

細胞培養 基礎ハンドブック

基本的な細胞培養技術の習得と、
一貫した結果の達成

 Make the connection



本書の内容は、予告なしに変更されることがあります。

免責事項

サーモフィッシャーサイエンティフィックとその子会社は、製品性、特定目的への適合性、権利侵害のないことを含むがこれらに限定されない、本文書に関する明示的または黙示的なすべての保証を拒否します。法律の規定する程度まで、LIFE TECHNOLOGIES とその関連会社は、本文書の使用を含むがこれに限定されない本文書に関するまたはこれから生じる特別損害、偶発的損害、間接的損害、懲罰的損害、重畳的損害、結果的損害について、契約、不法行為、保証、または法令その他いかなる根拠に基づくかどうかにかかわらず、いかなる場合も責任を負いません。

目次

1. はじめに	1
本書の目的	1
細胞培養について	2
細胞培養とは?	2
有限寿命細胞株と不死化細胞株	2
培養条件	2
凍結保存	3
培養中の細胞の形態	3
細胞培養の用途	3
2. 細胞培養実験室	4
安全性	4
バイオセーフティーレベル	4
安全性データシート (SDS)	5
安全設備	5
個人用防護具 (PPE)	5
実験室における安全な作業方法	5
細胞培養装置	6
基本的な装置	6
追加装置	7
その他消耗品	7
細胞培養実験室	7
無菌操作領域	7
細胞培養フード	7
細胞培養フード内のレイアウト	9
インキュベーター	10
保管エリア	10
凍結保存	11
セルカウンター	11
無菌操作	12
はじめに	12
無菌操作領域	12
個人衛生	12
滅菌試薬および滅菌培地	12
滅菌処理	13
無菌操作チェックリスト	14

生物学的汚染	15
はじめに	15
細菌	15
酵母	16
カビ	16
ウイルス	17
マイコプラズマ	17
交差汚染 (クロスコンタミネーション)	18
抗生物質の使用	18
3. 細胞培養の基礎	19
細胞株	19
適切な細胞株の選択	19
細胞株の入手	20
培養環境	20
接着培養と浮遊培養	20
培地	21
血清	23
細胞培養プラスチック	23
pH	25
CO ₂	25
温度	25
細胞の形態	26
哺乳類細胞	26
哺乳類細胞における形態のバリエーション	26
293 細胞の形態	27
昆虫細胞	28
Sf21 細胞の形態	28
Sf9 細胞の形態	29
4. 細胞培養法	30
培養細胞を維持するためのガイドライン	30
継代培養とは?	30
継代の時期	31
一般的な細胞株に推奨される培地	32
TrypLE 解離酵素	34

接着細胞の継代	35
必要な物品	35
接着細胞の継代プロトコル	35
接着性昆虫細胞の継代に関する注意事項	37
浮遊細胞の継代	38
浮遊培養物の継代	38
浮遊培養容器	38
必要な物品	39
浮遊細胞の継代プロトコル	39
浮遊性昆虫細胞の継代に関する注意事項	41
細胞の凍結	42
凍結保存	42
凍結保存のガイドライン	42
凍結培地	43
必要な物品	43
培養細胞の凍結保存プロトコル	44
凍結細胞の融解	45
融解のガイドライン	45
必要な物品	45
凍結細胞の融解	46
5. トランスフェクションの基礎	47
トランスフェクション入門	47
トランスフェクションとは?	47
用語	47
用途	48
トランスフェクションの種類	49
一過性トランスフェクション	49
安定トランスフェクション	50
トランスフェクション法の選択	51
遺伝子導入技術	53
カチオン性脂質による導入	54
リン酸カルシウム共沈殿法	56
DEAE-デキストラン法による導入	57
他のカチオン性ポリマーによる導入	58
ウイルスによる導入	59
エレクトロポレーション	61
その他の物理的導入法	62

