

平成10年度大学院共通カリキュラム 神経生物学実習

テーマ：遺伝子導入

遺伝子導入は、本来その遺伝子を発現していない細胞に外来性の遺伝子を導入し、細胞が本来持つ蛋白発現機構を利用して、目的の蛋白を発現させる技法である。この実習では、クラゲの蛍光蛋白GFP及び神経系のアクチン結合蛋白ドレブリンを線維芽細胞に発現させる。

達成レベル

本実習では、いわゆるクローニング等の分子生物学の技術は必要としない。購入するなり、贈与されるなどして、目的蛋白の遺伝子が組み込まれている発現ベクターを既に所持していることを前提とし、簡単な、分子生物学と培養の技術を修得することにより、遺伝子導入を行えるようになることを目的とする。

第一日：プラスミド増殖

大腸菌培養用の培地作製

そのまま溶かせばpHは約7になるものの、bacto-tryptoneやbacto-yeast extractにはほとんどpH緩衝能がない。従って、培地の場合pHを合わせないことが多い。

使用する水はRO（逆浸透圧）水または脱イオン水とし、Milli-Q水は用いない。Milli-Q水は高価（コーラよりも高いと言われている）である上に、あまりにも純粋なために菌の培養には適さないからである。

Terrific Brothでは確かに菌は良く生えるが、プラスミドが抜け落ちていることもある。従って、プラスミドを増やすときはLB Mediumを用いた方がよい。

液体培地

LB Medium / liter

tryptone 10g
bacto-yeast extract 5g
NaCl 5g

(NaOHでpHを合わせますアップ後、)オートクレーブ。

NZYM Medium / liter

amine N20g
NaCl 5g

bacto-yeast extract 5g

gSO4 7M2O 2g

NaOHでpH を合わせ、5スアッブ後、オートクレーブ。

Terrific Broth/ liter

to-tryptone 12g

bacto-yeast extract 24g

lycerol 5.04g

Iにメソアッブ後、オートクレーブ。手で持てる程度に冷めたら以下のリン酸バッファを100ml加える。

Phosphate buffer for riter Broth / 100ml

2K10R070mM)

1025404720mM)

SOB Medium liter

to-tryptone 20g

bacto-yeast extract 5g

NaCl 0.5g

KC250r80g /100ml)10ml

HClでpHを合わせ、5スアッブ後、オートクレーブ。使う直前に2M MgCl2 (19g/ 100ml) を5ml加える。

SOC Medium liter

オートクレーブしたSOB Mediumが手で持てる程度にまで冷めたら、20 mlの1 g glucose (18g/100ml 濾過滅菌)を加える(最終濃度 20 mM)。使う直前に2M MgCl2 (19 g ml)10を5ml加える。

2xYT Medium liter

to-tryptone 16 g

bacto-yeast extract 10 g

NaCl 5g

NaOHでpHを合わせ、5スアッブ後、オートクレーブ。

固形培地

アガープレートは 1.5%のDacto-agar
トップアガロースは 0.7%のAgarose

をオートクレーブ直前に加える。

90mmプレート1枚当たり25mlかそれ以上の培地を注ぐ。(注いでいる培地がプレート全体に行き渡ったときが約25mlに相当する)。150mmプレートは80ml以上。泡が生じてしまったら培地が固化する前にバーナーかライターの炎で焼けば消える。将来トップアガロースを用いる可能性のある場合は、特に水平に注意しなければならない。固化したらば、逆さまにしてふたを少しずらして、余分な水分を乾燥させる(30分~2時間)。保存中に過度に乾燥してしまうのを防ぐため、パラフィルムなどでふたとの隙間をテーピングする。日付と培地の種類をふたに明記し、4℃で保存する。保存中は、生じてくる水滴が培地に付かないよう上下逆さまにしておく。

抗生物質

抗生物質は基本的に手で持てる程度に培地が冷めたら加える。Ampicillin 50mg/ml in 0.1M NaOHを濾過滅菌後-20℃で保存。x1000として使用。
Chloramphenicol 34mg/ml in 100% ethanolを-20℃で保存。x200として使用。
Kanamycin 10mg/ml in 0.1M NaOHを濾過滅菌後-20℃で保存。x200として使用。

