効率は、一般的に siRNA 二本鎖よりも低くなっています。

■ 長期的な RNAi 効果

(二本鎖 siRNA vs. shRNA 発現ベクター)

化学的に合成される二本鎖 siRNA は、siRNA 配列を迅速に知るための手段になります。これは標的遺伝子の効率的なノックダウンにつながりますが、このダウンレギュレーションは一過性(通常2~5日持続)であり、短期間で標的遺伝子の発現を抑制する目的、または長期間の効果が必要とするその他の用途においては、十分でない可能性があります。siRNA または shRNA(ヘアピン構造の小型 RNA)の発現を促すための数多くのプラスミドベクターが市販されています。siRNA/shRNA の長期的発現を可能にすることに加え、プラスミド DNA として増殖、取り扱い、保存できるという利点を有しており、蛍光マーカーまたは抗生物質耐性遺伝子(遺伝子導入細胞の特定や安定的遺伝子導入細胞の選択に利用)を共発現し、誘導プロモーターで操作して、ノックダウン表現型のオンとオフを切り替えることができます(pSuperior、OligoEngine など)。DNA を初代細胞(そして他の手段による遺伝子導入が難しいか不可能な数多くの細胞株)に遺伝子導入する Nucleofector™ テクノロジーによって、これらのベクターを実際にどんな細胞型でも使用することが現在可能となっています。ただし、遺伝子導入効率は、一般的に DNA プラスミドよりも siRNA オリゴヌクレオチドを用いた場合の方が良好です。

■ Nucleofector™ 溶液における二本鎖 siRNA の安定性

Nucleofector™ 溶液は RNase 活性試験済みです。溶液中の RNA を2時間、37°Cでインキュベートしたところ、RNA の安定性には影響がみられませんでした。詳細については、ロンザの技術サポートチームまでお問い合わせください。

参考文献

1. Persengiev SP, et al. RNA. 2004 Jan;10(1):12-8
2. Ross J, 1995, Microbiol Rev 59:423-50
3. Editorial [2003] Wither RNAi. Nat Cell Biol. 5 [6], 489-490.
4. Wu et al. [2005] MCB 25(22):9741-9752
5. Lindvall JM et al. [2005] Immunol Rev 203, 200-215.
6. Schoenemeyer A et al. [2005] J Biol Chem 280, 17005-17012.
7. Short SM et al. [2005] J Cell Biol 168, 643-653.

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド

本ガイドラインでは、種々のゲノム編集ツールについてその背景を簡単に述べるとともに、多能性幹細胞など遺伝子導入が困難な細胞のゲノム編集に用いる技術としてロンザが Nucleofector™ テクノロジーを確立させた経緯を説明する。

1. ゲノム編集とは

研究者が現在大量のゲノム配列データを使用できることが、遺伝子組換えテクノロジーに革新をもたらす基盤となった。ゲノム編集と呼ばれるこのテクノロジーは、予め決めた特定のゲノム部位で遺伝性の DNA 変異を誘導する手段となる。

一般に遺伝子発現の調節にはさまざまな方法があり、DNA、RNA またはタンパク質レベルで行える。このような方法の多くで調節は一過性であるものの、用途によっては一過性の変化で十分である、またはむしろ都合が良いこともある。しかし、ゲノム編集が行われる以前の状況では、安定した遺伝性の DNA 修飾が必要な場合にはプラスミド、トランスポゾンまたはウイルスのランダムな組み込み、もしくは相同組換えを行っていた。相同組換えによって部位特異的な組み込みを行える一方、この方法はかなりの長時間を要することから非効率的である。ゲノム編集ツールが使用できるようになったことで、部位特異的な安定した修飾を簡単に行えるようになった。この10年間でジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) および転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) が部位特異的ゲノム修飾の有用なツールとして確立されたが、群生性等間隔短回文反復配列 (CRISPR) が先ごろ発見されたことで強力なツールが新たに増えたことになる。

2. さまざまな用途

ゲノム編集テクノロジーは、基礎研究および応用研究の分野で遺伝子修飾のさまざまな手法に適用されている。以前は相同組換え法で行われていた機能欠損ノックアウトマウスの研究を、現在では遺伝子修飾率が10~100倍高いゲノム編集を使用することで迅速かつ高い効率で行える^{1,2}。ゲノム編集は遺伝子発現抑制の忠実度と規模の面で RNAi ベースの方法よりも優れていることが証明されている^{3,4}。また、RNAi ベースの方法によるノックダウンは一過性である。最近になって、腫瘍細胞株に対するゲノムワイドな機能欠損スクリーニングがいくつか行われ、このテクノロジーの堅牢性が実証されている^{3,4}。トランスジーン挿入により蛍光タンパク質、ルシフェラーゼや他のレポーター分子を部位特異的に挿入することで、細胞本来の機能の保存が必要な細胞ホーミングや系譜追跡の研究が容易になった⁵。また、患者由来の iPSC を使用するか、正常な個人から得た iPSC に十分に特徴付けられた突然変異を組み込むことで、一遺伝子性疾患の細胞モデルが作製されている⁶。非臨床的用途のほか、治療に関連する細胞の修飾にもゲノム編集が使用されている。例えば、AIDS に関する試験では、ゲノム編集したT細胞を用いて CCR5の非変異アレルの代わりに HIV 抵抗性型遺伝子が組み込まれている⁷。

3. ゲノム編集のプロセスとツールの基礎

この章では、ゲノム編集のプロセスと使用する主なツールについて簡単に紹介する。詳細については、レビューがいくつか発表されているので参照のこと (Gaj Tら [2013]⁸ など)。

ゲノム編集では、人工ヌクレアーゼを使用してゲノムのターゲット位置で遺伝子を欠失させるか挿入または交換する。この人工ヌクレアーゼは一般にエンドヌクレアーゼ DNA 開裂モジュールと配列特異的 DNA 結合ドメインの2つの要素で構成される。

ヌクレアーゼが二本鎖 DNA を開裂し二本鎖切断 (DSB) が生じる (図1)。DSB は細胞の DNA 修復プロセスを誘導する。修復プロセスには2つの種類がある。相同ドナーフラグメント (対応するアレルまたは外部ドナー DNA) の非存在下では切断端は再結合する。このプロセスを非同源末端結合 (NHEJ) といい、遺伝子機能エレメントの欠失を引き起こす突然変異を伴うことが多い。

部分的に相同なドナー配列 (ゲノムアレル、外部ドナー DNA など) が存在する場合には、相同組換え修復 (HDR) により遺伝子の挿入または交換が生じる。NHEJ と HDR の頻度比は、細胞の種類やドナーの量など、実験条件によって異なる。

このようなヌクレアーゼと配列特異的 DNA 結合ドメインとの組み合わせはカスタマイズが可能で、実質的にすべての配列の認識が可能となるため、目標とする修復プロセスを促すことができる。ゲノム編集に多く使用されている DNA 結合ドメインは、ジンクフィンガー (ZF) タンパク質、転写活性化因子様エフェクター (TALE) タンパク質または CRISPR ガイド RNA (gRNA) である。

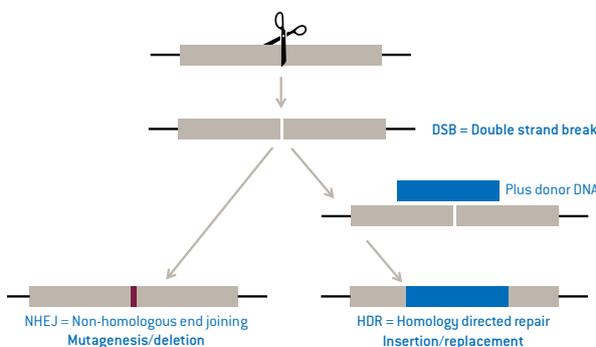


図1. ヌクレアーゼ誘導二本鎖切断後の細胞の修復プロセス (簡略図)

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド 続き

3.1 ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)

ジンクフィンガー (ZF) タンパク質は自然界で存在量が最も多い可変性の DNA 結合モチーフである⁹。個々のジンクフィンガードメインが3つの DNA 塩基対と結合する。ZF タンパク質はモジュール構造であるため、配列特異的に結合する人工分子を設計する際に理想的な枠組みとなる。ZF タンパク質はエンドヌクレアーゼに融合させることができ、この融合体は配列特異的開裂を媒介する。ZFN ベースのゲノム編集テクノロジーは、1996年に Kim ら¹⁰が初めてその原理を証明し、その後さらに発展した。現行世代の ZFN は5~6個のZFDメインを使用している。これらのドメインは15~18 bp のゲノム DNA 伸長鎖を認識するもので、Fok1ヌクレアーゼに融合している。このようなジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質の2つがパートナーとして作用し、ターゲット DNA 配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖に結合する(図2)。パートナーが2つとも結合すると Fok1ヌクレアーゼが活性ダイマーを形成して二本鎖切断を誘導でき、その後の細胞修復プロセスにつながる。ZFN のターゲットは計30~36 bp であるため、高度に特異的なゲノム編集ツールとなる。

3.2 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)

2009年に、転写活性化因子様エフェクター (TALE) がシンプルなモジュール型の DNA 認識コードとなることが発見された^{11,12}。TALE は *Xanthomonas* 属の植物病原性細菌から自然に生じるタンパク質で、DNA 結合反復を含んでいる。この DNA 結合反復はそれぞれが1つの塩基対を認識する。したがって、3塩基対ベースで DNA と結合するジンクフィンガーよりも設計の柔軟性が高いものの、クローニングに関する問題がいくつかある。このように、結合モード以外は、ターゲットングの原理は TALE と ZF でほぼ同じである。配列特異的な人工 TALE も一般に Fok1ヌクレアーゼと融合し*、TALE-ヌクレアーゼ融合体 (TALEN) を形成する。ZFN の場合と同様に、ターゲット DNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖上の13以上の塩基対と結合する TALEN モノマーのペアをターゲットごとに生成しなければならない(図2)。

*他のエフェクター酵素との組み合わせが使用されることもある。

3.3 CRISPR/Cas9 系

1987年に大腸菌で発見された群生性等間隔短回文反復配列 (CRISPR) は、さらにシンプルなゲノム編集ツールとなることが先ごろ明らかになった^{13, 14, 15, 16}。CRISPR 経路は侵入ウイルスに対する防御を担当する細菌免疫系の一部である。この免疫系は真核細胞に使用できるよう適応化されている。CRISPR の特異性を担うのは、いわゆる「ガイド RNA」である。通常、この RNA はターゲット DNA の18~20 bp の相補的伸長鎖に結合し(図2)、また、Cas9ヌクレアーゼとの複合体 (CRISPR 結合ヌクレアーゼ) の形成を助ける配列モチーフもこの RNA に含まれる。Cas9が結合するには、ゲノムのターゲット配列の直後に適切なプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列がなければならない。PAM は結合部位に隣接する NGG モチーフの一つである。ZFN や TALEN とは異なり、CRISPR ベースのゲノム編集の場合、DNA 結

合ドメインはタンパク質ではなく RNA であるためヌクレアーゼと融合しない。したがって、新たなターゲットに必要なのは設計がはるかに容易なガイド RNA であり、マルチターゲットングも行える¹⁶。

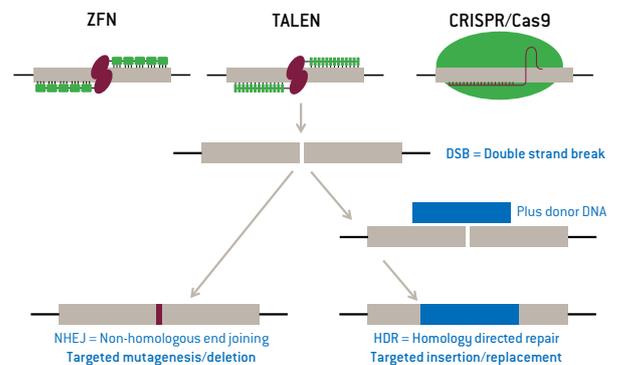


図2. 二本鎖切断およびその後の修復プロセスの配列特異的誘導(簡略図)

3.4 ZFN、TALEN および CRISPR の比較

表1に3つのゲノム編集ツールの特徴をまとめる。簡単に説明すると、ZFN や TALEN では融合タンパク質の生成が必要であるためターゲット部位が変われば新たな人工ヌクレアーゼを設計しなければならず、労力を要する。CRISPR 系の場合、別の配列のターゲットングを行うために生成する必要のあるのは新しいガイド RNA のみである。また、CRISPR では、Cas9ヌクレアーゼをいくつかのガイド RNA と結合させることでマルチターゲットングを行える。

一方、現時点では ZFN および TALEN は CRISPR よりも特異性が高いためにオフターゲット作用のリスクが低い。その主な理由は、ZFN や TALEN でターゲットとする DNA 伸長鎖は CRISPR のターゲット配列よりも長いこと、また活性を有するヌクレアーゼのダイマーを形成させるために2つの分子をパートナーとして使用することにある。この点を克服するために、CRISPR Cas9ヌクレアーゼを「ニックナーゼ」に変異させ、これをセンス gRNA とアンチセンス gRNA のペアと共に使用することで特異性を強化する研究も行われている¹⁷。

最も注目すべき点は、最先端テクノロジーとしての CRISPR の可能性が広く認識されるようになり、個々の用途に合わせてこのツールを最適化する多数の研究が行われていることである。

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド 続き

表1. ゲノム編集ツールの簡単な比較

	ZFN	TALEN	CRISPR
Nuclease	Fok 1	Fok 1	Cas9
DNA binding via	ZF protein	TALE protein	GuideRNA (gRNA)
Type	Fusion protein – High effort to modify for new targeting site	Fusion protein – High effort to modify for new targeting site	Protein + RNA – Easy to modify Multiple targeting possible
Binding site	2 sites (15 or 18 bp each) – High specificity – Low risk for offtarget effects	2 sites (≥ 13 bp each) – High specificity – Low risk for offtarget effects	1 site (18-20 bp + 3bp NGG) – Lower specificity – Higher risk for off-target effects

3.5 同時導入

3つのツールに共通する特徴の一つは、ゲノム DNA を修飾するには対象とする細胞にいくつかの基質（プラスミド、mRNA またはオリゴヌクレオチド）を同時導入しなければならないことである（図3）。特に初代T細胞、ヒト胚性幹細胞（hESC）、人工多能性幹細胞（iPSC）など遺伝子導入が難しい種類の細胞では、同時導入が困難な場合がある。ウイルスを使用しないロンザの Nucleofector™ テクノロジーはこの問題を克服する手段であり、必要なコンポーネント（DNA ベース、RNA ベース、またはタンパク質ベースのものも含む）をさまざまな細胞株、初代細胞および幹細胞に導入できる信頼性ある効率的な方法であることが示されている。Nucleofector™ は、上記のすべてのゲノム編集テクノロジーに適合することが証明されている（表5）。

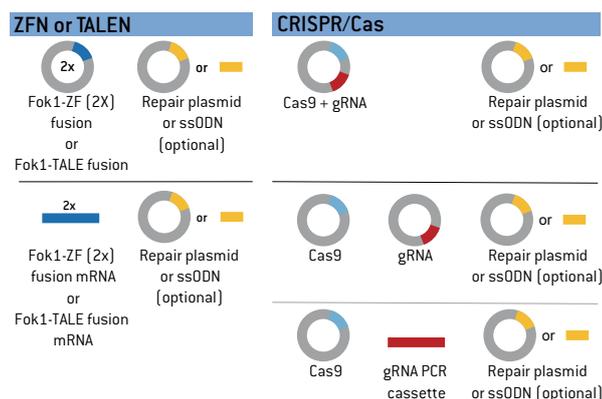


図 3. ZFN、TALEN または CRISPR/Cas9 について想定される同時導入シナリオ この図は、文献で報告されている異なる種類の基質（プラスミド、mRNA またはオリゴヌクレオチド）の組み合わせを示している。ただし、タンパク質の導入など、他のシナリオも考えられる（4.4 章も参照のこと）。