カチオン性脂質媒介性トランスフェクション	63
メカニズム	63
カチオン性脂質トランスフェクション試薬	64
ウイルスによる遺伝子導入	66
ウイルスベクターの主な特徴	66
一般的なウイルスベクター	67
エレクトロポレーションー Neon Transfection System	69
安定トランスフェクションにおける細胞の選択	71
真核生物のための抗生物質の選択	71
レポーター遺伝子アッセイ	73
トランスフェクションアッセイ	73
遺伝子調節アッセイ	73
一般的なレポーター遺伝子	74
RNAi とノンコーディング RNA の研究	75
RNAi に関する一般用語集	75
RNAi のしくみ	76
siRNA 解析	76
miRNA 解析	77
RNAi 法の選択	78
6. トランスフェクション法	79
トランスフェクション効率に影響を与える要因	79
細胞型	79
細胞の健全性および生存率	80
細胞密度	81
培地	81
血清	82
抗生物質	82
トランスフェクションする分子のタイプ	83
トランスフェクション法	83
トランスフェクション法の選択 (非ウイルス性)	84
不死化細胞株	84
初代細胞と有限寿命培養	85
ウイルス DNA 導入システムの選択	86
哺乳類細胞での発現	86

プラスミド DNA トランスフェクションのガイドライン	87
ベクターで考慮すべきこと	87
プラスミド DNA の品質	87
遺伝子産物とプロモーター	88
コントロール	88
プラスミド DNA トランスフェクションの最適化	89
リン酸カルシウム共沈殿法で考慮すべきこと	89
カチオン性脂質による導入で考慮すべきこと	90
エレクトロポレーションで考慮すべきこと	93
安定的なトランスフェクタントの選択	94
準備	94
死滅曲線	94
選択ワークフロー	95
RNAi 法の選択	96
siRNA アプローチ vs ベクターアプローチ	96
非ベクター siRNA テクノロジー	97
siRNA トランスフェクション	99
ベクター媒介 RNAi	99
RNA トランスフェクションのガイドライン	101
RNAi ワークフロー	101
RNA の取り扱い	102
トランスフェクション効率	102
ポジティブコントロール	102
ネガティブコントロール	103
コトランスフェクション	103
siRNA の品質	104
siRNA の量	104
トランスフェクション試薬の量	105
細胞密度	105
トランスフェクション試薬 / siRNA 複合体への曝露	105
トランスフェクション中の血清の存在	105
siRNA 実験を成功させるためのコツ	106
siRNA トランスフェクションの最適化	107
siRNA トランスフェクション効率に影響を与える要因	107

付録	108
トラブルシューティング	108
細胞培養およびトランスフェクションに関する製品	109
細胞株	109
哺乳類細胞用培地	110
昆虫細胞用培地	111
細胞培養用血清	111
細胞培養用プラスチック	112
細胞培養用実験試薬	113
抗生物質および抗真菌剤	114
成長因子および精製タンパク質	115
セルカウンター	116
トランスフェクション試薬	116
Neon Transfection System	117
RNA 干渉	117
3D 細胞培養	118
オルガノイド、スフェロイド、3D 細胞培養	118
細胞培養用実験装置	119
CO ₂ インキュベーター	119
生物学的安全キャビネット	119
遠心分離機	119
その他の参考資料	120
Gibco 教育コンテンツ	120
Gibco がんの基礎	120
哺乳類細胞培養および昆虫細胞培養	120
細胞と組織の分析	120
細胞生物学サービス	121
安全性データシート	121
分析証明書	121
テクニカルサポート	121
限定製品保証	121
参考文献	122

1. はじめに

本書の目的

この「細胞培養基礎ハンドブック」は、thermofisher.com/cellculturebasics でダウンロード可能な「細胞培養の基礎動画」の補足となるものです。

このハンドブックと動画は、細胞培養の基礎を紹介することを目的としています。本書における最初の 4 つの章では、細胞培養に焦点を当て、細胞培養実験室の要件、実験室の安全性、無菌操作、細胞培養における微生物汚染などのトピックを扱い、培養細胞の継代、凍結、融解の基本的な方法を説明します。本書における後続の 2 つの章では、さまざまなトランスフェクション技術に焦点を当て、適切なトランスフェクション法の選択、プラスミド DNA、オリゴヌクレオチド、RNA による細胞のトランスフェクション、*in vitro* および *in vivo* のトランスフェクションに用いる培養細胞の調製、トランスフェクションされた細胞の選択に関して、一般的なガイドラインを記載しています。

このハンドブックと基礎動画で示されている情報とガイドラインは、細胞株（有限寿命または不死化）に焦点を当てており、組織の分離および解離、細胞の多能性幹細胞へのリプログラミング、幹細胞のさまざまな系統への分化など、初代培養や幹細胞に関する実験および方法を省略しています。