その他

IPTG 238mg/ml H₂O (1M)原則的に濾過滅菌。-20℃で凍結保存。4 μl/plateの割合で使用。
X-gal 20mg/ml dimethylformamide (DMF) でアルミホイルに包んで遮光保存。40 μl/plateの割合で使用。

大腸菌の特色

大腸菌の利点は、増殖速度が早く、簡単な培地で生育し、代謝活性が高いことなど基礎研究において有用性が高いことである。また、プラスミドと呼ばれる genome 外の自己複製DNAを持たせて、これを簡単に、単離することができるため、分子生物学の最も基本的な「道具」として使われる。

以下に保存法、培養法、用いる用具の滅菌法などについて述べる。

保存方法

1 短期保存

プレートによる保存（1週間）または、菌液による保存（2-3日）は4℃で行う。

2 長期保存

凍結：大腸菌は、菌液に対し等量のグリセロールを加えて、よく混ぜた後、-80℃で保存する。

スタップ：蓋付きの試験管にスタップアガロース(0.7-0.8%アガー-SOB)を入れ菌を接種する。フタをきつく閉めることにより、菌が一定に繁殖後低酸素状態となり、孢子状態で室温長期保存可能である。ただし、フタがゆるんだり、あまり高温にさらすと、死滅することもあるので注意。

培養方法

1 液体培養

大腸菌はなるべく好気的な条件下で培養するのが望ましい。少量の場合は蓋付きのチューブを用い、大量培養の場合はフラスコを用い、空気を十分とりこませるようにする。そのため、通常は、容器の容量の10-20%を目安にする。（50mlチューブで10mlまで、1lフラスコで200mlまで）。フラスコは、直線の往復運動で振盪する。また栄養に富んだ培地の方が大腸菌の収率はよい。

2 プレート培養

単一のコロニーを得るために行う。あらかじめ暖めておいたプレートに火炎滅

菌した白金耳の先に菌液をつけてストリークしたり、コーンラージ棒でプレート中央に垂らしたりして菌液を塗り広げる。

菌密度測定法

光度計による密度は、600nmの吸光による測定です。（実際には、500nm - 700nm でもほとんど同じ）その際ODがrecA+の菌で $1.3-1.5 \times 10^8$ 細胞、recA-の菌で $2-2.5 \times 10^8$ 細胞/mlに換算する。

滅菌方法

1. 乾熱滅菌

目的とする大腸菌を雑菌の混入なしに培養するために、使用する器具や材料を滅菌する必要がある。ガラス器具などを、口の部分を二重に重ね合わせたアルミホイルで多い、160℃で90分、加熱する。

2. オートクレーブ滅菌

培地や試薬の滅菌法に用いる。高圧滅菌器を用い加圧蒸気により100℃以上に加熱する方法で、121℃20分である。ふたは少しゆるめ、中に蒸気が侵入できるようにし、その上をアルミホイルで覆う。滅菌が予定通り行えたかどうかを確認するために、必ず滅菌確認用のテープをアルミホイルの上に貼ること。オートクレーブのなかに培地などがこぼれたときは、機械前面の天板を取り外し下部に飛び出している管の先のスクリュウキャップをはずし中の液を暖かいうちに回収し、機械の中に入れてさらに流しきれいにする。

3. 濾過滅菌

加熱滅菌できないような試薬を滅菌するときを使う。メンブレンフィルター0.22µmでは完全な滅菌を目的にした場合に用いられる。通常はメンブレンにシリンジをつけて濾過するが、ペリスタポンプを使用すると大量に濾過するときにより便利である。

大腸菌の TRANSFORMATION

1. competent cell をon iceで tappingしながら溶かす(mild)。

2. competent cell 200 μ l を 1.5 ml Eppen. tube (CONICAL TUBE)にとる。
3. DNAを>1ng 移す。
4. 20 min, once.
5. 90 sec, 42
6. 1min, once.
7. 0.8 ml LB medium を加える。
8. 30 min, 37 (振盪培養器 60rpm) .
9. Amp. Plateにまく。(1,10,100 μ l、そして、残りを遠心し再び100 μ lにしたもの)
10. O/N, 37

第二日目プラスミド精製 プラスミドのミニプレップ

(written by Dr. 白尾)

Stock Solution (one liter) in 4

Buffer A:	0.05 M	glucose	20% (1.1 M)	glucose	22.7 ml
	0.025 M	Tris-Cl pH8	1 M Tris	(pH8.0)	12.5 ml
	0.01 M	EDTA	0.5 M	EDTA	10 ml

Buffer B: 5 M KAc, pH4.8

(To make the KAc solution, mix 2 vol. of 5M HAc with 1 Vol. of 5M KAc. Acetic acid is 17.4 M.)