4. ゲノム編集への Nucleofector™ テクノロジー使用

4.1 pmaxGFP™ ベクターによるヌクレオフェクション条件の確立・確認

遺伝子導入が困難な細胞株や初代細胞を含む広範囲の種類の細胞について、ロンザはすぐに使用できる最適化済みプロトコルを提供している（www.lonza.com/protocols）。ゲノム編集実験の前に、当社の pmaxGFP™ 陽性対照ベクターの導入を行ってプロトコルにある最適条件がユーザの実験環境でも良好に機能するかの確認をするよう強く推奨する。最適化済みのプロトコルがない細胞の場合にも、その細胞グループに適用される最適化プロトコルか初代細胞/細胞株を対象とした当社の一般最適化プロトコルに従って pmaxGFP™ ベクターを使用することで、最適なヌクレオフェクション使用条件を簡単に特定できる。例えば、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性幹細胞（iPSC）の場合、ESC/iPSC クローンごとに必要な導入条件がわずかに異なることがあるため、当社の「幹細胞基本プロトコル」の使用を推奨する。最適条件が特定できれば、導入する基質が DNA ベースでも RNA ベースでも（またはその両者であっても）同じ条件を変わず使用できる。

4.2. 最適な基質量の特定

ゲノム編集の成功には最適な基質量を知ることが重要である。表2および表3に発表データにある基質量範囲の例をゲノム編集ツール別に示す。ヌクレオフェクションには20 μL と100 μL のフォーマットがあるため、基質量の範囲は μL 当たりの値として示す。

表2. ZFN について発表されている基質量の範囲

Substrate	Range (per μL Nucleofection volume*)
ZFN plasmid (each)	0.01 – 0.05 μg/μL each
ZFN mRNA (each)	0.02 – 0.2 μg/μL each
Donor plasmid	0.04 – 0.2 μg/μL

*注:ヌクレオフェクションの容量に従って、上記の範囲の20倍または100倍とすること。

表3. TALEN について発表されている基質量の範囲

Substrate	Range (per μL Nucleofection volume*)
TALEN plasmid (each)	0.01 – 0.1 μg/μL each
Donor plasmid	0.05 – 0.2 μg/μL
Donor dsDNA (lin)	0.1 μg/μL
Donor ssODN	10 μM

*注:ヌクレオフェクションの容量に従って、上記の範囲の20倍または100倍とすること。

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド 続き

表4. CRISPR/Cas9について発表されている基質量の範囲

Substrate	Range (per μL Nucleofection volume*)
Cas9/gRNA plasmid	0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Cas9 plasmid	0.02-0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
gRNA plasmid	0.02-0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
gRNA PCR Cassette	0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$
Donor dsDNA (lin)	0.02-0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Donor ssODN	0.5-10 μM
Cas9/gRNA ribonucleoprotein	See references 23 and 24

*注:ヌクレオフェクションの容量に従って、上記の範囲の20倍または100倍とすること。

4.3 mRNA の導入

mRNA はプラスミドに比べ半減期が短いため、ヌクレアーゼの存在時間を最小限に抑え不要な事象を回避したい場合には、プラスミドではなく mRNA を使用すると有益な結果が得られることがある。また、mRNA を使用することで組み込み頻度が高くなることもある^{18,19}。

mRNA を導入する場合にも、各種類の細胞への DNA 導入に最適なプロトコールとプログラムを使用できる。ただし、以下のとおり考慮すべき点がいくつかある。

- mRNA をキャップしポリアダニル化する必要がある。
- プラスミドの場合と同様に mRNA の最適量を求める必要がある。プラスミド DNA に比べ最適量が多くなることがある(表2)。
- 必要量が多い場合には、導入反応に使用する量がサンプル総量の10%を超えないようにすること。
- 導入実験に使用する細胞を採取する際に、血清由来の RNA 分解酵素を除去するために PBS 洗浄ステップの追加が望ましいことがある¹⁹。
- mRNA はサンプルに追加するまで氷上で保存すること。
- 細胞との長時間の接触やその他の理由で mRNA の分解が生じないように、空のキュベットに mRNA を直接入れ、その上に細胞・溶液混合物を加えることができる。その後、導入を直ちに行うこと。

4.4 タンパク質の導入

Nucleofector™ テクノロジーは、ペプチド^{20,21,22}やタンパク質の導入にも適している。開始条件として、核酸について確立されている最適条件の使用を推奨する。ただし、プログラムによっては微調整が必要になる。Kim ら(2014)²³は先ごろ、4D-Nucleofector™ システムを使用して Cas9-gRNA リボヌクレオタンパク質を導入したことを報告している。この実験では、*in vitro* 転写 gRNA と予め混合した Cas9タンパク質が K562、BJ または H9細胞に導入された。別の研究グループは、同様の手法を使用して HEK293T 細胞、初代新生児線維芽細胞および H9細胞に Cas9-gRNA リボヌクレオタンパク質を導入した。使用されたタンパク質量の範囲については、発表文献を参照のこと。

4.5 ゲノム編集の結果に影響する要素

導入効率以外にもゲノム編集実験の結果に影響するさまざまな要素が存在する。例えば、組み込み頻度は選択した細胞の種類によって異なる¹⁸。また、他の導入基質と同様に、ゲノム編集ツールの品質も編集結果に重大な影響を及ぼしうる。市販の、または市販されていないさまざまなツールを Nucleofector™ テクノロジーと組み合わせて使用できることが確認されている(表5を参照のこと)。

HDRによって挿入を行いたい場合には、二本鎖 DNA または一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)を修復テンプレートとして使用できる。ssODN を使用することで単一変異の導入を効果的に行え、シンプルなスクリーニングが可能となる^{18,25}。

5. ヌクレオフェクションの後—選択と拡張

導入の24時間~7日後にクローン選択を開始できる。実験条件ごとに最適時点を特定する必要がある。

クローン数を増加させる方法の一つとして、蛍光タンパク質を共発現するベクターを導入することが挙げられる。この方法を使用すると、FACS 選別で遺伝子導入細胞を濃縮できる。FACS 選別は、単一細胞としての増殖が見込まれない細胞(ESC、iPSC など)をクローニングする場合に限界希釈法の代替法にもなると思われる。

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド 続き

6. 編集事象の解析

ゲノム編集事象の解析はさまざまな方法で行える。一般には、次の方法の1つを用いて、または複数を組み合わせて実施する。PCR または RT-PCR、シーケンシング(ディープシーケンシング、次世代シーケンシングなど)、サザンブロット、ノーザンブロット、変異頻度アッセイ (Cel1アッセイ、T7エンドヌクレアーゼ I アッセイ、SURVEYOR™ ヌクレアーゼアッセイ、RELP 解析などのミスマッチアッセイ)、またはウエスタンブロット(タンパク質ノックアウトを解析)。iPSC については、Yang ら(2014)²⁵が HDR と NHEJ の両者をスクリーニングできる堅牢で使いやすいシステム(ゲノム編集評価システム)を、次世代シーケンシングを使用して開発した。

7. 要約

Nucleofector™ は、遺伝子導入が困難な種類の細胞に複数の基質を導入できる、用途がきわめて広いテクノロジーである。このテクノロジーを ZFN、TALEN または CRISPR によるゲノム編集に使用する際に考慮すべき重要素について、一般的な推奨事項をいくつか述べた。細胞とツールの特定の組み合わせに対する具体的な推奨事項については、対応する発表文献を参照のこと(表5)。例えば、Ran ら(2013)²⁶は CRISPR テクノロジーに関する包括的な背景情報を提示し、ロンザの4D-Nucleofector™ X Unit を HUES9細胞(ヒト幹細胞株)および HEK293細胞に対する CRISPR ベースのゲノム編集に使用する方法を示した詳細なプロトコルを発表している。この文献には、機能解析のプロトコル、オフターゲット作用を抑えるヒントや FAQ も含まれている。具体的な助言が必要な場合には、科学サポートチームにも問い合わせ可能である(www.lonza.com/researchsupport)。

参考文献

1. DiCarlo JE *et al.* (2013) *NAR* 41: 4336-4343
2. Singh P *et al.* (2015) *Genetics* 199: 1-15
3. Wang T *et al.* (2013) *Science* 343(6166): 80-84
4. Shalem O *et al.* (2014) *Science* 343(6166): 84-87
5. Hunt CPJ *et al.* (2015) In: *Neural Stem Cell Assays*, pp. 253-259
6. Yu DX *et al.* (2013) *Cell Stem Cell* 12: 678-688
7. Tebas P *et al.* (2014) *N Eng J Med* 370: 897-906
8. Gaj T *et al.* (2013) *Trends in Biotechnol* 31(79): 397-405
9. Tüpler R *et al.* (2001) *Nature* 409: 832-833
10. Kim CA & Berg JM (1996) *PNAS* 93: 1156-1160
11. Boch J *et al.* (2009) *Science* 326 (5959): 1509-12
12. Moscou MJ *et al.* (2009) *Science* 326 (5959): 1501
13. Jinek M *et al.* (2013) *eLife* 2: e00471
14. Cho SW *et al.* (2013) *Nat Biotechnol* 31: 230-232
15. Cong L *et al.* (2013) *Science* 339: 819-823
16. Mali P *et al.* (2013) *Science* 339: 823-826
17. Sander and Joung (2014) *Nat Biotechnol* 1: 1-9
18. Chen F *et al.* (2011) *Nat Methods* 8: 753-755
19. Hansen K *et al.* (2012) *J Vis Exp* (64): e3304
20. Mollereau C *et al.* (2005) *Mol Pharmacol* 67(3): 965-975
21. Bartels M *et al.* (2007) *J Immunol* 179(11): 7605-13
22. Ruttekalk IR *et al.* (2011) *Mol Pharmacol* 79: 692-700
23. Kim S *et al.* (2014) *Genome Res* 24: 1012-1019
24. Lin S *et al.* (2014) *eLife* 3: e04766
25. Yang L *et al.* (2014) *NAR* 41: 9049-9061
26. Ran A *et al.* (2013), *Nat Prot* 8(11): 2281-2308

Nucleofector™ テクノロジーを用いたゲノム編集

テクニカルリファレンスガイド 続き

表5. Selected publications for genome editing using the Nucleofector™ Technology

Tool	Authors	Citation	Nucleofector™ Platform	Cell types	Substrates
ZFN	Chang <i>et al.</i>	Blood 120:3906–3914, 2012	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC and ESC	plasmid
	Chen F <i>et al.</i>	Nat Meth 8(9):753–5, 2011	Nucleofector™ II/2b Device	K562, HCT116, U2OS, HEK293, HepG2 and MCF7	mRNA, ssODN
	Genovese P <i>et al.</i>	Nature 510:235ff, 2014	4D-Nucleofector™ System	hCD34	RNA
	Hansen K <i>et al.</i>	J Vis Exp [64]:e3304, 2012	Nucleofector™ II/2b Device	K562	plasmid, mRNA
	Ou W <i>et al.</i>	PLoS ONE 8(11):e81131, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
	Piganeau M <i>et al.</i>	Genome Res 23:1182–1193, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	Human ESC and Jurkat cells	plasmid
	Qu X <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 41:7771–7782, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	HIV-infected PBL and CD4 T cells	plasmid
	Robbez-Masson LJ <i>et al.</i>	PLoS ONE 8(11):e78839, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	MCF7	plasmid, mRNA
	Samsonov A <i>et al.</i>	PLoS ONE 8(7):e68391, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	A549	plasmid, mRNA
	Schjoldager K	PNAS 109:9893–9898, 2012	n.d.	HepG2	plasmid, mRNA
	Torikai H <i>et al.</i>	Blood 119(24):5697–705, 2012	Nucleofector™ II/2b Device	Human T cells	mRNA
	Toscano MG <i>et al.</i>	Dis Model Mech 6:544–554, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	K562	plasmid
	Wang J <i>et al.</i>	Genome Res 22:1316–1326, 2012	Nucleofector™ II/2b Device and 96-well Shuttle™ Add-On	K562	plasmid
	Zou J <i>et al.</i>	Blood 118:4599–4608, 2011	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
Yan W <i>et al.</i>	Scientific Rep 3:2376, 2013	Nucleofector™ II/2b Device and 4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid	
TALEN	Cerbini <i>et al.</i>	PLoS ONE 10(1): e0116032, 2015	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC, human NSC	plasmid
	Luo <i>et al.</i>	Stem Cells Transl Med 3(7):821–35, 2014	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
	Mussolino C <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 42(10):6762–6773, 2014	Nucleofector™ II/2b Device	human newborn foreskin fibroblasts, K562	plasmid
	Piganeau M <i>et al.</i>	Genome Res 23:1182–1193, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	Human ESC and Jurkat cells	plasmid
	Reyon <i>et al.</i>	Nat Biotech 30:460–465, 2012	4D-Nucleofector™ System	U2OS, K562	plasmid
	Srikanth <i>et al.</i>	Cell Reports 12:1–16, 2015	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
	Yan W <i>et al.</i>	Scientific Rep 3:2376, 2013	Nucleofector™ II/2b Device and 4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
	Yang L <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 41:9049–9061, 2013	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
CRISPR	Zhu F <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 42(5):e34, 2014	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC and H9 Human ESC	plasmid
	Fu Y <i>et al.</i>	Nat Biotech 31(9):822–826, 2013	4D-Nucleofector™ System	U2OS, K562	plasmid
	Fu Y <i>et al.</i>	Nat Biotech 32(3):279–284, 2014	4D-Nucleofector™ System	U2OS	plasmid
	Kim S <i>et al.</i>	Genome Res 24:1012–1019, 2014	4D-Nucleofector™ System	K562, BJ fibroblasts	ribonucleoprotein
	Lin S <i>et al.</i>	eLife 3:e04766, 2014	96-well Shuttle™ Add-On	HEK293T, human primary neonatal fibroblast and H9 Human ESC	ribonucleoprotein
	Mandal <i>et al.</i>	Cell Stem Cell 15:643–652, 2014	Nucleofector™ II/2b Device	Human T cells, human CD34	plasmid
	Ni W <i>et al.</i>	PLoS ONE 9(9): e106718, 2014	n.d.	Goat fetal fibroblasts	plasmid
	Petit CS <i>et al.</i>	J Cell Biol 202:1107–1122, 2013	Nucleofector™ II/2b Device	HeLa	plasmid, ssODN
	Ran FA <i>et al.</i>	Cell 154:1380–1389, 2013	4D-Nucleofector™ System	HUES62	plasmid, PCR cassette
	Ran FA <i>et al.*</i>	Nat Prot 8(11):2281–2308, 2013	4D-Nucleofector™ System	HUES9 and HEK293	plasmid, PCR cassette
Srikanth <i>et al.</i>	Cell Reports 12:1–16, 2015	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid	
Wang J <i>et al.</i>	PNAS 111(36):13157–13162, 2014	Nucleofector™ II/2b Device	Raji	plasmid	
Yang L <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 41:9049–9061, 2013	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid	

For more publications please refer to www.lonza.com/citations.

