

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別にお勧めします（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。エンドト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、エンドトキシンが純粋な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の水と同程度に低温の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。

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

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。