(This protocol is for 1.5 ml 5 hour culture from 2 ml culture)

1. Spin down cells, 2 min 12K rpm, 4 by using eppendorf tube.
2. Resuspend in 100 μ l in buffer A completely. Let stand 5 min at room temperature
3. Add 200 μ l of 0.2 N NaOH, 1% SDS: mix gently. **Don't use**

Vortex. (This solution should be made fresh each time. using 10 N NaOH stock.) Let stand 5 min on ice.

4. Add 150µl cold buffer B; mix gently and let stand 5 min on ice.
Don't use Vortex.
5. Spin 1 min in Eppendorf tube. (This removes SDS, protein, and tangled, denatured chromosomal DNA.)
6. Save supernatant, and add 2 Vol. of 100% EtOH (900µl). Let stand 2 min at room temperature, then spin 1 min.
7. Rinse pellet with 70 % EtOH, then dry.
8. Resuspend pellet in 100 µl of 1x TE.
9. Add 2 µl of 1µg/µl RNase and incubate 37 for 30 min. (**Do it in the other room**)
10. Add equal amount of phenol and mix well..Then spin down 1 to 5 min and save supernatant.
11. Add equal amount of chloroform and mix well. Then spin down 1 min and save supernatant.
12. Add 1/10 vol. of 3 M sodium acetate and 2 vol of 100 % EtOH. Incubate in cold and spin down 15 min at 13K.
13. Rise pellet with 70 % EtOH, then dry.
14. Resuspend pellet in 50 µl of 1x TE.

Large preparaton of plasmid DNA

1. 一晚培養した 440 ml LB を遠心管に移し、~~r7000~~ 10 min, C 4 で集菌。
2. 上清を捨て、残った上清はペーパータオルでふき取り。
冷 buffer A 20を ~~10~~ スポピペットで加え、ペレットをピペッティングにより懸濁、室温で 7.5min 静置。
3. 0.2 M NaOH, 1 % SDS を加え、静かに混合、氷温で ~~15~~ 静置。

(10M NaOH 0.8 ml + 10% SDS 4.2 ml + 0.5M Tris-HCl)

4. 冷 buffer B 30 を加え、静かに混合、氷温で静置。
5 min 間隔で状態を確認しながら、静かに容器を回す。
液層が清澄となったら、次に進む。(7.5 ~ 必要に応じ 80)
5. 7000 rpm, 20 min, 4°C
6. 乾熱滅菌したメスシリンダーに、上清を滅菌ガーゼで濾過する。これをオートクレーブした遠心管に移し、2 倍量の 95% EtOH を加え室温で 5 min 静置。
7. 7000 rpm, 20 min, 4°C
8. 沈殿を 70 % EtOH で洗浄し、減圧乾燥。
9. 15 ml TE に溶解し、50 ml コーニングチューブ (オレンジキャップ) に移す。
10. このステップはサンプルにより行う。
RNase A を 20 (10 mg/ml) を加え、37 °C, 30 min 反応させる。
11. Phenol / CH₂Cl₂ 3 ml を加え、vortex, 1 min 。
12. 水層を別のチューブに移し、CHCl₃ 3 ml を加え、vortex, 20 sec 。
13. 水層を別のチューブに移し、3M NaOAc 1 ml, 95 % EtOH 30 ml を加え、
-20 °C, 10 分静置。
14. 3000 rpm、15 分遠心し、0 % EtOH でペレットをリンス、減圧乾燥する。
15. ペレットの乾燥状態により、500 - 800 ml の TE でペレットを溶解。
これを全量で 950 ml となるよう TE を添加。
16. 1.050 M CsCl と 100 mM EtBr (10 g/l) 溶液を加え、混合。15000 rpm、5 分