培地・試薬

細胞培養の技術情報

ロンザは、長年の経験とイノベーションに裏打ちされた、膨大な種類の細胞培養培地と試薬を提供しています。ロンザは自身の努力とコレラボレーターとの協力により、技術サポートチームはロンザの多彩な培地と試薬に関するプロトコルや詳細な製品情報そして問題解決のためのヒントを提供することができます。本セクションでは、無血清培地での培養、凍結保存と再構成、粉末

培地の準備などに関する手順やヒントを通して、細胞培養技術に関連するよくある質問の多くにお答えします。ロンザの技術サポート部門は、細胞培養や培地に関連するその他数多くの技術的質問や懸念について、カスタマーをサポートする準備を整えています。

無血清培地への馴化

特定の細胞または細胞株を血清を含む培地での増殖から無血清培地での増殖へ移すことは、ウィーニングプロセスを通じて実現されます。ただし、ウィーニングがすべての細胞株に必要なわけではありません。細胞集団を無血清条件下に素早く移行するには、細胞を回収し、無血清培地で再懸濁します。いくつかの細胞型ではこれで問題ありませんが、定期的に培地交換を行った方が良い結果を生む可能性が高くなります。

ウィーニングプロセスにおいて、無血清状態で増殖可能な細胞の部分的集団が選択されます。このような細胞集団を選択は、細胞の物理的かつ栄養学的要素に依存しており、無血清組成が複雑なので困難になります。培養する細胞を UltraCULTURE™ 培地に移行することは比較的簡単です。なぜならこの培地は錯体組成であるためです。他の組成には、タンパク質含有量を少なめにしているものがあります（例：UltraCHO™ 培地や UltraDOMA™ 培地）。または完全にタンパク質やペプチドを含まないものもあります（例：UltraDOMA-PF™ 培地）。実際には、これらの組成を使用する場合はウィーニングプロセス中に通常より若干注意を払う必要があります。しかし、ウィーニングプロセスの手間がかかっても、低タンパクの質無血清増殖環境を作ることでその後の下流処理手順の手間が大きく減少します。

細胞機能の維持は、モニターすべきウィーニングプロセスのひとつといえます。細胞機能に関しては、選択される部分集団が血清の存在下で培養された集団と同じ特性を示すようにする必要があります。これらの機能は多様であり、受容体発現、ウィルス感

受性、モノクローナル抗体産生、および組み換え遺伝子発現などがあります。多くのケースで、無血清状態に細胞が移される場合、産物収率の増大が認められます。しかし、ウィーニングプロセスの間、目的に応じた細胞機能をモニターしてください。

細胞集団を無血清状態に移す際には、2つのプロトコルが推奨されます。これらのプロトコルは、哺乳動物および無脊椎動物の細胞型で使用することができます。最初のプロトコルは、接着しない細胞、または接着が緩やかでトリプシン処理を必要としない細胞で使用できます。これは、血清を含む培地を無血清培地で徐々に希釈する方法です。2つ目のプロトコルは、接着細胞および非接着細胞型の両方で使用でき、血清添加因子を添加した無血清培地を使用し、無血清で増殖が行われるまで各継代培養において血清濃度を順次減少させます。後者のプロトコルは、この細胞型の血清濃度の限度を決定することができるというもう1つの利点があります。いくつかの細胞（特に遺伝子導入される細胞株）は少量の血清を必要とします（0.1~0.5% v/v）。この方法によって血清をより低い限界濃度に調整することができます。2つのウィーニングプロトコルは、次のページに記載されています。ロンザの推奨手順が記載されていますが、特定の用途により良く適合するように修正を加えて使用することができます。ロンザの経験では、交換プロセスで維持される最小細胞密度が結果に大きな影響を与えます。接着非依存性細胞では 3.0×10^5 /ml 以上、接着依存性細胞では30%以上のコンフルエンスが推奨されています。

細胞培養のウィーニングプロトコル

プロトコル#1: 培地交換 – 非接着依存性細胞 (浮遊液)

所要期間: 約2~6週間

培養条件:

- 哺乳動物細胞: 95% Air, 5% CO₂, 35~37°C
- 無脊椎動物細胞: Air, 25~27°C

1. 最大細胞密度の状態での培養を開始します。
2. 注記: 継代培養中にトリプシンに曝露された接着依存性細胞は、プロトコル#2を用いて無血清増殖に切り替える必要があります。
3. 1:2の比率で細胞を無血清培地で希釈します。
4. 最大細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
5. 非接着依存性細胞の場合は1:5比率もしくは 3.0×10^5 細胞/mlに無血清培地で希釈します。接着依存性細胞の場合は30%のコンフルエンスに希釈します。
6. 最大限の細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
7. この時点で生細胞率が >85%であり、また世代時間が血清を含む培地を使用した場合と同等であれば、血清を含む培地用に最適化された希釈のスケジュールにそって無血清培地で培養を維持できます。
8. 細胞の増殖が進まない場合や生存率が低い場合、希釈する比率を3回連続で1:2または1:5に維持します。この期間中、細胞密度は 3.0×10^5 細胞/ml または30%のコンフルエンス以上にしてください。
9. 徐々に希釈する比率を増やし、使用中の細胞型について最大値を得られるようにします。

注記: いくつかの細胞は増殖のために少量の血清を必要とする場合があります。細胞が上記のプロトコルを使用しても無血清培養に順応しなかった場合、0.1%~0.5%の血清を培養物に追加するか、技術サポートまでお問い合わせください。

プロトコル#2: 血清希釈液 – 接着依存性細胞用

所要期間: 約2~6週間

培養条件:

- 哺乳動物細胞: 95% Air, 5% CO₂, 35~37°C
- 無脊椎動物細胞: Air, 25~27°C

1. 最大細胞密度の状態での培養を開始します。
2. 接着依存性培養液をトリプシン処理し、適切な大きさの遠心分離用チューブに移します。接着非依存性細胞は、遠心管に直接移します。
3. 350 × g で5分間遠心分離機にかけて細胞を沈殿させます。
4. 無血清培地に5%血清(v/v)を加え、細胞を再懸濁します。
5. 血清を添加した無血清培地を使用して、細胞密度が接着依存性細胞のコンフルエンス30%を下回らないよう、細胞濃度を調整します。
6. 最大限の細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
7. 希釈するごとに低い血清濃度を低くして手順2~6を繰り返します。5%の血清から開始し、2%、1%、0.5%、0.1%の順に減らしていき、最終的には培養液から血清を除きます。

注記: 培養細胞の生存率が80%未満に低下する場合、または血清濃度の低下後に世代時間が顕著に長くなる場合、再度血清レベルを下げる前に血清レベルを元の値に戻し、2回希釈するの間、細胞数を維持するようにします。このような細胞では、さらに血清濃度を下げる必要があるかもしれません。細胞型の中には、増殖のために少量の血清を必要なものもあります。細胞が上記のプロトコルを使用しても無血清培養に順応しなかった場合、0.1%~0.5%の血清を培養液に追加するか、技術サポートまでお問い合わせください。

凍結保存と再融解

培養細胞の凍結保存と再構成の基本操作

注記: Clonetics™ と Poietics™ のヒト初代細胞と動物細胞には適しません。

凍結保存

1. コンフルエントまたはそれに近い状態のフラスコの細胞を選択します。
2. まずトリプシン処理で細胞を剥離させます。
3. 20%ウシ胎仔血清(カタログ No.14-501)含有の EMEM(カタログ No.12-136)で細胞濃度を 2×10^6 および 8×10^6 細胞/ml に調整します。遠心分離が必要になる場合もあります。
4. 上記の細胞懸濁液を等量の低温(+4℃)凍結保護培地(カタログ No.12-132A)に追加します。
5. 均質化されるように継続的に混合します。
6. 凍結保護培地で懸濁した細胞4 ml を5 ml のガラス製アンプルに移すか、液体窒素の液相または気相状態で凍結するのに適したプラスチック製ねじキャップ付きバイアルに1 ml を移します。
7. 細胞の凍結サイクルを開始できます。凍結前は、凍結保護培地中に1時間以上細胞を置かないでください。
8. その後、アンプル内容物の温度を1分当たり0.5℃~2℃の速度で+4~-30℃の範囲まで下げる必要があります。
9. 温度は-30℃に到達後、-70℃(細胞を保存可能な最高温度)まで急速に下げる場合があります。自動プログラム式凍結システムは凍結速度の調整を行える最も信頼性の高い手段です。
10. アンプルまたはバイアルの保管は-70℃以下で行う必要があります。-196℃(液体窒素)の保管温度が理想的です。再構成を行うまで、アンプル内容物の温度は常に-70℃に保つことが重要です。長期間または無期限の保存には液体窒素の使用が特に推奨されます。ドライアイスまたは冷凍庫(-70℃)での保管期間は3ヶ月未満にしてください。

アンプル取り扱いに関する推奨項目

アンプルの受け取り

受け取ったら直ぐにアンプルを配送容器から-70℃フリーザーまたは気相段階にある液体窒素に移します。長期間の保存(3ヶ月以上)には、生細胞率の著しい低下を防ぐために、気相での窒素タンクの使用が望ましいでしょう。ねじキャップ付きアンプルを液体窒素に浸すことは推奨されません。

使用方法

⚠ 注意: 保護マスクと保護服を着用してください。アンプルが破裂する恐れがあります。

1. アンプルをフリーザーから取り出し、37℃の水槽に入れます。アンプルを水中に沈めたり、水面がキャップより下にならないようにしてください。
2. 解凍後、70%イソプロパノールでアンプルを滅菌してから、クリーンベンチ内で滅菌状態で開封します。適切な増殖培地を用いて1:10の比率で希釈してください。
3. トリバンブルー除去細胞カウント法で解凍された生細胞率と細胞濃度を測定します。
4. 播種培養容器に合わせて細胞濃度を調整します。
5. 細胞の播種後24時間経ったら培地を取り除き、適切な増殖培地を追加して再度培養します。6を実行しない場合は、この時に凍結保存剤を取り除きます。
6. 代替手段として、遠心分離による生細胞率の測定前に凍結保存剤を取り除いてもかまいません。低速で10分間、再懸濁された細胞を遠心分離(200 Xg)によって取り除きます。上清は除去され、細胞は適切な増殖培地で再懸濁されません。

参考文献

Freshney, R.I. (2000) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th edition*, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 297 – 308.

細胞数の決定

浮遊培養または分散単層培養の細胞数を測定のために血球板を使用することは便利で実用的な方法です。血球板は、2つのチャンバーで構成されており、それぞれは9つの1.0平方ミリメートルの区画に分割されています。これらの区画の0.1 mm 上部はカバーガラスによって覆われ、各区画の容積は1.0 mm × 0.1 mm、0.1 mm³または10⁻⁴ cm³となっています。1 cm³が約1 ml に相当するため、ml 当たりの細胞濃度は、区画 × 10⁴当たりの平均カウント数になります。

■ 血球板のカウントでは、以下の原因でエラーが発生する可能性があります。

- サンプル内の細胞分布が均一でない
- チャンバーが不適切な内容物で満たされている
- 境界線、または互いに接触している細胞のカウントの方法が誤っている
- 統計的エラー

チャンバー内の総容積は、無作為のサンプルを表わしたものであることが前提になっています。懸濁液が個別の分離細胞から構成されていない限り、これは有効な前提とはなりません。血球板チャンバー内の細胞分布は、粒子質量ではなく、粒子数に依存しています。従って、細胞が塊を作り、単一細胞と同様に分布することにより、最終結果が歪められてしまう可能性があります。90%以上の細胞が他の細胞と接触していない場合を除き、新しいサンプルでカウントをやり直した方がよいでしょう。均一化された懸濁液を取得するのが難しい、または懸濁液中の大きな細胞の塊を避けることができない細胞は、核を分離することによってカウントできます。この方法は、細胞を直接カウントするよりも時間がかかります。また対象集団に複数核をもつ細胞が含まれている場合、別のエラーが発生することになります。サンプルを採取する前に細胞が静置されていた場合、サンプルは母集団を適切に表してはいません。サンプルを採取する前に、細胞懸濁液を常によく攪拌してください。10X 対物レンズおよび10X 接眼レンズを用いて、約1平方(1 mm²)で顕微鏡視野を埋めます(血球板グリッドを表わす円)。細胞懸濁液を希釈し、各平方 mm 内に20~50の細胞が存在するようにします(2~5 × 10⁵ 細胞/ml)。カウントエラーは総カウント数の平方根に近似するため、全部で300~400の細胞がカウントされるようにします。一般的には、左側と上側の(三重線のうちの)中央線に触れている細胞をカウントし、右側と下側で同様の位置にある細胞はカウントしません(図参照)。

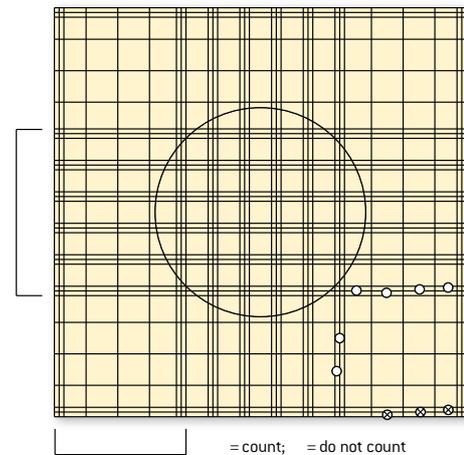


Diagram of a hemacytometer, improved Neubauer ruling, 0.1 mm deep Brackets indicate 1 mm² squares. Circle is the approximate area covered at 100X magnification.

毛細管現象によって血球板のチャンバー内を適切に埋めるため、使用されるカバースリップ、チャンバーおよびピペットは清潔にしておく必要があります。チャンバーとカバースリップは、最初に蒸留水で洗浄し、それから無水エタノールで洗浄して、拭いて乾かします。血球板のカウントでは、生細胞と死滅細胞を区別しません。これを区別するために便利な染色法が数多くあります。とりわけトリパンブルー(エリトロシン B、ニグロシン)は生細胞では細胞膜によってはじかれますが、損傷細胞または死滅細胞の核は染色されます。この識別は完全には認められていないものの、シンプルであるという長所があり、概算値を得るには良い方法です。20%以上の細胞が染色される場合、結果には大きな意味があります。

細胞数の決定

続き

材料

1. 汚れのない血球板およびガラスカバースリップ
2. パスツールピペット
3. ハンクス平衡塩 (HBSS) (カタログ No.10-543)
4. トリパンブルー、BSS で0.4%(カタログ No.17-942E)
5. 顕微鏡
6. 試験管 (12 × 75 mm)
7. 手動計数器
8. 細胞懸濁液

手順

1. トリパンブルー0.2 ml を HBSS 0.8 ml で希釈します。
2. ガラスカバースリップを血球板のチャンバーに設置します。
3. 0.5 ml の攪拌した細胞懸濁液を、12 × 75 mm 試験管に移し、0.5 ml の希釈トリパンブルーを追加します。
4. パスツールピペットを使って、毛細管現象により、血球板の両チャンバーを(液が溢れないように)満たします。数秒以内に、重力により試験管とピペット内で細胞が沈降します。作業はすばやく行ってください。
5. 10X の接眼レンズと10X の対物レンズの顕微鏡を使用して、10平方(各1 mm²)毎に細胞をカウントします。細胞の10%以上が細胞塊である場合、全手順を繰り返します。10平方内の細胞数が200未満または500以上である場合は、より適切な希釈係数で繰り返してください。
6. 以下のように、1 ml 毎の細胞数と元の培養液中にある細胞総数を計算します。
$$\text{細胞/ml} = \text{平均カウント/平方} \times 10^4 \times \text{希釈係数 (例:0.5 ml の細胞に0.5 ml のトリパンブルーを加える場合)}$$
$$\text{総細胞数} = \text{細胞/ml} \times \text{サンプルが取得された調整細胞の総量}$$
7. カウントを繰り返して再現性を確認します。

粉末培地の調整

ろ過用培地の調製

粉末培地および塩混合物は極めて吸湿性が高いため、大気中の湿気から保護する必要があります。各パッケージの内容物は、開封後は直ぐに使い切ってください。濃縮した状態で培地を調整することは推奨されません。これは遊離塩基アミノ酸の中に低い溶解度係数をもつものがあり、濃縮溶液では不溶性の錯塩が析出する可能性があるからです。UltraCHO™ 培地(カタログ No.15-724)を除き、粉末製品には重曹は一切含まれません。添加因子は、ろ過前に追加するか、または培地に無菌状態で導入します。

注記:添加因子の性質は培地の保管条件と有効期限に影響を及ぼす場合があります。

手順

1. 最終容量と可能な限り近い容量をもつ適切な容器を選択します。脱イオン水または蒸留水の最終容量の90%を量り分けます(500 ml から200 L の容量まで、細胞培養用の水をロンザからご購入いただけます)。
2. 静かに攪拌しながら、粉末培地または塩混合物を添加します。溶解するまで攪拌を続けます。水は加熱しないでください。
3. 少量の脱イオン水または蒸留水で元のパッケージをすすぎ、溶液に追加します。
4. 用意された培地の最終容量1リットル毎に、重曹および/または必要量の L-グルタミンを溶液に追加します(以下の表を参照)。完全に溶解するまで攪拌を続けます。
5. 攪拌中に、理想の pH よりも0.2~0.3低い値に pH を調整します。1 N HCl または1 N NaOH を使用してください。ろ過によって pH は通常0.1~0.3上昇します。
6. 追加の脱イオン水または蒸留水を加えて、最終容量になるよう培地を調製します。
7. 0.22ミクロン以下のフィルターを使用してろ過することにより、速やかに滅菌します。CO₂の損失を軽減するには、不活性ガス(窒素)の陽圧(3~15 psi)でろ過してください。培地の pH が変化するため CO₂の使用は推奨されません。
8. ろ過後、滅菌容器に無菌的に移します。使用準備が整うまで培地を2~4℃の暗所で保存します。