細胞培養実験には基礎的な部分でいくつかの共通項がありますが、細胞培養条件は細胞型ごとに大きく異なることに注意してください。特定の細胞型に必要な培養条件から逸脱すると、異なる表現型が発現する可能性があります。そのため、目的の細胞株に精通し、実験で使用している各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

細胞培養について

細胞培養とは? 細胞培養とは、動物または植物の細胞を採取し、好ましい人工環境で増殖させることを指します。細胞は、組織から直接採取して、培養前に酵素または機械的手段でバラバラにして用いる場合もあれば、すでに樹立されている細胞株またはそのサブクローン細胞株から使用する場合があります。

初代培養

初代培養とは、細胞を組織から分離し、細胞がプレート内の表面をすべて覆う（コンフルエントに達する）まで、適切な条件下で増殖させる培養段階を指します。この培養段階では、細胞が継続的に増殖できるスペースを設けるため、細胞を新しい増殖培地を入れた新しい容器に移して、継代培養（植え継ぎ）する必要があります。

細胞株

最初の継代培養後、初代培養細胞は細胞株と呼ばれるようになります。初代培養に由来する細胞株は寿命が限られています（有限寿命、以下を参照）。継代培養されることで、もっとも高い増殖能力を持つ細胞が優勢になり、集団内で遺伝子型および表現型の均一性がある程度得られます。

細胞系

細胞株の亜集団に対して、クローニングなどの方法によって培養細胞から必要な細胞株を選択した場合、細胞系と呼ばれます。親株の培養開始後には、細胞系が追加の遺伝的変化を獲得することがよくあります。

有限寿命細胞株と不死化細胞株

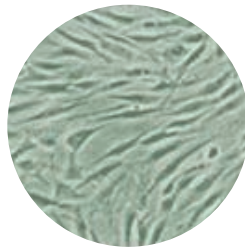
正常細胞は通常、限られた回数しか分裂せず、その後増殖能を失います。これは遺伝的に決定されている細胞老化という現象です。このような細胞株は有限寿命細胞株として知られています。しかし、一部の細胞株は形質転換と呼ばれるプロセスを経て不死化します。このプロセスは自然に生じることあれば、化学的またはウイルス学的に誘導されることもあります。有限寿命細胞株が形質転換を経て、無制限に分裂する能力を獲得すると、その細胞株は不死化細胞株となります。

培養条件

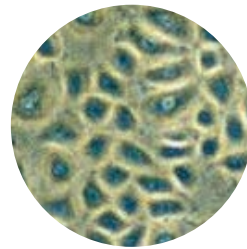
培養条件は細胞型によって大きく異なります。しかし、人工の細胞培養環境では、必須栄養素（アミノ酸、炭水化物、ビタミン、ミネラル）、成長因子、ホルモン、ガス（ O_2 、 CO_2 ）を供給する基質または培地を含む適切な容器が常に使用され、物理化学的環境（pH、浸透圧、温度）が調節されます。ほとんどの細胞は接着依存性であり、固体または半固体の基質に接着した状態で培養する必要がありますが（接着培養または単層培養）、その他の細胞は培地に浮遊させて培養できます（浮遊培養）。

凍結保存 継代培養で余剰の細胞が得られる場合は、適切な保護剤 (DMSO やグリセロールなど) で処理し、必要になるまで -130°C 未満の温度で保存する必要があります (凍結保存)。細胞の継代と凍結保存の詳細については、「培養細胞を維持するためのガイドライン」(ページ 30) を参照してください。

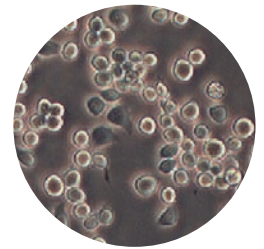
培養中の細胞の形態 培養中の細胞は、その形状と外観 (形態) に基づいて 3 つの基本的なカテゴリーに分類できます。



線維芽細胞 (または線維芽細胞様細胞) は、双極性または多極性で、細長い形状を有し、基質に接着して増殖します。



上皮様細胞は、より規則的な多角形をしており、個別のパッチで基質に接着して増殖します。



リンパ芽球様細胞は球形で、通常は表面に接着することなく浮遊状態で増殖します。

細胞培養の用途 細胞培養は、細胞生物学および分子生物学で使用される主要なツールの 1 つです。細胞における正常な生理学的・生化学的機能 (代謝研究、老化など)、薬物および毒性化合物の細胞への影響、突然変異誘発および発がん性を研究する上で非常に優れたモデルシステムです。また、薬物のスクリーニングと開発、および生物学的化合物 (ワクチン、治療用タンパク質など) の大規模製造にも使用されます。こうした用途に細胞培養を使用する主な利点は、同一バッチのクローン細胞を使用することにより達成される、結果の一貫性と再現性にあります。