遠心、上清を超遠心用チューブにシリンジで移す。(注射針(#18))

17. 950 ml TE と 1.050 g と 100 ml EtBr (10 g/l 溶液を混合し、これを超

遠心用チューブの肩口まで加える。

18. 2階。シーラー(予熱 5分)でシール。

19. 100,000 rpm、20°C、16時間以上遠心。

20. 遠心を止めたら、その場でサンプルのバンドをシリンジで吸引(注射針(#23))、15 ml チューブに入れる。

21. 2倍量の *n*-BuOH を加え、激しく攪拌して、遠心分離(7000 rpm, 1min)。

22. ブタノール層を廃棄、新たに2倍量の *n*-BuOH を加え、激しく攪拌して、遠心分離(7000 rpm, 1 min)。

23. 水層(下層)をパスツールピペットで取り、別のチューブに移す。

24. 全量が 2-4 ml となるように TE を加え、2倍量の 95% EtOH を添加し、15分氷冷。

25. エタノール沈殿後適量の TE に溶かす。

第三日目株化線維芽細胞の培養

【項目一覧】

A. 培養液と試薬(Media and Reagents)

B. 細胞培養及び継代法(Stock, Passage and Maintenance)

1. 培養の一般的諸注意

2. Original Stock 及び Experimental Stock 調整法

3. 凍結保存法

4. 樹立培養細胞の培養(Cell line)

5. 初代培養細胞の培養(Primary Cells)

C . 細胞数の求め方(Cell Count)

D . 細胞固定および染色法(Fixation and staining)

- 1 . ホルマリン法
- 2 . メタノール法
- 3 . ギムザ染色

A. 培養液と試薬(Media and Reagents)

培養液は通常ベースとなる培地に、抗生物質や血清などを添加して作る。通常よく用いられる basal medium としては、D'MEM(Eagle の minimum medium を Dulbecco が改変したもの)、HamF12, HamF10RPMI1640 などがあり、DMEM:HamF12(1:1)のようにこれらを mix することもある。組成の詳細は成書にゆずるが、成分で注目すべきは 1 . グルコース濃度、2 . アミノ酸、特にグルタミン酸の濃度(これが少ないと作った後の保存できる日数が短い)、添加する重曹の量、4 ビタミン、ミネラルなどの少量成分、脂質、増殖因子などの血清代用成分、などである。例えば HamF12 はチミジンをたくさん含むのでトリチウムチミジンの取り込みのアッセイには適さず、h p r t - 細胞の選択にも適さないなど、個々の培地にそれぞれの特徴があり、たかが培地の組成といえどもばかにしてはいけない。

血清

FBS/FCS(Fetal Bovine/Calf Serum)NCS(Newborn Calserum)、CS(Calf Serum)、HorseSerum など様々な血清があり、また、使用目的により、熱不活化、透析、活性炭処理などの様々な前処理を行う。使用目的、及びロットにより、濃度なども調製する。

PBS(-)

調製、混合済みの粉末を購入して、水に溶かし、オートクレーブ滅菌にて使用する。

トリプシン溶液(Trypsin solution)

調整済みのものを購入している。自己消化して活性が落ちるので、必ず低温保存する。少量ずつしか使用しない場合は、溶液は分注して凍結保存する。

EDTA 溶液(EDTA solution)

Ethylendiamine tetraacetic acid(1mM or 0.02%) in PBS(-)、オートクレーブ滅菌」。

B.細胞培養及び継代法(Stock,Cultivation,Passage and Maintenance)

1.培養の一般的注意

細胞培養は、ある程度の熟練を要する手技であり、また方法も個々の細胞によって異なり、一般化は難しい。自分で必ず使用する細胞の Data Sheet や文献を参考にして、至適な培養条件を見つけてやる必要がある。

培養細胞の特徴として培養中にその性質がどんどん変わってしまう(特に培養の下手な人が培養した場合)ため、必ず早い時期に original stock と experimental stock をつくり、