炭酸水素ナトリウム添加表

Product Description	カタログ番号	NaHCO ³ Solution ml/L	NaHCO ₃ Powder g/L
		17-613	15-613
DMEM w/L-glutamine	15-604	49.3	3.700
DMEM w/o L-glutamine	15-614	49.3	3.700
MEM Eagle w/L-glutamine	15-611	29.3	2.200
RPMI w/L-glutamine	15-702	26.7	2.000

L-グルタミン添加表

Product Description	カタログ番号	L-glutamine Solution ml/L	L-glutamine Powder g/L
		17-605	15-605
DMEM w/o L-glutamine	15-614	20.0 [4.0 mM]	0.585 [4.0 mM]

哺乳類細胞の継代培養のための準備

注記: Clonetics™ と Poietics™ のヒト初代細胞と動物細胞には適しません。

細胞培養では、しばしば細胞を継代培養する必要が生じます。継代することによって、細胞数を増やす、または用途に応じた培養容器に細胞を移すことができます。細胞を1つの培養容器から取り除き、別の容器に移すには数多くの方法があります。細胞は以下の方法によって、付着している表面から剥離させることができます。

- 機械的な手段(スクレーピング)
- キレート剤、エチレンジアミン四酢酸[EDTA]
- 酵素(トリプシン、プロナーゼ、コラゲナーゼ)

酵素およびキレート剤はしばしば併用されます。トリプシンはブタ膵臓の含水粗細胞抽出物です。トリプシンは、細胞を表面や無傷組織から取り除くために使用される最も一般的な方法です。トリプシン組成にはトリプシンに加えて他のプロテアーゼ、リパーゼ、カルボヒドラーゼが含まれるため、トリプシンという名称は少し誤っています。膵臓が産生する数多くの消化酵素が、トリプシン組成にも含まれると考えられます。純粋な結晶トリプシンを使用することも可能ですが、これは粗トリプシンよりも高価で、特に細胞を無傷組織から調製した場合は、粗トリプシンほど働かない場合が多くあります。

トリプシン活性の最適条件は pH7.6~7.8、温度37°Cです。トリプシンの効果は、細胞同士または基質表面に結合する細胞内基質を分解することです。

トリプシン活性に対する化学的基準はありません。ロンザはトリプシンの品質保証試験を実施しており、標準時間内に、損傷を引き起こすことなく、どれだけ基質表面から細胞を剥離するかを測定しています。これは滅菌用通常試験に並行して実施されます。通常トリプシンは、0.05%~0.25%濃度で使用されます。ただし用途によっては、この範囲以外の濃度が必要になることもあります。Versene®(EDTA)は、トリプシン活性を高めるため効率的な細胞剥離に必要なトリプシン濃度を下げることができます。

濃縮トリプシン(2.5%、カタログ No.17-160)は、カルシウムやマグネシウムを含まない平衡塩溶液(BSS)(ハンク BSS、カタログ No.10-543、またはダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、カタログ No.17-512)で希釈してください。溶液が低張となって細胞に損傷を与えるため、水による希釈は推奨されません。生理食塩水単独による希釈も細胞に損傷を与えます。

トリプシン処理の手順

細胞培養は、コンフルエントまたはそれに近い状態になると、通常継代培養されます。原則として、最初にコンフルエントになってから継代培養されるまでの時間が長くなればなるほど、トリプシンが作用するまでの時間が長くなります。

1. 培養容器から培地を別の容器へ移します。血清はトリプシン活性を阻害するため、血清を含む培地は完全に除去する必要があります。
2. トリプシン/Versene®(カタログ No.17-161)を添加する前に、細胞の層をカルシウムやマグネシウムを含まない BSS ですすぎます。単層を BSS で完全に覆ってください。このすすぎはすぐに終わりますが、最長4時間まで細胞層上に BSS を残しておいてもかまいません。

3. すすぎに使用した培地を洗い流します。トリプシン/Versene® は、各容器に以下のように添加します。

75 cm ² フラスコ	2.5 ml~5.0 ml
150 cm ² フラスコ	5.0 ml~10.0 ml
850 cm ² ローラー瓶	10.0 ml~20.0 ml

4. 単層はトリプシン/Versene® で完全に覆ってください。トリプシン/Versene® のロットが異なると、強度が異なる場合があるため、最初の30秒間、室温でトリプシン処理をモニターすることが推奨されます。これによって、トリプシン処理が過剰な速度で進んでいなか確認することができます。
5. その後、細胞容器を手のひらで軽く叩いて細胞が剥離するか確認します。容器を垂直に明かりの下にかかげて、容器面から剥がれ落ちている細胞層を探します。単層全体が剥離したら、手順#6に進みます。そうでない場合は37°Cでインキュベートし、1分毎に容器を観察して剥離状態を確認します。培養容器を再度手のひらで叩いて、すべての細胞が剥離したことを確認します。培養容器をインキュベーターから取り出します。

哺乳類細胞の継代培養のための準備

続き

6. 10%血清を添加した培地を入れた容器に剥離したすべての細胞を直ぐに移します。培地と細胞をピペットで吸引して容器に移し、残りの細胞をすべて取り除きます。ばらばらに分離した細胞を得るために、小さなボアピペットを使用して可能な限り完全にこの吸引を行うことが重要です。細胞が分離していない場合、新しい培養液に数多くの微小コロニーができる場合があります。容器に移した細胞は、スターラーバーを使って渦が発生しない速度(約100~200 rpm)で攪拌するか、手で攪拌します。この時点で、使用されるトリプシン/Versene® 量の少なくとも10倍の血清を含む培地を追加することが大切です。これによって、消化酵素が阻害されます。
7. ピペットで吸引した懸濁液に新鮮な培地を十分追加して、その総量が2つの培養容器底面を覆うようにします。各容器の底面積は、最初の培養容器と同じになるようにします(または最初の容器の2倍の底面積を持つ単一の培養容器を使用します)。分割比は1:2になります。増殖の盛んな細胞集団に対しては、別の分割比を適用してもよいでしょう。
8. 1つ(または複数)の培養容器を37℃でインキュベートします。
9. 1:2分割を行う際、ヒト2倍体細胞の継代培養は3~4日のスケジュールを厳守してください。この間にコンフルエントな細胞層ができます。余分な細胞は凍結し、液体窒素で保存できます。
10. 無制限に培養の可能な母集団は、コンフルエントな状態になる度に連続的に継代培養できます。培養細胞が、有限倍化能力をもつ2倍体集団である場合、各1:2継代培養(分割)において、集団倍化レベル(PDL)数を1つずつ増やします。
11. 繰り返し1:2分割(週に2回)を行うことにより、培養容器の数が幾何学的(1、2、4、8、16、32、64など)に増大します。これは短期間で達成でき、さまざまな用途で大量の培養を行うことができます。
12. 連続的に継代しつづけると最終的にその株は失われますが、可用性が失われるわけではありません。なぜなら凍結アンブルはほぼすべての代で取得でき、のべで最大約50分裂回数まで連続継代を再開するために細胞株を復元できるからです。この手順を繰り返すことによって、取得可能な細胞数はあらゆる実際の目的のためにほぼ無限大となります。
13. ヒト胚2倍体細胞株は、*in vitro* でおよそ50回の1:2継代培養または細胞分裂寿命持ちます。寿命がくると、細胞は分割を停止し、最終的には死に至ります。
14. 1:2よりも高い分割比を使用すると、特定の細胞密度または培養容器数を得るのに必要な操作を最小化できるという利点があります。ヒト胚2倍体細胞株は、*in vitro* で細胞分裂を有限回数行うため、終了した分裂回数を記録する必要があります。1:2の分割比では、単純に“1”を各分割に足します。なぜならこの比率によって、1集団が倍加されるからです。より大きな分割比も使用できます。例えば、1:4の分割比は1:4分割毎に2倍化を行います。1:8分割比は1:8分割毎に3倍化を行います。分裂停止の条件を知るために、終了した細胞分裂回数を記録すること重要です。
15. ヒト2倍体細胞は分裂によって増殖するため、母集団数の増加は、以下のように細胞毎に発現する可能性があります。

1	2	4	8	16	… 細胞数
0	1	2	3	4	… 母集団倍化レベル

参考文献

1. Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Research* 25:585.
2. Hayflick, L. (1970) Aging under glass. *Exp. Geront.* 5:291.
3. Hayflick, L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37:614.
4. Hayflick, L. (1968) Human cells and aging. *Scientific American* 218:32.
5. Hayflick, L. (1973) Subculturing human diploid fibroblast cultures. *Methods and Applications of Tissue Culture* Eds. Patterson, M.K. and Kruse, P.F., Academic Press, N.Y.
6. Freshney, R.I. (1983) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, Inc., New York.

電気泳動・分析

FAQ

電気泳動とアガロース

Q. アガロース電気泳動では、どのような緩衝液条件で最良の分解能を得ることができますか？

A. 回収の必要がない小さな DNA 断片 (<1,000 bp) では、1X TBE 緩衝液の使用が推奨されます。ゲルを TBE 緩衝液で作成すると、TAE 緩衝液で作成したゲルよりも鮮明なバンドが得られます。TBE はより良い分解能をもたらし、間隔が狭く鮮明な DNA バンドの形成を可能にします。

大きな DNA 断片 (>15,000 bp) では、1X TAE 緩衝液の使用が推奨されます。TAE の緩衝能力は TBE よりも低いいため、長時間電気泳動を行う場合には、緩衝液を再循環させるか、定期的に陽極チャンバーと陰極チャンバーの間で緩衝液を攪拌する必要があるかもしれません。緩衝液不足となる時間は、ボルト/時間或使用されるチャンバーの大きさによって異なります。ゲル上での緩衝液の深さは3~5 mm にしてください。緩衝液が少なすぎると、ゲルが乾燥する可能性があります。緩衝液が多すぎると、陽極と陰極間の回路抵抗が低下し、ゲル全体の電圧勾配が低下します。これによって DNA の動きが不十分となり、余分な発熱やバンドの変形が生じる恐れがあります。

Q. 最良の分解能を得るにはゲルをどのようにキャストすべきですか？

A. ロンザでは、通常ゲルを3~4 mm の厚さでキャストします。必要となるゲル量は、キャストチャンバーの底面積を測定し、ゲルの厚さに乗じることによって簡単に見積もることができます。薄いゲルは、GelBond® サポートフィルムおよび/または垂直装置に使用できます。

電界側のコームの厚さも、分解能に大きな影響を与えます。薄いコーム(1 mm) は DNA バンドの幅を狭めます。コームが厚過ぎると、分離した DNA バンドはかなり幅広くなります。

Q. DNA のバンドが時々波状になります。しかしそのようになるのは1つまたは2つのレーンのみです。この原因は何ですか？

A. コームの歯に付着した乾燥したアガロースが、原因になることがあります。ゲルを作る前に、コームの歯についた残余乾燥アガロースを確認してください。取り除かないと、これが新規に作成されたアガロースと付着してコームを取り除く際にウェルを壊します。これはゲルがトランスイルミネーター上になければ通常観察されません。さらに、低温融解アガロースを使う場合、コームをはずすときは特に細心の注意を払う必要があります。ゲルをあらかじめ4℃で30分間冷却する、および/またはコームをはずす前にゲルを冷たい緩衝液で洗浄することによって、ゲルを維持することができます。

Q. ウェルあたりの DNA 量はどのくらいですか？

A. ウェルあたりの DNA 量は状況によってさまざまです。最も重要なことは、分解したいバンドに DNA がどれだけ存在するかということです。エチジウムブロマイドで安定的に検出される最小 DNA 量は、約10 ng です。エチジウムブロマイドで染色したゲル上で鮮明なバンドとして検出できる DNA 量は約100 ng です。GelStar® 染色などのさらに高感度の染色法を用いると、染色されるゲル上の DNA 量は少なくなります。GelStar® で染色したゲルでは、わずか20 pg の dsDNA を検出できます。ウェル上への最適な DNA 量は、目的のバンドに存在する総 DNA 量比によって計算されます。DNA の出現量が定かでない場合は、可能であればいくつかのレーンにさまざまな量を使用してください。

ウェル上の DNA の最適量は、目的のバンドに存在する総 DNA 量の比率から計算できます。計算方法は以下のようになります。

$$\frac{\text{目的の断片 [kbp]}}{\text{DNAサンプルのサイズ [kbp]}} \times 100 = \% \text{目的のバンド中の DNA}$$

注記: 鮮明なバンドを形成する最大 DNA 量は約100 ng です。

例: DNA サンプルサイズは48.5 kbp でゲル上で泳動させると、8断片に分離します。目的の断片は2.3 kbp です。

計算方法: 1 μg の DNA を使用する場合、使用されたサンプル1 μg の4.7%が目的の断片として示されます (47 ng)。

$$\frac{2.3 \text{ kbp}}{48.5 \text{ kbp}} \times 100 = 4.7\% \text{目的のバンド中の DNA}$$

バンドをさらに鮮明にするには、スクロースまたはグリセロールベースのローディングバッファーの代わりに、ロンザ DNA ローディングバッファー(カタログ No.50655)などの Ficoll® ベースのローディングバッファーをご使用ください。低分子量のグリセロールを使用することによって電気泳動の U 字型のバンドが生じないよう DNA がウェルの側面に並ぶようにします。

イオン強度が高すぎるローディングバッファーは、バンドを不鮮明にする原因となる可能性があります。理想的には、DNA サンプルには泳動緩衝液と同じ溶液を使用すべきです。これが不可能な場合は、泳動緩衝液よりも弱いイオン強度をもつサンプル緩衝液を使用してください。

FAQ

続き

Q. アガロースゲルにどの程度の電圧をかけるべきですか？

- A. 通常の水平電気泳動では、4~10ボルト/cm でアガロースゲルに電圧をかけるよう推奨されます(cm はゲル長ではなく電極距離を測定することによって決定します)。電圧が高すぎる場合、特に DNA >15 kb を使用する場合はバンドの線が生じる可能性があります。電圧が低すぎると、小型 (<1,000 bp) DNA の泳動性が弱まり、拡散によってバンド幅が拡大します。

MetaPhor™ アガロースゲルは、標準水平電気泳動システムにおいて、4.5~5ボルト/cm で DNA を最適に分離します。電圧が高すぎると、主にゲルの過熱により DNA の分解能が弱まります。もう1つの特殊なケースとして、通常の水平電気泳動を用いた大型 (>15 kb) DNA 断片の分離があります。この場合の最良の分離は <5ボルト/cm の電圧勾配で得られます。

Q. NuSieve™ 3:1と NuSieve™ GTG™ アガロースの違いは何ですか？

- A. NuSieve™ 3:1アガロースは、標準融点アガロースです。NuSieve™ 3:1アガロースの分解範囲は50 bp~1000 bp です。NuSieve™ 3:1アガロースは、分析用電気泳動向けに設計されています。ゲル強度が高いため、様々なプロットティングに最適な製品となっています。NuSieve™ GTG™ アガロースは低温融解アガロースです(4%で ≤65℃)。このアガロースの分解範囲は50 bp~1000 bpです。NuSieve™ GTG™ アガロースは、クローニング、連結、形質転換などへの使用が推奨されます。

Q. GTG™ アガロースとは何ですか？

- A. GTG™ は、Genetic Technology Grade™ の略です。GTG™ 等級アガロースは、予備的な DNA 電気泳動または酵素による DNA 操作が必要な場合に推奨されます。これらのアガロースは、標準的な分子生物学の実験に最大限対応できるように試験されています。

プレキャストアガロースゲル

Q. Reliant™ および Latitude™ プレキャストゲルを使用するために専用のチャンバーを購入する必要がありますか？

- A. Reliant™ および Latitude™ プレキャストアガロースゲルは、標準水平電気泳動チャンバーで使用するように設計されています。ゲル用チャンバープラットフォームに設置可能であれば使用に適しています。チャンバープラットフォームを測定し、対応するプレキャストゲルのサイズを確認してください。例えば、OWL® Centipede™ チャンバーは、14 cm × 24 cm Latitude™ HT プレキャストゲルに最適です。一方、OWL® B1 EasyCast™ チャンバーは、Reliant™ プレキャストアガロースゲルに適しています。また Latitude™ チャンバーは、Latitude™ ミディゲルに最適です。結果はチャンバーの大きさや構造によって変化することがあります。