2. 細胞培養実験室

安全性

細胞培養実験室には、電気や火災の危険性など、日常の作業場所のほとんどに共通する安全上のリスクに加えて、ヒトまたは動物の細胞と組織、そして毒性、腐食性、変異原性の溶媒および試薬を取り扱うことに関連した特定の危険性が多く存在します。こうした危険性の中で一般的なものとしては、注射針などの汚染された鋭利物による偶発的な穿刺、皮膚および粘膜への流出や飛沫、マウスピペティングによる摂取、動物の咬傷および搔傷、感染性エアロゾルへの吸入曝露などがあります。

バイオセーフティープログラムの基本的な目的は、実験従事者および外部環境が有害である可能性のある生物由来物質に曝露する機会を低減および排除することです。細胞培養実験室における安全性にとって、もっとも重要な要素は、標準的な微生物学の手順と技法を厳格に遵守することです。

バイオセーフティーレベル

バイオセーフティーレベルに関する情報は、日本では、厚生労働省所管の国立感染症研究所による「国立感染症研究所病原体等安全管理規定（改訂第三版）」に記載されています。この文書では、バイオセーフティーレベル1から4までの4段階（昇順）の封じ込めレベルが定義されており、特定の薬剤の取り扱いに関連するリスクレベルに対応した、微生物学の手順、安全設備、施設の安全対策について説明されています。

バイオセーフティーレベル 1 (BSL-1)

BSL-1は、ほとんどの研究室および臨床検査室に共通する保護の基本レベルであり、正常で健康な人に疾患を引き起こすことが知られていない定義・特性評価済みの生菌株に適しています。

バイオセーフティーレベル 2 (BSL-2)

BSL-2は、摂取、または経皮や粘膜への曝露により重症度の異なるヒトの疾患を引き起こすことが知られている中等度のリスクの病原体に適しています。ほとんどの細胞培養実験室はBSL-2以上である必要がありますが、正確な要件は使用する細胞株と実施する作業の種類によって異なります。

バイオセーフティーレベル 3 (BSL-3)

BSL-3は、空気感染の可能性があることが知られている常在性または外来性の病原体、および重篤で潜在的に致死的な感染を引き起こす可能性のある病原体に適しています。

バイオセーフティーレベル 4 (BSL-4)

BSL-4は、空気感染により生命を脅かす疾患を引き起こす個人的リスクが高く、感染した場合に治療法がない外来性の病原体に適しています。これらの病原体は、封じ込めレベルが高い実験室に制限されています。

安全性データシート (SDS) 安全性データシート (SDS) は、特定の物質の特性に関する情報が記載されたフォームです。融点、沸点、引火点などの物理的データだけでなく、物質の毒性、反応性、健康への影響、保存方法、廃棄方法、推奨される防護具、漏出の際の取り扱い方法に関する情報が記載されています。

当社の製品に関する SDS は、thermofisher.com/sds で閲覧できます。

安全設備 細胞培養実験室の安全設備には、バイオセーフティーキャビネット（細胞培養フード）や密閉容器など、有害物質に曝露する機会を排除または最小限に抑えるように設計された工学的制御装置が含まれます。また、こうした一次バリアと組み合わせで使用されることが多い個人用防護具（PPE）も含まれます。バイオセーフティーキャビネットは、多くの微生物学的手順で生成される感染性飛沫またはエアロゾルを封じ込める上でもっとも重要な機器です。詳細については、「細胞培養フード」（ページ 7）を参照してください。

個人用防護具 (PPE) 個人用防護具は、人と有害物質の間に直接的なバリアを形成するものです。手袋、白衣およびガウン、靴カバー、ブーツ、呼吸マスク、フェイスシールド、安全メガネ、ゴーグルなどの個人を防護するための防具を指します。個人用防護具は多くの場合、バイオセーフティーキャビネットなど、取り扱う病原体、動物、物質を封じ込める装置と組み合わせで使用されます。実験室における個人用防護具の適切な使用方法については、所属機関のガイドラインを参照することをお勧めします。

実験室における安全な作業方法 以下の推奨事項は、実験室で安全に作業を行うための一般的なガイドラインです。完全な実務規範として解釈しないでください。所属機関の安全委員会に問い合わせて、実験室の安全性に関する地域の規則・規制に従ってください。