実験は experimental stock を解凍してから短期間に行う。

樹立細胞の場合でも、継続した培養は 2 ヶ月を限度とする。それ以上は細胞に以上が見られなくても廃棄して新たに experimental stock を解凍する細胞に異常(増殖が悪い、形態がおかしい等)が見られた場合は直ちに廃棄する。継代(Maintenance)している細胞は決してコンフルエントにしてはならない。

Medium は最低週 2 回程度交換する。黄色くしてしまった場合はその細胞は廃棄する。

2.Original Stockと Experimental Stock 調整法

Original Stock は供与を受けた細胞をなるべくその状態で保存するためのストックであり、なるべく継代数の少ないときに(できれば初代)に保存する。このストックは重要なので必ず 2 本以上作り、細胞数も多め(10^6 以上)に入れ、液体窒素で保存する。

Original Stockを調製する場合は、細胞とともに送られてきた Data Sheet(Data Sheet がない場合は Original Developer の文献)に基づいて培地や血清を用意し、下記のように増やして凍結保存法に従って保存する。

ストックの調製はプロトコール通りに行ってもうまくいかないこともあるので(解凍した細胞の生存率が悪い)、必ずストックした後に 1 本は解凍して確認する。

細胞がフラスコの状態で送られてきた場合は、細胞の状態を観察し状態が良く、活まき直す必要がない場合には、培養液を横にしてもこぼれない程度まで除き、ふたをゆるめてそのまま培養する。コンフルエントに近い場合はトリプシン処理をして細胞数に応じてまき直す。

細胞が凍結状態で送られてきた場合は、できるだけ速やかに細胞を急速融解し

(手のひらで暖める)、10ml の培養液 (血清入り) で洗浄後、細胞数に応じてや、6cm dish や 10 cm dish などに撒く。その際、細胞が浮遊していた保存液は通常 DMSO を含むので翌日培養液を交換することが重要である。

細胞がフラスコ 2 枚程度になった時点で数本以上に保存する。この時は必ず細胞数を数え、細胞名、継代数(この場合+p1)、細胞数、日付けを明記する。これを original stock とし、通常の実験には決して用いない。残りを撒き直す。

実験の目的にもよるが、この後 dish10 枚程度まで細胞を増やし最低 10 本のストックを作り、experimental stock とする。この中の 1 本を翌日解凍し、ストックがうまくいっていることを確認する。その後このストックから解凍したものを実験に使用し、このストックの数が減ったらここから再び 10 枚程度まで増やして、ストックを作り直す。保存の日数にもよるが Experimental Stock は一部を -80 で保存してもよい。

3. 培養細胞の凍結法

- 1 PBS(-)で洗浄する。
- 2 0.1%トリプシンで 5 ~ 15 分 incubate する
- 3 5 ~ 10 ml の完全培地を加えて、細胞を遠心管に回収する。
- 4 細胞浮遊液の一部を取り細胞数を数える。
- 5 その間に 800 回転で 5 分間遠心する。
- 6 上清を取り除き、200 万個 / ml ぐらいになるように完全培地を加え、よく再浮遊させる。
- 7 FM培地 (20% DMSO in FCS) を等量加え、1 ml ずつ凍結バイアルに入れる (細胞数 [100 万個 / ml ぐらいになっているはず]、日付、細胞名を明記すること)。
- 8 上記のバイアルをフリージングボックス (-4 で前もって冷やしておく。) に入れた後、-80 で 1 日保存する。
- 9 液体窒素中に保存した後、コンピューターに登録する。

4. 株化培養細胞(cell line)の培養

a. 培養条件は細胞によるが、DMEM+5-10%FCS で十分なものが多い。b. 接着細胞では肉眼的にサブコンフルエント(約 80%)になったら、また、浮遊細胞では対数増殖期の後半になったら、通常 1:3 から 1:10 程度の割合で希釈して継代する。一般的には樹立された細胞の培養は簡単であるが、コンフルエントにしたり、EDTA 処理が長すぎたりすると、傷みが早い。十分に注意して培養し、形態が多少でも変になれば廃棄して experimental stock に戻る。

5. 初代培養細胞(Primary Cells)

- a. 細胞毎に使用する培養液及び血清の濃度が異なるため、使用時には Original Developer による Data Sheet を必ず参照して用いる。
- b. 細胞は不死化しておらず、細胞が何世代目にあるかが非常に重要になるため、必ず継代数を明記しておく必要がある。
- c. 細胞はあまり薄くまくと増殖が悪くなるので、サブコンフルエントの細胞を 1:5 以下の希釈で継代するようにする。