Q. FlashGel™ カセットの成分は有害ですか？

- A. FlashGel™ カセットに含まれる染色液は、OSHA および EU 危険物基準では、含有分程度の少量であれば有害とみなされていません。MSDS をオンラインで入手できます。カセット内の染色液は突然変異誘発物質となる可能性があります。取り扱い時は、手袋、安全眼鏡、研究用作業服を着用してください。カセットの取り扱いと処理を行う際は、エチジウムブロマイドで染色したゲルと同じ取り扱いおよび廃棄時の注意に従ってください。

FAQ

続き

PAGEr™ プレキャストゲル

Q. 所有しているゲルチャンバーに適しているのは、どのPAGEr™ プレキャストゲルですか？

A. PAGEr™ プレキャストゲルは、9 cm × 10 cm および 10 cm × 10 cm のサイズで販売されており、ほとんどのミニ垂直システムに適しています。チャンバーによっては、PAGEr™ プレキャストゲルに最適となるように調整を行う必要があります。

Standard Vertical Systems	PAGEr™ ゲル
PAGEr™ Minigel Chamber	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
Bio-Rad® MiniPROTEAN® II, MiniPROTEAN® 3, Mini-PROTEAN® Tetra, Mini-PROTEAN® Dodeca™ and Ready Gel® Cell Systems Reverse the inner core gasket so the flat side faces outward.	9 cm × 10 cm
Novex® XCell SureLock® Mini-Cell or XCell II Request the spacer for the XCell SureLock®, Mini-Cell Chamber from Scientific Support, (Cat. No. 59900).	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
FisherBiotech® Vertical Minigel FBVE121, Owl Separations Systems Wolverine™ P82 Chamber comes with 2 sets of wedges. Use the thinner wedges for the PAGEr™ Gold ゲル.	10 cm × 10 cm
FisherBiotech® Vertical Minigel FB-VE101, Owl Separations Systems Penguin™ Model P8DS Request adaptor for these chambers from Scientific Support, (Cat. No. 59902).	10 cm × 10 cm
Hoefler® Mighty Small™ (SE250) Replace the buffer chamber with a 'Deep lower buffer chamber for the SE260', order number 80-6148-78, from GE Healthcare.	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
Daiichi 2, ISS chambers To run one gel: Place one 10 × 10 cm cassette on wedge side of chamber. Use suitable buffer dam on the other side. Use regular Daiichi/ISS wedges. To run two gels: Widen the hole on the yellow port of the inner core. Replace the long arm wedges with modified wedges. This chamber modification and new wedges are available from Scientific Support.	10 cm × 10 cm
Hoefler® Mighty Small™ (SE260)	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm
EC 120 Mini Vertical Gel System	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm
Biometra® Mini V Chamber	9 cm × 10 cm
CBS Scientific MGV System, (10 cm × 8 cm units)	9 cm × 10 cm
Sigma-Aldrich Mini Techware (11.3 cm × 10 cm units)	10 cm × 10 cm
Zaxis System 2000	10 cm × 10 cm
Hoefler® Mini VE	10 cm × 10 cm

* Recommended for best fit.

Q. ロンザ PAGEr™ プレキャストゲルには濃縮用ゲルが含まれますか？濃縮用ゲルの目的は何ですか？

A. PAGEr™ Gold プレキャストゲルには、pH 8.6の4%濃縮用ゲルが含まれています。濃縮用ゲルを使用すると、ゲル濃縮/分解境界において、タンパク質が凝集して濃縮（つまり堆積）されます。この濃縮効果により、よりよい分解能が得られます。

Q. 非変性ゲルを使いたいと考えています。どの製品がこれに該当しますか？

A. PAGEr™ プレキャストゲルは、SDS またはその他の変性物質（例: DTT や β-ME）を含みません。さらに、SDS を含まないトリス-グリシン泳動緩衝液を使うこともできます。

FAQ

続き

タンパク質電気泳動

Q. トランスファー、泳動、サンプル緩衝液の組成は？

A. トリス-グリシンゲル(Tris-HCl 緩衝液システム)

Towbin transfer buffer [1X]	Running buffer [1X]	Sample buffer [1X]
0.025 M Tris base	25 mM Tris Base	62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8
0.192 M Glycine	192 mM Glycine	2% SDS*
0.05 – 0.1% SDS*	0.1% SDS*	10% Glycerol
20% Methanol		0.01% Bromophenol Blue
		2.5% bME [2-mercaptoethanol]*

* Omit for native proteins. For best results use Lonza AccuGENE™ Electrophoresis Buffers

Q. グラディエント vs. 均一(単一濃度)ゲルの違いは何ですか？ どちらを使用すべきですか？

A. グラディエントゲルは、幅広いサイズの分解に適しています。均一または単一濃度ゲルは、目的のタンパク質が狭いサイズ範囲に収まることがわかっている場合に適しています。

Q. ゲルに載せるタンパク質量はどれくらいですか？

A. タンパク質量は、サンプルの純度や使用される染色方法によって異なります。高純度のタンパク質では、ミニゲルのレーン毎に、0.5 µg~5 µg のタンパク質で通常は十分です。溶解した細胞のような混合物には、レーン毎に50 µg のタンパク質が必要となる場合があります。

タンパク質の染色液ごとの検出限界

Protein stain	Lower detection limit [protein/band]
Coomassie® Blue Stain	30 ng
Silver Stain	2 ng
SYPRO® Red Protein Gel Stain	4 ng – 8 ng
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	2 ng – 8 ng
SYPRO® Tangerine Protein Gel Stain	4 ng – 8 ng
ProSieve™ EXSafe Stain	8 ng – 15 ng

NOTE: Limits are based on optimal detection methods for each stain.

Q. ウェスタンブロットングに最適なメンブレンは何ですか？

A. 最適なメンブレンは以下の表を参照してください。

Nitrocellulose	PVDF	Nylon
Hydrophobic binding	Hydrophobic binding	Hydrophobic and electrostatic binding
General purpose membrane	SDS tolerant	Stable if baked
Low background	High background	High background
Low strength	High strength	High strength
Becomes brittle if baked	Suitable for protein sequencing	Least suitable for Western transfer

Q. タンパク質のゲル電気泳動にアガロースを使用する利点とは何ですか？

A. アガロースゲルを用いたタンパク質の電気泳動は、ポリアクリルアミドの代替手段であり、いくつかの利点があります。

- 高分子量(>600 kDa)のタンパク質を分離
- 調製や取り扱いが簡単
- タンパク質の回収が効率的
- 使用されるタンパク質を免疫動物に直接使用して抗原産生を行える
- 毒性無し
- 垂直または水平装置を用いたゲルの利用

アガロースの種類

適切なアガロースの選択は、対象となる DNA やその後に必要となる操作によって異なります。ゲル化/融点、電気浸透、ゲル強度はすべて用途に合致するアガロースを選択する際の重要なポイントになります。ロンザのアガロースの仕様については、443 ページを参照してください。

Genetic Technology Grade™ (GTG™) アガロース

ロンザの Genetic Technology Grade™ (GTG™) アガロース製品は、分子生物学に使用する PCR 産物などの核酸のために特別に調製されています。ロンザの GTG™ アガロースの品質検査では、DNase や RNase 試験などの標準的なアッセイだけでなく、酵素パフォーマンス測定なども実施されます。追加の試験をすることで製品全体の品質や信頼性についてさらに高めています。生物学的に活性化された DNA を得るためにロット毎にアガロースをチェックする必要があります。

■ 以下のアガロースは GTG™ 認定済みです。

- SeaKem® GTG™ アガロース
- SeaPlaque™ GTG™ アガロース(低温融解アガロース)
- NuSieve™ GTG™ アガロース(低温融解アガロース)
- SeaKem® Gold アガロース

■ ロンザは GTG™ 認定製品に対し、以下の試験を実施しています。

アガロース:

- DNA 結合
- DNase および RNase 活性
- DNA 分解能
- エチジウムブロマイド染色後にバックグラウンドが発光するゲル
- クローニング(低温融解アガロース)
- 制限酵素処理(低温融解アガロース)
- 制限酵素切断 – ライゲーションアッセイ(SeaKem® GTG™)

分子生物学等級アガロース

分子生物学等級アガロースは、一般的な DNA の分離分析に適しています。

■ 以下のアガロースが、分子生物学等級アガロースとされています。

- MetaPhor™ アガロース
- SeaKem® LEアガロース
- NuSieve™ 3:1アガロース
- SeaPlaque™ アガロース(低温融解アガロース)

■ ロンザは以下のパラメータについて、分子生物学研究グレードのアガロースをスクリーニングしています。

- DNA 結合
- DNase および RNase 活性
- ゲルバックグラウンド染色

FDA 認可

ロンザのアガロースは、クラス1医療機器の分類で登録番号1219614にて認可登録されています。

アガロースゲルの調製

アガロース濃度と染料の移動度

表 1: 特定用途のためのアガロース

Size Range (base pairs)	Agarose Type	Application
20 – 800	MetaPhor™ Agarose	High resolution analysis; 2% size differences
50 – 1,000	NuSieve™ 3:1 Agarose	Analysis and blotting; 4% – 6% size differences resolved
	NuSieve™ GTG™ Agarose	Analysis and blotting; In-gel; 6% size differences resolved
1,000 – 10,000	SeaKem® GTG™ Agarose	Analysis and blotting; recovery required
	SeaPlaque™ GTG™ Agarose	In-gel
10,000	SeaKem® Gold Agarose	Analysis

表 3: DNA サイズに対するアガロース濃度

Size range (base pairs)	Final Agarose Concentration % (w/v)	
	1X TAE buffer	1X TBE buffer
SeaKem® LE and SeaKem® GTG™ Agarose		
1,000 – 23,000	0.60	0.50
800 – 10,000	0.80	0.70
400 – 8,000	1.00	0.85
300 – 7,000	1.20	1.00
200 – 4,000	1.50	1.25
100 – 3,000	2.00	1.75
NuSieve™ 3:1 Agarose		
500 – 1,000	3.0	2.0
100 – 500	4.0	3.0
10 – 100	6.0	5.0
MetaPhor™ Agarose		
150 – 800	2.0	1.8
100 – 600	3.0	2.0
50 – 250	4.0	3.0
20 – 130	5.0	4.0
<80	—	5.0
SeaPlaque™ and SeaPlaque™ GTG™ Agarose		
500 – 25,000	0.75	0.70
300 – 20,000	1.00	0.85
200 – 12,000	1.25	1.00
150 – 6,000	1.50	1.25
100 – 3,000	1.75	1.50
50 – 2,000	2.00	1.75
NuSieve™ GTG™ Agarose		
500 – 1,000	2.5	2.0
150 – 700	3.0	2.5
100 – 450	3.5	3.0
70 – 300	4.0	3.5
10 – 100	4.5	4.0
8 – 50	5.0	4.5
SeaKem® Gold Agarose†		
5,000 – 50,000	0.3	—
1,000 – 20,000	0.5	—
800 – 10,000	0.8	—
400 – 8,000	1.0	—

† TBE buffer is not recommended for separation of DNA >12,000 bp.

表 2: TAE と TBE 緩衝液システムの特徴

Buffer	Suggested Uses and Comments
TAE buffer	Use when DNA is to be recovered Use for electrophoresis of large (>12 kb) DNA Low ionic strength Low buffering capacity — recirculation may be necessary for extended electrophoretic times
TBE buffer	Use for electrophoresis of small (<1 kb) DNA Decreased DNA mobility High ionic strength High buffering capacity — no recirculation required for extended run times

表 4: アガロースゲルにおけるプロモフェノールブルー (BPB) とキシレンシアノール (XC) と二本鎖 DNA の移動度の関係

	1X TAE Buffer		% Agarose	1X TBE Buffer	
	XC	BPB		XC	BPB
SeaKem® LE and SeaKem® GTG™ Agarose					
	24,800	2,900	0.30	19,400	2,850
	16,000	1,650	0.50	12,000	1,350
	10,200	1,000	0.75	9,200	720
	6,100	500	1.00	4,100	400
	3,560	370	1.25	2,500	260
	2,800	300	1.50	1,800	200
	1,800	200	1.75	1,100	110
	1,300	150	2.00	850	70
NuSieve™ 3:1 Agarose					
	950	130	2.50	700	70
	650	80	3.00	500	40
	350	40	4.00	250	20
	200	30	5.00	140	8
	120	20	6.00	90	4
MetaPhor™ Agarose					
	480	70	2.00	310	40
	200	40	3.00	140	35
	120	35	4.00	85	30
	85	30	5.00	60	15
SeaPlaque™ and SeaPlaque™ GTG™ Agarose					
	11,700	1,020	0.50	6,100	400
	4,000	500	0.75	2,850	280
	2,300	350	1.00	1,700	180
	1,500	200	1.25	1,000	100
	1,000	150	1.50	700	70
	700	100	1.75	500	50
	550	60	2.00	400	30
	320	30	2.50	250	10
NuSieve™ GTG™ Agarose					
	750	175	2.50	460	75
	400	120	3.00	210	35
	115	<20	4.00	150	<20
	100	<20	5.00	80	<20
	85	<20	6.00	50	<20
SeaKem® Gold Agarose					
	24,800	3,550	0.30	19,000	2,550
	12,200	2,050	0.50	9,200	1,500
	9,200	1,050	0.75	7,100	800
	6,100	760	1.00	4,000	500
	4,100	600	1.25	2,550	350
	2,600	400	1.50	1,900	250
	2,000	330	1.75	1,400	180
	1,500	250	2.00	1,000	100

アガロースゲルの調製

Dissolving Agarose 続き

アガロースは分散、水和、融解/分解を経て溶解されます。

ゲル濃度 <2% w/v 用電子レンジ使用手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温の1X または0.5X 緩衝液とスターラーバーをビーカーに入れます。
3. 溶液をすばやくかき混ぜながら計量したアガロース粉末を加えます。
4. Teflon® 加工されていないスターラーバーは取り除きます。
5. 加熱前にビーカーと溶液の重さを測ります。
6. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
7. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口を作ります。
8. 泡が発生するまで、ビーカーを電子レンジの「高」出力で加熱します。

⚠ 注意：電子レンジにかけた溶液は過度な加熱により攪拌時に泡が飛び出すおそれがあります。

9. 電子レンジからビーカーを取り出します。
10. ビーカーを静かに渦動させ、沈殿している粉末やゲル片を再懸濁します。
11. 溶液が沸騰するまで、ビーカーを電子レンジの「高」出力で再加熱します。
12. 1分間、またはすべての粒子が溶解するまで沸点を保ちます。
13. ビーカーを電子レンジから取り出します。

⚠ 注意：容器が熱く火傷をするおそれがあるため、ビーカーを電子レンジから取り出す際は保護用のグローブを使用してください。

14. アガロース溶液が完全に混ざるまで、ビーカーを静かに渦動させます。
15. 溶解後、十分に熱した蒸留水を追加して初期重量を測ります。
16. 十分に混合します。
17. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

■ 材料

- 電子レンジもしくはホットプレート
- 溶液の2 - 4 倍量のビーカー
- Teflon® コート済みのスターラーバー
- スターラー
- プラスチックラップ
- オープン用手袋もしくは手保護用のグローブ