6. トリプシン処理の仕方

- a. 培地を吸引で除く。
- b. PBS(-)で細胞表面をさっと洗い(1ml-5ml)、PBS を除く。
- c. EDTA 溶液を約 1ml 加え、適当時間おいて除く。
- d. トリプシン溶液を約 1ml(10cm-dish)を加える。
- e. 顕微鏡下で細胞が丸くなったのを確認した後、血清の入った培地を加えてトリプシン処理を停止して、ピペットを用いて細胞をはがし、細胞懸濁液を作る。
- f. 必要に応じて細胞数をカウントし希釈してまく。

注意点)

トリプシン処理ほど人によってやり方の異なるものはないので以下のようなことも参考にしたい。

c. の EDTA 処理時間ははがれやすい細胞(CHO など)では、数秒(つまり、EDTA 溶液を入れてすぐ捨てる)でよく、はがれにくければ数分処理する。また、EDTA とトリプシンをあらかじめ混ぜたものを使用してもよい。

d. では、トリプシン溶液を入れたままにしてもよい。吸い取ってしまうやり方のメリットはトリプシン処理で細胞は丸くなってはがれてくるが、トリプシン溶液を入れたままだと、はがれた細胞が浮き上がって凝集を作りやすくなる。吸い取ってしまえば、その場で丸くなっているため、きれいな細胞懸濁液ができ細胞数の計測も容易になる。

e. では細胞によりトリプシン処理時間が異なるので注意。非常にはがれにくい細胞では 37 °C のインキュベータに入れることもあるが、ほとんどの細胞は室温数分ではがれる。トリプシン処理は細胞の密度、トリプシンの力価により必要時間が異なるため毎回の実験条件をそろえるためには、時間を一定にして行うより、細胞の形態変化を目安にした方がよい。

C.細胞数の求め方(Cell Count)

1. 位相差用 Burker-Turk を用意する。
2. 培養細胞を 0.02% EDTA 入り PBS で洗う。
この時コンフルエントになっている細胞は剥がれやすいので注意。
(サブコンフルエントの細胞を植え次ぐのが原則である。)
3. 次に、0.25 %トリプシン (in 0.02 % EDTA 入り PBS)を加えて、5 分間 37 度でインキュベートする。
4. 完全培地を 10 倍料加えて、トリプシンの作用を抑えた後、軽くピペットでピペッティングして、遠心管に細胞を移す。
5. 遠心後培地を加え、ピペッティングにより細胞を解離させる。
6. 細胞浮游液を希釈する。
7. ミエローマ細胞などの大型細胞は 4 隅の四角 (0.04 mm²) を 16 ずつ 64 区画数える。その数を 125/32 倍すれば、1 ml あたりの数となる。
その数に希釈倍率をかければ、1 ml あたりの細胞数を得ることができる。

第四日目遺伝子導入

カルシウム・リン酸法

stock solution

2.5 mM CaCl₂

50 mM HEPES pH7.1 280 mM NaCl

150 mM Na₂HPO₄

10⁵ cell/3.5 cm dish

方法

1. 3 ug のプラスミドを 200 ul の TE にとく。
 2. 1. に 22 ul の 2.5 mM CaCl₂ を加える。
 3. 220 ul の 50 mM HEPES pH7.1 280 mM NaCl 溶液に 2 ul の 150 mM Na₂HPO₄ を加える。(5cc ぐらいのつるつるのチューブを用いる。)
 4. 3. に 2. を 20 ul ずつ滴下しては、瞬間ボルテックス操作を行い、全部混ぜる。
 5. 4. で沈殿ができていることを確認した後に、培地の 1/10 以下の volume を目的の培地に入れる (2 ml に 150 ul)。
- 注：co-transfection の場合は、耐性プラスミドは欲しいプラスミドの 1/10 ぐらい入れる。

トランスフェクタムは、独特の両親媒性と結合性を持つトランスフェクション用の試薬であり、真核細胞への外来 DNA(Plasmid)導入を効率よく行うことができる。操作は簡便・短時間であり、細胞毒性がないため幅広い細胞に利用可能である。

原理： トランスフェクタムは従来法(リン酸カルシウム法・リポソーム法・エレクトロポレーション法)とは異なる独自の方法に基づいている。トランスフェクタムは、その活性部分がリポスペルミンで構成されている合成カチオンリピドであり、反応中 800～1000 nm ミセルを形成する。このミセルは不安定で、スペルミン部分が DNA と強いアフィニティーを持つためプラスミドと相互作用して複合体を形成する。そして、速やかに、自然に細胞膜に結合し、エンドサイトーシスによって細胞内部に取り込まれる。

特長：

1. 操作が簡単

DNA とトランスフェクタムを混合して、培養細胞に加えるだけ。

2. 導入効率が高い

リン酸カルシウム法やリポソーム法に比べ効率が高い。

3. トランスフェクションに要する時間が短い

トランスフェクションの効率はホストとプラスミドの組み合わせに依存するので最適条件を求める必要があるが、多くの場合トランスフェクション時間は 30 分以内に短縮することができる。短時間で行えるため、細胞への影響を最小限に抑えることができ、特に無血清培養中で壊れやすい細胞に有用である。

4. 細胞毒性がない

トランスフェクタムは、高濃度や長時間の処理によっても毒性が認められない。そして、細胞由来の酵素により分解されるため、細胞内には残留物は認められない。従って、主要な生理的調節経路が影響を受けることはない。

5. 幅広い細胞に利用可能

幅広い細胞でトランスフェクションに成功している。特に、困難とされる初代培養細胞にも適している。

6. 試薬が安定である

粉末状で、冷蔵保存なら一年以上安定。調整液で、冷蔵保存で約 6 カ月安定。

実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック」(1996年)参照

第五日目蛍光顕微鏡を用いた発現蛋白の観察

D.細胞固定および染色法(Fixation and staining)

シャーレ上のコロニー数を数えるときや細胞の形態をそのまま保存したいときには固定を行う。以下、2法が一般的な方法であるが、細胞の形態を観察したいときは、ホルマリン法が適する。

1.ホルマリン法

(A)パラフォルムアルデヒドを用いた方法

Sodium Phosphate Buffers 0.2M stock :

71.6 gms/ liters $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (dibasic) (アルカリ)

31.2 gms/ liters $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (monobasic) (酸)

for 0.2 M pH7.4

420 mls stock dibasic

80 mls stock monobasic

4% paraformaldehyde: (ドラフト内でマグネティックスターラーを使って作る)

20 gms paraformaldehyde

dissolve in 250 mls H_2O at 60 (水が60になったら加熱するのを止めて、パラホルムアルデヒドをいれる。)

clear with 1M NaOH drop by drop

filter before use.

add equal volume of stock 0.2M phosphate buffer (pH 7.4)

(Bホルマリン水を用いた簡便法)

a. 3.7%ホルマリン水(市販特級)を使用する。ホルマリン水は溶媒にアルコールを含んでいることと、パラフォルムアルデヒドの分解産物を含んでいることに注意

b.メディアウムを吸引後、PBSで10%(ホルムアルデヒドとしての最終濃度3%)に薄めたホルマリン水を加える。。

c.そのまま二時間以上放置する(通常の目的には数分で充分)。

d. PBSで洗う。形態を保持するためにはできるだけ静かに(噴射瓶等を使用して)、表面を濯ぐ程度にする。

e 染色等に使用する。

2.メタノール法

a.細胞をPBS(-)で洗う。

b.100%メタノールを1-2ml/10cm-dishの目安で加える。

c.30-60 秒おいてから、余分のメタノールを捨てて、風乾する。

間接蛍光抗体法

1. Incubate the cells in 0.1% Triton X-100 for 10 min and next in PBS for 10 min.)
3. Incubate the cells in PBSA3 (3% BSA in PBS) for 30 min
4. Incubate the cells with first antibody for 2 hours. For control sections, skip this step.
5. Wash the cells 10 min three times with PBS.
6. Incubate the cells with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H & L) 1:100 dilution in PBSA for 30 min.
7. Wash the cells in PBS for 10 min three times
8. Mount the cells with Perma flow.