■ 試薬

- 蒸留水
- アガロース粉末

⚠ 注意：常に保護眼鏡を着用し、作業者本人とその周りの人を溶液による火傷から守ってください。

アガロースゲルの調製

Dissolving Agarose 続き

ゲル濃度 $\geq 2\%$ w/v での電子レンジ使用手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温、または冷やした緩衝液 (MetaPhor™ および NuSieve™ GTG™ アガロース用) とスターラーバーをビーカーに追加します。
3. ダマができないように溶液をすばやくかき混ぜながら、あらかじめ計量したアガロース粉末を加えます。
4. Teflon® 加工されていないスターラーバーは取り除きます。
5. 加熱前に15分間緩衝液にアガロースを浸します。これによって加熱中にアガロース溶液から泡が形成されにくくなります。
6. 加熱前にビーカーと溶液を計量します。
7. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
8. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口とします。アガロース濃度 $>4\%$ の場合は、以下の追加手順によって、融解/溶解中のアガロース溶液の泡の形成をさらに抑制できます。
 - a. ビーカーを電子レンジの「中」出力で1分間加熱します。
 - b. 電子レンジから溶液を取り出します。
 - c. 溶液を実験台で15分間静置します。
9. ビーカーを電子レンジの「中」出力で2分間加熱します。

⚠ 注意: 電子レンジにかけた溶液は過度な加熱により攪拌時に泡が飛び出すおそれがあります。

10. ビーカーを電子レンジから取り出します。

⚠ 注意: 容器が熱く火傷をするおそれがあるためビーカーを電子レンジから取り出す際は鍋つかみを使用してください。

11. ビーカーを静かに渦動させ、沈殿している粉末やゲル片を再懸濁します。
12. 「高」出力で1~2分間または溶液が沸騰するまでビーカーを再加熱します。
13. 1分間またはすべての粒子が溶解するまで沸点を保ちます。
14. ビーカーを電子レンジから取り出します。

15. アガロース溶液が完全に混ざるまで静かに攪拌します。
16. 溶解後、十分に熱した蒸留水を追加して初期重量を測りま
17. よく攪拌します。
18. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

ホットプレート使用によるアガロース調製手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温または冷やした緩衝液 (MetaPhor™ および NuSieve™ GTG™ アガロース用) とスターラーバーをビーカーに追加します。
3. ダマができないように溶液をすばやくかき混ぜながら、あらかじめ計量したアガロース粉末を加えます。
4. 加熱前にビーカーと溶液の重量を測定します。
5. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
6. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口とします。
7. 攪拌しながら溶液を沸騰させます。
8. アガロースが溶解するまで(約5~10分間)静かに沸騰させ続けます。
- 9.十分に加熱した蒸留水を加えて初期重量になるまで補充します。
- 10.十分に混合します。
11. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

⚠ 注意: 常に保護眼鏡を着用し、作業者本人とその周りの人を溶液による火傷から守ってください。

アガロースゲルの調製

Dissolving Agarose 続き

水平ゲルキャスト手順

1. アガロース溶液を60℃まで冷やします。
2. アガロース溶液を冷やしている間に以下を行います。
 - a. ゲルキャストトレイを組み立てます。
 - b. アガロース溶液を流し入れる前にキャストトレイを水平にします。
 - c. 残余乾燥アガロースが付着していないかどうか、コームの歯を確認します。熱い蒸留水に浸したティッシュを使って、コームの歯をこすることにより乾燥アガロースを除去できます。
 - d. コームの歯の下端とキャストトレイの間に小さな隙間(約0.5 mm~1 mm)をつくります。
3. アガロース溶液をゲルトレイに流し入れます。
4. コームの位置を元に戻します。
5. 室温で30分間、アガロースをゲル化します。
6. 低温融解アガロースおよび MetaPhor™ アガロースでは、さらに4℃で30分間ゲル化する必要があります。この作業を加えることによって扱いやすいゲルになります。MetaPhor™ アガロースで良好な分解能を得るにはこの追加の冷却手順が不可欠です。
7. ゲルが用意できたら泳動緩衝液を満たします。
8. コームをゆっくりと取り外します。
9. ゲルキャストトレイを電気泳動チャンバーに配置します。
10. 緩衝液を流し入れ、ゲル表面上で3 mm~5 mm に達するまでチャンバーを満たします。
11. パスツールピペットを使って、電気泳動緩衝液でウェルを静かに洗い流し、サンプルを載せる前にはがれかかっているゲル断片を取り除くようにします。
12. DNA を載せて電気泳動を開始します。

電界側のコームの厚さが、分解能に影響する可能性があります。薄いコーム(1 mm)によって明瞭な DNA バンドが得られます。厚いコームを使用すれば、ウェルにさらに多くの分量を追加できますが、分離する DNA バンド幅が広がる可能性があります。

■ 材料

- 水平泳動システム
- コーム
- パスツールピペット

■ 試薬

- アガロース溶液
- 泳動緩衝液

電圧表

DNA 電気泳動に最適な電圧のクイックリファレンスを表に示します。

DNA のサイズとアプリケーションに適した推奨電圧と緩衝液

サイズ	電圧	— 緩衝液 —	
		回収用	分析用
≤1 kb	5 V/cm	TAE	TBE
1 kb to 12 kb	4 – 10 V/cm	TAE	TAE/TBE
>12 kb	1 – 2 V/cm	TAE	TAE

最適な電気泳動時間

ゲルは、目的のバンドがゲル長の40%~60%移動するまで電気泳動します(「染色液移動表」参照)。分散や拡散によって生じるバンドの広がりによって、ゲルの3分の1以下の部分の分解が悪くなります。またゲルが小さくなれば、分解能も低下する可能性があります。これは電気泳動が長引くほど、2つの断片間に大きな隔たりが生じるからです。

ローディングバッファー

DNA 電気泳動において、ゲルローディングバッファーの使用には3つの目的があります。

- サンプル密度を増やす:これによって DNA がウェルに均等に沈みます。
- サンプルを染色する:ゲルへの添加作業が簡単になります。
- 移動染色する:染料は予想可能な速度で電界中を陽極に向かって移動します。これによって、電気泳動プロセスのモニターできます。

ローディングバッファーの種類

アガロースゲル電気泳動においては、少なくとも5種類のローディングバッファーが使用されています。これらは6倍濃縮溶液として調製されています。必要に応じて10X 溶液も調製できます。アルカリゲル電気泳動を行う場合、アルカリローディングバッファーを使用します。

Loading Buffer	6X recipe	Storage Temperature
Sucrose-based	40% (w/v) Sucrose 0.25% Bromophenol Blue 0.25% Xylene cyanol FF	4°C
Glycerol-based	30% Glycerol in distilled water 0.25% Bromophenol Blue 0.25% Xylene cyanol FF	4°C
Ficoll®-based	15% Ficoll® (Type 400) Polymer in distilled water 0.25% Bromophenol Blue 0.25% Xylene cyanol FF	room temperature
Alkaline	300 mN NaOH 6 mM EDTA 18% Ficoll® (Type 400) Polymer in distilled water 0.15% Bromocresol Green 0.25% Xylene cyanol FF	4°C

Ficoll® ベースのローディングバッファー

DNA バンドを明瞭にするには、グリセロールの代わりに、沈殿試薬として Ficoll® (タイプ400) ポリマーを使用します。低分子量のグリセロールを使用すると DNA が速やかにウェルを上昇できるようになり、電気泳動後に U 字型のバンドができるのを防ぐことができます。TBE ゲル内で、グリセロールはホウ酸塩と相互作用し、部分的に pH を変化させる場合があります。

サンプルの準備

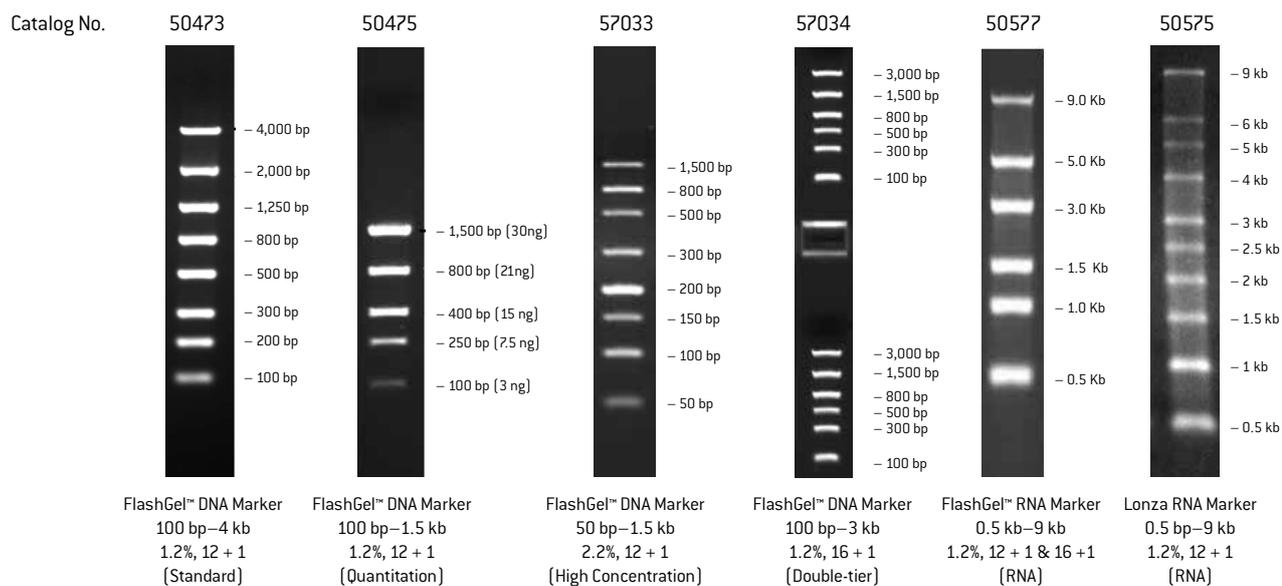
イオン強度が強すぎるローディングバッファーを使用すると、バンドがぼやけ、ゲル内の移動速度を予測できません。泳動緩衝液と同じ溶液内で DNA サンプルを再懸濁させるのが理想的です。これができない場合は、泳動緩衝液よりも弱いイオン強度のローディングバッファーを使用してください。

アガロースゲルでの DNA の検出と分離

ロンザラダー・マーカのガイドライン— サイズ範囲

FlashGel™ DNA/RNA マーカー

Size Range	0.5 Kb – 9.0 kb	0.5 Kb – 9.0 kb	100 bp – 3 kb	100 bp – 4 kb	100 bp – 1.5 kb	50 bp – 1.5 kb
Ladder/marker	RNA marker	RNA marker	DNA marker	DNA marker	Quant ladder	DNA marker
カタログ番号	50575	50577	57034	50473	50475	57033
バンド数	10	6	5	8	5	8
	9.0 kb	9.0 kb	3,000 bp	4,000 bp	1,500 bp	1,500 bp
	6.0 kb	5.0 kb	1,500 bp	2,000 bp	800 bp	800 bp
	5.0 kb	3.0 kb	800 bp	1,250 bp	400 bp	500 bp
	4.0 kb	1.5 kb	500 bp	800 bp	250 bp	300 bp
	3.0 kb	1.0 kb	100 bp	500 bp	100 bp	200 bp
	2.5 kb	0.5 kb		300 bp		150 bp
	2.0 kb			200 bp		100 bp
	1.5 kb			100 bp		50 bp
	1.0 kb					
	0.5 kb					



アガロースゲルでの DNA の検出と分離

続き

ロンザラダー・マーカのガイドライン - サイズ範囲 (反応が強いバンドは太字で表記)

	20 bp	20 bp Ext	100 bp	100 bp ext	Tandem	500 bp	Quant Ladder	Rev Quant Ladder	50 bp - 1000 bp	50 bp - 2500 bp	1 kb - 10 kb
Standard ladders											
カタログ番号	50330	50320	50321	50322	NA	50323	50334	50335	50461	50631	50471
SimplyLoad™ ladders											
カタログ番号	50331	50326	50327	50328	50333	50329	50336	50337	NA	NA	NA
断片数	25	50	100	30	21	16	5	5	9	13	9
サイズレンジ	20 bp - 500 bp	20 bp - 1,000 bp	100 bp - 1,000 bp	10 bp - 3,000 bp	100 bp - 12 kb	500 bp - 8 kb	100 bp - 1,000 bp	100 bp - 1,000 bp	50 bp - 1,000 bp	50 bp - 2,500 bp	1 kb - 10 kb
	500 bp	1,000 bp	1,000 bp	3,000 bp	12 kb	8,000 bp	1,000 bp	1,000 bp	1,000 bp	2.5 kb	10 kb
	480 bp	980 bp	900 bp	2,900 bp	11 kb	7,500 bp	700 bp	700 bp	700 bp	2 kb	7 kb
	460 bp	960 bp	800 bp	2,800 bp	10 kb	7,000 bp	500 bp	500 bp	525 bp	1.5 kb	5 kb
	440 bp	940 bp	700 bp	2,700 bp	9 kb	6,500 bp	200 bp	200 bp	500 bp	1250 bp	4 kb
	420 bp	920 bp	600 bp	2,600 bp	8 kb	6,000 bp	100 bp	100 bp	400 bp	1 kb	3 kb
	400 bp	900 bp	500 bp	2,500 bp	7 kb	5,500 bp			300 bp	700 bp	2.5 kb
	380 bp	880 bp	400 bp	2,400 bp	6 kb	5,000 bp			200 bp	525 bp	2 kb
	360 bp	860 bp	300 bp	2,300 bp	5 kb	4,500 bp			100 bp	500 bp	1.5 kb
	340 bp	840 bp	200 bp	2,200 bp	4 kb	4,000 bp			50 bp	400 bp	1 kb
	320 bp	820 bp	100 bp	2,100 bp	3 kb	3,500 bp				300 bp	
	300 bp	800 bp		2,000 bp	2 kb	3,000 bp				200 bp	
	280 bp	780 bp		1,900 bp	1 kb	2,500 bp				100 bp	
	260 bp	760 bp		1,800 bp	900 bp	2,000 bp				50 bp	
	240 bp	740 bp		1,700 bp	800 bp	1,500 bp					
	220 bp	720 bp		1,600 bp	700 bp	1,000 bp					
	200 bp	700 bp		1,500 bp	600 bp	500 bp					
	180 bp	680 bp		1,400 bp	500 bp						
	160 bp	660 bp		1,300 bp	400 bp						
	140 bp	640 bp		1,200 bp	300 bp						
	120 bp	620 bp		1,100 bp	200 bp						
	100 bp	600 bp		1,000 bp	100 bp						
	80 bp	580 bp		900 bp							
	60 bp	560 bp		800 bp							
	40 bp	540 bp		700 bp							
	20 bp	520 bp		600 bp							
		500 bp		500 bp							
		480 bp		400 bp							
		460 bp		300 bp							
		440 bp		200 bp							
		420 bp		100 bp							
		400 bp									
		380 bp									
		360 bp									
		340 bp									
		320 bp									
		300 bp									
		280 bp									
		260 bp									
		240 bp									
		220 bp									
		200 bp									
		180 bp									
		160 bp									
		140 bp									
		120 bp									
		100 bp									
		80 bp									
		60 bp									
		40 bp									
		20 bp									

GelStar®, SYBR® Green I, II 核酸ゲル染色による DNA の検出

電気泳動後の DNA の染色方法

1. GelStar® または SYBR® Green 染色の濃縮ストック溶液を冷凍庫から取り出し、室温で融解します。
2. 微小遠心分離用チューブで溶液を遠心分離し、チューブ底部の染料を回収します。
3. 透明のプラスチック製ポリプロピレン容器で pH 7.5 ~ 8.5 の緩衝液を使い、10,000X 濃縮液を 1X 希釈標準溶液 (1 µl / 10 ml) に希釈します。ゲルの上面を覆うのに十分な染色溶液を用意します。
4. ゲルを電気泳動チャンバーから取り出します。
5. ゲルを染色溶液に浸します。
6. 室温でゲルを静かにかき混ぜます。
7. 15~30分間ゲルを染色します。最適な染色時間は、ゲルの厚さ、アガロース濃度、検出されるフラグメントサイズによって異なります。ゲルが厚く、アガロース濃度が高ければ、染色時間も長くなります。
8. ゲルを染色溶液から取り出し、300 nm UV トランスイルミネーター、CCD カメラまたは Dark Reader® トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar® および SYBR® Green で染色されたゲルは脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりも DNA と結合した場合のほうがより強くなります。

アガロースゲルで GelStar® 染色を使用する場合の手順

1. GelStar® 染色の濃縮ストック溶液を冷凍庫から取り出し、融解します。
2. 微小遠心分離用チューブで溶液を遠心分離します。
3. アガロース溶液を調製します(436 - 439ページ参照)。
4. アガロース溶液が 70°C まで冷えたら、濃縮ストック溶液をゲル溶液で 1:10,000 に希釈し、ゲルに流し入れて染料を追加します (1 µl/10 ml)。
5. 溶液をゆっくりと渦動させます。
6. ゲルをキャストインゴートレイに流し入れます (440ページ参照)。
7. DNA をウェルに入れます。
8. ゲルを電気泳動させます。
9. 電気泳動チャンバーからゲルを取り出します。
10. 300 nm UV トランスイルミネーター、CCD カメラまたは Dark Reader® トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar® は脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりも DNA と結合した場合のほうがより強くなります。

GelStar® および SYBR® Green 染色を用いた垂直ゲル染色

GelStar® および SYBR® Green 染色を組み合わせることでゲルに使用したり、使用する DNA を垂直のまま事前に染色したりすることは推奨されません。ガラスまたはプラスチックのプレートや DNA に結合する染料は、ほとんどまたは全くシグナルを示さない場合があります。ゲルは、前のセクションで説明したように、後で染色してください。

GelStar® または SYBR® Green 染色で垂直ゲルを染色する場合は、本手順に従ってください。上記の手順 1~4 に従います。

1. カセットを開封してゲルをプレート上に配置します。
2. 側面を持ち上げながらプレートとゲルを染色容器に配置します。
3. ゲル表面に染料を静かに流し入れます。
4. 5~15分間ゲルを染色します。
5. 300 nm UV トランスイルミネーター、CCD カメラまたは Dark Reader® トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar® および SYBR® Green 染色ゲルは脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりも DNA と結合した場合のほうが強くなります。

GelStar®, SYBR® Green I, II 核酸ゲル染色による DNA の検出

続き

写真による可視化

少量の DNA を検出する場合、GelStar® および SYBR® Green 染色で染色されるゲルが示すバックグラウンド蛍光はわずかであり、これによって長時間の撮影用曝露が可能となります。染色用の適切な撮影用フィルターを使用してください。

推奨撮影タイプと撮影条件:

画像取り込みシステムによる可視化

Polaroid® Film	f-stop	Exposure Time
Type 57 or 667	4.5	0.5 – 2 seconds
Type 55	4.5	15 – 45 seconds

最善の結果と最適な感度を得るには、Dark Reader® トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) 上で GelStar® で染色したゲルを可視化します。GelStar® および SYBR® Green 染色はほとんどの CCD および動画イメージングシステムに対応しています。実際に使用するシステムのフィルターの種類によっては、新しいフィルターを購入する必要があります。必要なフィルターについては、システムのメーカーにお問い合わせください。

Stain	Emission [nm]	Excitation [nm]
GelStar® 染色	527	493
SYBR® Green I 染色	521	494
SYBR® Green II 染色	513	497

適用上の注意

- GelStar® および SYBR® Green 染色は、これらの蛍光特性によりアルゴンイオンレーザーに対応しています。
- これらの染色剤は核酸のエタノール沈殿の標準プロトコルによって二本鎖 DNA から除去できます。
- エチジウムプロマイドであらかじめ染色されたゲルは、後染色の標準プロトコルに従って、泳動後に GelStar® または SYBR® Green 染色で染色できます。
- 塩化セシウム密度勾配プラスミドの調製に GelStar® および SYBR® Green 染色を使用することは推奨されません。DNA の浮遊密度への染色液の効果が不明です。
- これらの染色は酵素反応に干渉しません。
- これらの染料で染色されたゲルにサザンブロット法を適用する場合は、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションにおいて 0.1%~0.3% の SDS を添加するよう推奨されます。
- 二本鎖 DNA 結合 GelStar® または SYBR® Green 染色は UV 透照下で緑蛍光を発色します。一本鎖領域をもつ DNA を含むゲルは緑ではなく橙色を発する可能性があります。

汚染除去

染色溶液は、活性炭でろ過してから廃棄し活性炭は焼却してください。活性炭による吸収については、Sambrook *et. al.*, pp. 6.16 – 6.19 (1989年) を参照してください。核酸染色溶液の汚染除去と処理については、国と地方公共団体のガイドラインに従ってください。

エチジウムブロマイドによる DNA の検出

エチジウムブロマイドは蛍光染料であり、一本鎖または二本鎖 DNA を検出します。しかし、一本鎖 DNA に対する親和性は、二本鎖 DNA と比べて比較的低くなっています。エチジウムブロマイドで染色した DNA は、紫外線放射で検出されます。254 nm において、紫外線は DNA に吸収されて染料に到達します。302 nm および 366 nm では、紫外線は結合した染料そのものに吸収されます。いずれの場合も、可視スペクトルの赤橙色領域の 590 nm においてエネルギーが再放出されます。

手順

最適な分解能、最も明瞭なバンド、最も小さなバックグラウンドを得るには、電気泳動後にエチジウムブロマイドでゲルを染色します。分解能は若干低下するものの、エチジウムブロマイドはゲルと電気泳動緩衝液 (0.5 µg/ml) に混ぜて使うことも可能です。電気泳動における DNA の移動度は約 15% 低下します。以下の手順に従って、電気泳動後の DNA 染色を行ってください。

電気泳動

- 十分な量のエチジウムブロマイド溶液を用意します。(蒸留水またはゲル緩衝液中のエチジウムブロマイド 0.5~1 µg/ml)
- 電気泳動チャンバーからゲルを取り出します。
- エチジウムブロマイド溶液にゲルを 20 分間沈めます。
- 溶液からゲルを取り出します。
- 蒸留水を満たした新しい容器にゲルを 20 分間沈めます。
- 蒸留水を換えて繰り返します。
- 携帯型または卓上型紫外線照射器を使ってゲルを観察できます。ゲル濃度が 4% 以上の場合、これらの時間は 2 倍にする必要があるかもしれません。バックグラウンドが脱染後もまだ発色している場合は、脱染を続けてください。

■ 材料

- ゲルよりも大きい染色容器
- UV トランスイルミネーター
- 磁気攪拌プレート
- スターラーバー

■ 試薬

- エチジウムブロマイドストック溶液 (10 mg/ml)
- 電気泳動緩衝液または蒸留水

⚠ 注意: ここで示されている器具や材料は、使用者や環境に害をもたらす可能性があります。これらの手順を開始する前に、452 ページの安全情報を参照してください。

アガロースゲルにエチジウムブロマイドを添加する場合は以下の手順に従ってください。

1. アガロース溶液を調製します (436 – 439 ページ参照)。
2. アガロース溶液を冷やしている間にエチジウムブロマイドを最終濃度 0.1~0.5 µg/ml で溶液に加えます。
3. 溶液を静かに渦動させます。
4. ゲルをキャストインゴットレイに流し入れます。
5. 泳動緩衝液にエチジウムブロマイドを 0.5 µg/ml の最終濃度で追加します。
6. ゲルを移します。(440 ページ参照)
7. ゲルを蒸留水に 20 分間沈めて脱染します。
8. 新しい蒸留水で繰り返します。
9. 電気泳動中、またはその後に携帯型または卓上型紫外線照射器を使ってゲルを観察できます。

エチジウムブロマイド溶液の汚染を除去します。

エチジウムブロマイド溶液の汚染除去は Sambrook *et. al.*, pp. 6.16 – 6.17 (1989年) で説明されています。エチジウムブロマイドの汚染除去と処理については、地方公共団体のガイドラインと規制に従ってください。

アガロースゲルからの DNA の回収

アガロースゲルから DNA の回収効率を上げるためのヒント

本セクションでは、あらゆる回収方法の中でもアガロースゲルから DNA の回収効率を高めるさまざまなヒントを紹介します。

回収のための適切なアガロースの選択

DNA を回収する場合、アガロースの選択は最も重要な要素の1つです。不純物が混在した回収を避けるため、ゲル内反応を選択することができます。

ロンザは、分子生物学研究用途に特別に調製された Genetic Technology Grade™ (GTG™) 製品を提供しています。257～259 ページを参照してください(ロンザのアガロースに適した回収方法については以下の表を参照してください)。

緩衝液の種類

アガロースゲルから DNA を回収する場合、電気泳動用 1 X TAE 緩衝液の使用が推奨されます。

キャストイングと DNA 充填のヒント

- 1X TAE 緩衝液内でゲルを準備します。
- エチジウムブロマイドとゲルを一緒にキャストしないでください。
- ゲルを3～4 mm の厚さでキャストします。
- ≤1 mm の厚さのコームを使用します。
- DNA の量は1バンドにつき100 ng 以下となるようにします。

染色と回収のヒント

アガロースゲルから DNA を回収する場合の推奨項目は以下の通りです。

- ゲルを15～20分間染色します。
- 蒸留水で2回、20分間ずつ洗浄してゲルを脱染します。
- DNA を紫外線で1分以上照射しないでください。紫外線に DNA を長時間曝露すると DNA が損傷するおそれがあります。
- 紫外線が誘発する損傷から DNA を守るには、1 mM のグアノシンとシチジンをゲルと電気泳動緩衝液に添加することが効果的です。
- 可能な限り小さなゲル片を切り出します。

分子量マーカーのすぐ隣に少量のサンプル流して、別のレーンで電気泳動を行うことにより回収に使用されるサンプルの染色を避けることができます。ただし、エチジウムブロマイドを欠くため、DNA が紫外線による損傷をうけます。そのため紫外線への曝露時間は可能な限り短くしてください。少量のマーカーおよびサンプルを含むレーンをゲルと染料の残りから切り出します。予備の分を回収するには、染色されたゲルポーションを染色されていないポーションと並べます。UVトランスイルミネーターで確認しながら、染色されていないゲルのポーション上にあるサンプルと並ぶ領域を切り出します。FlashGel™ 回収システム(270ページ)を使えば、紫外線を使わずに DNA 回収することができます。



参考文献

Grundemann, D. and Schomig, E., *BioTechniques* 21(5): 898 – 903, 1996.

ロンザのアガロースにおける回収方法

	In-Gel	β-Agarase	Phenol/ Chloroform	Recovery Columns	Electroelution	Freeze/ Squeeze
SeaKem® GTG™ アガロース			■	■	■	■
SeaPlaque™ GTG™ アガロース	■	■	■	■	■	■
NuSieve™ GTG™ アガロース	■	■	■	■	■	■
MetaPhor™ アガロース			■	■	■	■
SeaPlaque™ アガロース		■	■	■	■	■

アガロースゲルからの DNA の回収

続き

アガロースゲルから DNA のフェノール/クロロフォルム抽出物

適合性のあるアガロース

- SeaPlaque™ GTG™ アガロース
(DNA 回収について認証と試験済み)
- NuSieve™ GTG™ アガロース
(DNA 回収について認証と試験済み)
- SeaPlaque™ アガロース

ヒント

フェノール/クロロフォルムを使用してアガロースから DNA 抽出をする場合、多くのケースで抽出するアガロース片が大きすぎるか、エタノール沈殿手順で DNA と共にアガロースが沈殿することで回収に失敗します。この問題を回避するために以下の事項が推奨されます。

- 1本の試験管に抽出するアガロースの量は200 mg (200 µl) 以下にします。DNA を含むゲル片がこれより大きい場合、小さく分割してからエタノール沈殿の前に抽出した溶液に加えてください。
- アガロースのエタノール沈殿は以下の手順で避けることができます。まず抽出された溶液を氷上で15分間冷やしてから、低温室で微小遠心分離機を使い、最高速度で15分間サンプルを遠心分離します。その後塩とエタノールを加えます。上清は慎重に別容器に移します。上清の DNA は、以下の標準プロトコルに従って沈殿させます。
- サイズの大きな DNA (>10kb) では使えません。攪拌すると DNA が切断されます。

アガロースゲルから回収される DNA のエタノール沈殿

ヒント

- 塩とエタノールを加える前に、以下の手順を行うことでアガロースの沈殿を避けることができます。まず氷上で上清を15分間冷やします。次に低温室で微小遠心分離機を使い、最高速度で15分間サンプルを遠心分離します。上清は慎重に別容器に移します。上清の DNA は以下の標準プロトコルに従ってエタノール沈殿させます。
- アガロースオリゴ糖が DNA または RNA と共に沈殿する可能性を避けるため、エタノール沈殿は酢酸ナトリウムではなく酢酸アンモニウムを用いて室温でインキュベートします。

アクリルアミドゲルによるタンパク質の分離

タンパク質電気泳動用緩衝液

Laemmli 緩衝液システム(トリス-グリシン)は非連続性緩衝液システムであり、幅広い分子量をもつタンパク質を鮮明に分離する目的で広く使用されています。このシステムではゲルがトリス塩酸緩衝液で調整され、トリス-グリシンが泳動緩衝液として使用されます。

トリス-トリシン緩衝液システムでは泳動緩衝液中でトリシンがグリシンに置き換わります。結果的に、より効率的なスタッキングとデスタッキング、タンパク質とペプチドの高い分解能が低分子量で実現します(10 kDa~15 kDa以下)。PAGEr™ Gold プレキャストゲルなどの Laemmli ゲルを用いて短時間で高い信頼性の分離を行なう場合、または PAGEr™ EX プレキャストゲル usProSieve™ EX 泳動緩衝液を使用する場合は、298~317ページを参照してください。

Buffer Preparation Tris-Glycine SDS Buffer, pH 8.3

10x Stock solution	g/l for 10X Stock solution
.25 M Tris base	30.3 g Tris Base
1.92 M Glycine	144.0 g Glycine
1.0% SDS*	Adjust volume to 1 liter with distilled water

[1X = 25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS*]
* Omit SDS if running native proteins.

Tris-Tricine SDS Buffer, pH 8.3

10x Stock solution	g/l for 10X Stock solution
1 M Tris base	121.1 g Tris base
1 M Tricine	179.0 g Tricine
1.0% SDS*	Adjust volume to 1 liter with distilled water

[1X = 100 mM Tris base, 100 mM Tricine, 0.1% SDS*]
* Omit SDS if running native proteins.

2X Tris-Glycine SDS Sample Buffer

2X concentrate	amount to add for 2X concentrate
126 mM Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml of 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
20% Glycerol	2 ml Glycerol
4% SDS	4 ml of 10% SDS
0.005% Bromophenol blue	0.5 ml of 0.1% Bromophenol blue
Adjust volume to 10 ml with distilled water	

[1X = 63 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 0.0025% Bromophenol blue, 2.5% βME]

アクリルアミドゲルによるタンパク質の分離

続き

ポリアクリルアミドゲルでのタンパク質充填と泳動

ゲルに載せるタンパク質量は、サンプルの純度や使用される染色方法によって異なります。高度に精製されたタンパク質であれば、一般的にミニゲルのレーン毎のタンパク質の分量は0.5 μg ~5 μg で十分です。細胞溶解物のような完全な混合物には、レーン毎に50 μg のタンパク質が必要となる場合があります。以下の表では、タンパク質検出のための検出限界値を示しています。

タンパク質染料の検出限界

タンパク質染色	検出下限 [タンパク質/バンド]
Coomassie® Blue Stain	100 ng
Silver Stain	1 ng
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	1 ng–2 ng
SYPRO® Red Protein Gel Stain	1 ng–2 ng
SYPRO® Tangerine Protein Gel Stain	4 ng–8 ng
ProSieve™ Safe Stain	8ng–15ng

NOTE: Limits are based on optimal detection methods for each stain.

最適電圧と電力設定

トリスグリシンポリアクリルアミドのミニゲルは通常125~200ボルトの定電圧で泳動します。電気泳動中、電流は低下し発熱は弱まります。電圧が高すぎるまたは上限を設定しない場合、過熱が生じてバンドの歪曲やゲルおよび装置の損傷を招くおそれがあります。定電圧によって、1つの装置で複数のゲルに同じ電圧を適用できます。定電圧を使用する場合はゲルの厚さは問題となりません。大型のゲルでは、定電流設定で泳動用予定電圧よりもわずかに高く(5ボルト)電圧の上限を設定することによりサンプル移動速度を維持することもできます。

トリス-グリシン SDS の代わりに1 × ProSieve™ EX 泳動緩衝液を使用すると、バンドの解像度を維持しながらも、200~250 V という高電圧でより迅速にポリアクリルアミドのミニゲルを泳動することができます。

PAGEr™ EX ゲルおよび1 × ProSieve™ EX 泳動緩衝液を用いれば、スピードと解像度を最大化することができます。

最適な電気泳動時間

プロモフェノールブルー染色がゲル下部に移動するまで電気泳動を行ってください。電気泳動時間は、使用される緩衝液、ゲル長およびポリアクリルアミド濃度によって異なります。一般的にミニゲルは泳動に約30~90分かかります。一方、大型のゲルでは5時間にも及ぶことがあります。トリス-グリシン SDS の代わりに1 × ProSieve™ EX 泳動緩衝液を使用すると、バンドの解像度を維持しながらも、200~250 V の高電圧で泳動時間を15分間にまで短縮して泳動することができます。

PAGEr™ EX ゲルおよび1 × ProSieve™ EX 泳動緩衝液を用いれば、スピードと解像度を最大化することができます。

アクリルアミドゲルからのタンパク質のブロットイング

はじめに

ブロットイングにおけるタンパク質移動率は複数の因子によって異なります。例えば、ゲル濃度、ゲルの厚さ、タンパク質サイズ、移動条件(例:緩衝液と電圧)、膜の種類や質などがあります。最適な移動効率を得るには、移動条件をこれらの多様な因子に合わせて調整する必要があります。

最適なメンブレンの選択ガイド

Nitrocellulose	PVDF	Nylon
Hydrophobic binding	Hydrophobic binding	Hydrophobic and electrostatic binding
General purpose membrane	SDS tolerant	Stable if baked
Low background	High background	High background
Low strength	High strength	High strength
Becomes brittle if baked	Suitable for protein sequencing	Least suitable for Western transfer

Towbin トランスファーバッファの組成

1X Working Solution	Amount for 1X Working Solution
25 mM Tris base	30.3 g Tris base
192 mM Glycine	144.1 g Glycine
0.1% SDS	10.0 g
	Adjust volume to 8 liters with distilled water. Measure, but do not adjust pH; it should be approximately 8.2 to 8.4
20% Methanol	2 L Methanol Adjust volume to 10 liters with distilled water

移動と結合のバランスを最適化するためにはメタノール、SDS もしくは両方の濃度を低くする必要があります。メタノールとSDS のタンパク質移動への効果の概要を以下の表に示します。

SDS	Methanol
Improves transfer of proteins >60 kDa	Improves binding efficiency
Decreases binding efficiency	Decreases transfer efficiency
Not compatible with nylon membranes	Do not soak gel in transfer buffer prior to blotting
Include 0.1% – 0.2% in transfer buffer	Include 20% in transfer buffer

PAGEr™ Gold ゲルおよび PAGEr™ EX ゲルやその他の Laemmli プレキャストミニゲルから短時間で効率的にタンパク質のトランスファーを得るには、1 × ProSieve™ EX ウェスタントランスファーバッファーをお使いください。スピードが加速し、使いやすくなっており、メタノールを含んでいません。

電気泳動理論

Electrophoretic Parameters

電気泳動中、パラメータの1つは一定に保ち、他の2つは変動可能です。これは電気泳動システムの抵抗が変化するためです。垂直システムではゲルの抵抗が増加しますが、これは CI のような伝導性の高いイオンがゲルの外に泳動するためです。これらのイオンがゲルから取り除かれると、グリシン、ホウ酸塩、酢酸塩などの伝導性の低いイオンによって電流が流れるようになります。通常の水平システムでは抵抗に大きな変化はありません。しかし水平システムで高電圧または長時間の泳動が行われる場合、抵抗が緩和される可能性があります。

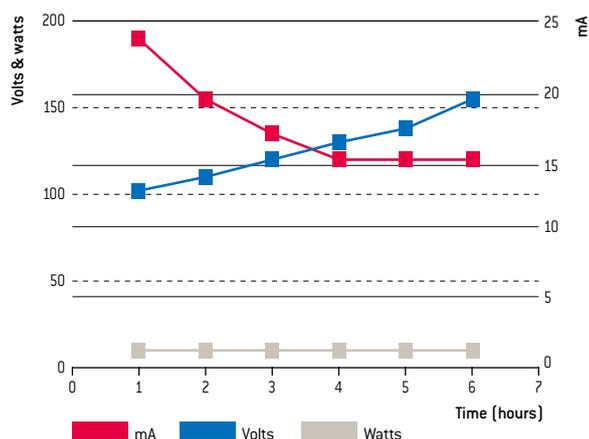
はじめに

電気泳動における制限因子として重要な各パラメータを設定することには長所と短所があります。シーケンス用のゲルは通常一定の消費電力で行われ一定の温度が維持されます。タンパク質および DNA 分離用アガロースおよびアクリルアミドは定電圧または定電流で泳動します。

一定の消費電力

垂直システムで消費電力が一定に保たれる場合サンプル速度は減少します。これは DNA によって部分的に流れる電流が減少し、電圧上昇を相殺するためです。発熱は一定のままに保たれます。(緩衝液の問題、緩衝液の漏出またはハードウェアの問題により)電流が過度に減少する場合、電源部が電圧を高めて補充します。

一定ワット数では、電圧と電流が経時的に変化するため、ワット時間の計算によってサンプルの可動性を予測することはできません。



参考文献

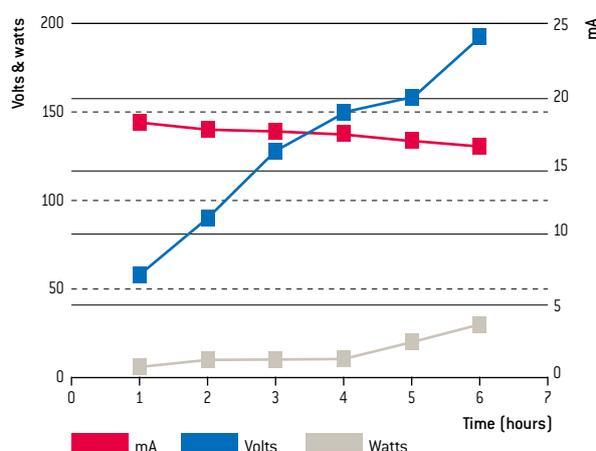
Rickwood, D. and Hames, B.D., *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach*, IRL Press Limited, 1982.

定電流

電流が一定に保たれる場合、サンプルは一定速度で移動します。電圧とワット数は抵抗の上昇と共に増加します。これによって泳動中の発熱が高まることになります。

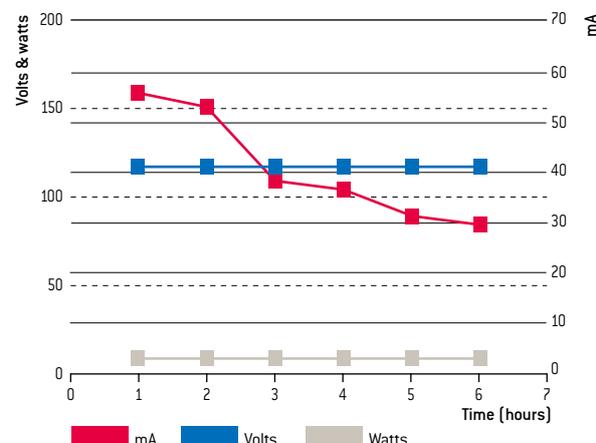
リード線や電極の損傷、緩衝液の漏出などシステムの障害が発生した場合、ゲルの抵抗は大きく上昇します。これによってワット数と電圧の大幅な上昇が引き起こされ、発熱が過剰になります。熱によってシステムで沸騰が起こったり装置が焼け焦げたりする可能性もあります。

定電圧



電圧が一定に設定されている場合、電流とワット数は抵抗増加に伴って減少します。これによって発熱と DNA の移動は弱まります。

発熱が弱まるため泳動時間全体における安全域が増加します。抵抗が劇的に上昇する場合、電圧が上昇できないため電流とワット数が落ち込みます。装置が障害を受ける場合、抵抗が非常に高まって電源部が埋め合わせることができず、電源が落ちることがあります。



安全と環境への対策

一般的に、核酸やタンパク質の操作は特定の有害物質から守るための予防措置が取られている限り、人体に著しく害を与えるものではありません。

技術情報のセクションでは、人体や環境に害を与える物質や方法に関する参考文献が記載されています。特定の危険や保護手順はここにまとめられています。また、本マニュアルに記載された作業を実施する際はトレーニングを受けたユーザーがこれらの注意事項に従うよう推奨されます。

これらの注意事項は、正規の健康と安全トレーニングに代わるものでもユーザーの所属する組織や地方公共団体の標準や手順に代わるものでもありません。各ケースにおいて、これらの物質の取り扱いや処理に関する地方公共団体のガイドラインを確認し従うようにしてください。

特定化学品の危険有害性

エチジウムブロマイド

エチジウムブロマイド(EtBr)は突然変異誘発物質であり、発がん性の疑いがあります。曝露しないよう注意してください。次のような人体保護装備品の使用が推奨されます:ニトリル手袋、実験用白衣および安全眼鏡。エチジウムブロマイドは換気の十分な場所で使用し、蒸気を吸入しないようにしてください。エチジウムブロマイドを含むゲルの電気泳動中には電気泳動槽に蓋をしてください。エチジウムブロマイド粉末は、ドラフトチャンパー内で取り扱うようにしてください。

エチジウムブロマイドの汚染除去と処理は地方公共団体と組織の規制に従って行ってください。

GelStar® および SYBR® Green 核酸染色

GelStar® および SYBR® Green 染色には細胞(肌を含む)を貫通可能な成分が含まれており、突然変異誘発物質となる可能性がありますので曝露しないように注意してください。

次のような人体保護装備品の使用が推奨されます:(非ニトリル)手袋、実験用白衣および安全眼鏡。

これらの染料の汚染除去と処理は、地方公共団体や組織の規制に従って行ってください。

ホルムアルデヒドおよびホルムアミド

ホルムアルデヒドとホルムアミドは、発がん性物質として知られています。曝露は可能な限り最小限に留めてください。手袋、安全眼鏡(または液体を注入する際のゴーグル)および実験用白衣を着用してください。ホルムアルデヒドおよびホルムアミドを使用した作業は、防毒マスクを着用して行うか、ドラフトチャンパーまたはその他換気の十分な場所で行い、吸入しないようにしてください。

これらの物質の処理は、地方公共団体や組織の規制に従って行ってください。

DMSO

ジメチルスルホキシド(DMSO)は細胞や DNA を貫通できるため、溶液中の他の物質を輸送して細胞に侵入する場合があります。ニトリル手袋(天然ゴム製が推奨されています)、安全眼鏡や実験用白衣などを着用し、曝露を回避してください。

これらの物質の処理は、地方公共団体や組織の規制に従って行ってください。

フェノール

フェノールは吸入、経口摂取および接触によって毒性を生じます。目に入るとやけどします。適切な手袋、安全眼鏡(またはゴーグル)および実験用白衣が必要です。適度な換気を行ってください。

これらの物質の処理は、地方公共団体や組織の規制に従って行ってください。

Notes

Trademarks and Patents

Trademarks of Lonza Group or its affiliates

4D-Nucleofector™	FGM™	MBM™	OsteoImage™	ProPer™	SCGM™	UltraMDCK™
96-well Shuttle™	FlashGel™	MDE™	OsteoLyse™	ProSieve™	SeaPlaque™	UltraMEM™
ABM™	Grade™	MEBM™	PAGEr™	ProTrack™	SeaPrep™	Ultra™
AccuGENE™	GTG™	MEGM™	PBM™	ProVero™	SeBM™	ViaLight™
AdipoRed™	HBM™	MetaPhor™	PC-1™	PyroGene™	SeGM™	Vial™
AGM™	HCM™	MGM™	PDELIGHT™	PYROGENT™	Select™	WinKQCL™
Alert™	Heps™	MotorBlast™	PGM™	PYROSPERSE™	Shuttle™	X-VIVO™
Amniochrome™	HL-1™	MotorPlate™	pmaxCloning™	PyroTec™	SimplyLoad™	Endotoxin Challenge Vials™
B-ALI™	HMM™	MsBM™	pmaxFP™	PyroWave™	SingleQuotes™	Nucleofection Nucleofector™
BEBM™	L7™	MSCGM™	pmaxGFP™	QC Insider™	SkBM™	
BEGM™	InCert™	MsGM™	PNGM™	QCL-1000™	SkGM™	
BioWhittaker™	Insect-XPRESS™	MycoAlert™	Poietics™	QuadColor™	SmbM™	
BulletKit™	IsoGel™	MycoZap™	PowerCHO™	RCGM™	SmGM™	
CalciFluor™	Kaleidoscope™	NeuroBlast™	PPiLight™	ReagentPack™	SpeedFill™	
CBM™	KBM™	NHEPS™	PrEBM™	REBM™	Synergy™	
CDM™	KGM™	NPBM™	PrEGM™	REGM™	TheraPEAK™	
Cells on Demand™	Kinetic-QCL™	NPMM™	Pro293™	Reliant™	ToxiLight™	
Clonetics™	Kinetic SmartStop™	Nucleocuvette™	ProCHO™	RtEBM™	TruBand™	
CytoSMART™	Latitude™	NuSieve™	ProDoma™	RtEGM™	UltraCHO™	
EBM™	LGM™ 3	OBM™	ProDOMA™	S-ALI™	UltraCULTURE™	
EGM™	Lymphochrome™	OCP™	ProFreeze™	SABM™	UltraDOMA-PF™	
Falcon™	maxFP™	OGM™	ProMDCK™	SAGM™	UltraDOMA™	
FBM™	maxGFP™	OsteoAssay™	ProNSO™	SCBM™	UltraGlutamine™	

Trademarks from other companies

Active Directory and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation in the United States and other countries.
 BD Falcon is a trademark of Becton, Dickinson and Company.
 BioTek, ELx808 and FLx800 are registered trademarks of BioTek Instruments, Inc.
 Synergy 2, and Eon are trademarks of BioTek Instruments, Inc.
 Eppendorf, Combtips and Biopur are registered trademarks of Eppendorf AG.
 GelStar, GelBond and SeaKem are registered trademarks of FMC Corp.
 HepaRG is a trademark of Biopredic International
 Matrigel is a registered trademark of Corning or its affiliates
 Molecular Devices, SpectraMax, Gemini and VersaMax are registered trademark of Molecular Devices, LLC
 PER.C6 and PERMEXCIS are registered trademarks of CruCell Holland, BV
 Quasi Vivo is a registered trademark of Kirkstall, Ltd.
 Transporter Certified™ is a trademark of Qualyst Transporter Solutions, LLC

Retronectin is a registered trademark of TaKaRa Shuzo Company, LTD.
 RNALater is a registered trademark of Ambion, Inc.
 Sephadex is a trademark of Amersham BioSciences.
 Sepharose is a registered trademark of Pharmacia Fine Chemicals, Inc.
 Sunrise is a trademark of Tecan Group Ltd.
 SYBR and SYPRO are registered trademarks of Molecular Probes Corporation, Inc.
 Tecan and Freedom EV0ware are registered trademarks of Tecan Group Ltd.
 Transwell is a registered trademark of Data Packaging Corporation
 Versene is a registered trademark of Dow Chemical Company
 Vortex-Genie is a registered trademark of Scientific Industries.

All other trademarks mentioned herein are either the intellectual property of Lonza or belong to other companies where their related products were used in the scope of research experiments or referenced scientifically otherwise.

Patents

Lonza Group or its affiliates are owner or licensee** of the following patents. Products described herein may be covered by one or more of these United States patents, by pending patent applications, or by corresponding patents or applications in other countries..

U.S. Patents				European Patents:			
5,641,626**	6,512,236	6,365,341	6,117,293	1297119	1383901	1390518	1476537
6,464,850	6,198,107	6,558,521	D510,770	1525900	1522587	1702677	1741778
6,599,711	6,328,870	6,914,250	7,320,859	PCT/EP01 / 07348	PCT/DE02 / 01489	PCT/DE02 / 01483	
D511,386	D524,449	5,486,359**					
7,332,332	5,385,839	6,905,585**					

最新の取引条件については、下記サイトにてご確認ください。

URL <http://www.lonza.com/termsandconditions>