標準的な微生物学的手順、およびバイオセーフティーレベルのガイドラインに関する詳細については、国立感染症研究所ホームページ (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/byougen-kanri.html>) から入手可能な「国立感染症研究所病原体等安全管理規定（改訂第三版）」を参照してください。

- 適切な個人用防護具を常に着用してください。汚染された場合は手袋を交換してください。使用済みの手袋は、他の汚染された実験室廃棄物と一緒に処分してください。
- 有害である可能性のある物質を取り扱った後は、実験室を出る前に手を洗ってください。
- 実験室では、飲食、喫煙、コンタクトレンズの脱着、化粧品の塗布、食品の保存を行わないでください。
- 鋭利な物（針、メス、ピペット、壊れたガラス器具など）の安全な取り扱いについては、所属機関の方針に従ってください。

安全性 (続き)

- エアロゾルや飛沫の発生を最小限に抑えるように注意してください。
- 実験の前後、および感染の可能性のある物質がこぼれたり飛散したりした直後には、適切な消毒剤ですべての作業面を滅菌してください。実験装置は、汚染されていなくても、定期的に清掃してください。
- 培養物やストックなど感染の可能性のある物質は、廃棄する前にすべて滅菌してください。
- 感染性物質への曝露につながる可能性のあるインシデントがあれば、適切な担当者（実験室の監督者、安全担当者など）に報告してください。

細胞培養装置

細胞培養実験室特有の必要条件は主に、実施される研究の種類によって異なります。たとえば、がん研究を専門とする哺乳類細胞培養研究室のニーズは、タンパク質発現に焦点を当てた昆虫細胞培養研究室のニーズとはまったく異なります。しかし、すべての細胞培養実験室に共通する要件があります。それは、病原性微生物が存在しない状態（無菌状態）です。また、細胞の培養に不可欠な基本的な装置についても、いくつか同じものが共通して使用されています。

このセクションでは、ほとんどの細胞培養実験室に共通する装置と備品をリストしています。また、作業をより効率的または正確に実行できるようにしたり、より広範囲のアクセシビリティを可能にしたりする有用な装置についてもリストしています。このリストはすべてを網羅しているわけではないことに注意してください。細胞培養実験室の要件は、実施する研究の種類によって異なります。

基本的な装置

- 細胞培養フード(層流フードまたはバイオセーフティーキャビネット)
- インキュベーター(湿潤CO₂インキュベーターを推奨)
- ウォーターバス
- 遠心分離機
- 冷蔵庫および冷凍庫(-20°C)
- セルカウンター(Invitrogen™ Countess™ II 自動セルカウンターや血球計算盤など)
- 倒立顕微鏡
- 液体窒素(N₂)フリーザーまたは凍結保存容器
- 滅菌器(オートクレーブ)

- 追加装置
- 吸引ポンプ(ぜん動または真空)
 - pHメーター
 - ローラーラック(単層培養のスケールアップ用)
 - 共焦点顕微鏡
 - フローサイトメーター
 - バイオリアクター
 - セルキューブ

- その他消耗品
- 細胞培養容器(フラスコ、ディッシュ、マルチウェルプレートなど)
 - ピペットおよびピペッター
 - 注射器および注射針
 - 廃棄容器
 - 培地、血清、試薬
 - 細胞

細胞培養実験室

無菌操作領域 細胞培養実験室の主な要件は、細胞培養作業に限定された無菌操作領域を維持することです。隔離された組織培養室が理想的ですが、細胞培養、試薬、培地の滅菌処理、インキュベーション、保管には、大きな実験室の中に指定された細胞培養領域を使用することもできます。無菌状態を提供するためのもっとも簡単で経済的な方法は、細胞培養フード(バイオセーフティーキャビネット)を使用することです。

細胞培養フード 細胞培養フードを使用すると、多くの微生物学的手順で生成される感染性飛沫またはエアロゾルの封じ込めを可能にしながら、無菌操作領域を維持できます。さまざまな研究ニーズや臨床ニーズに応えるため、3種類の細胞培養フード(クラスI、II、IIIの分類)が開発されています。

細胞培養フードのクラス

クラス I の細胞培養フードは、適切な微生物学的手法に従った場合に、実験室の担当者および環境に対して非常に高いレベルの保護を提供しますが、培養物を汚染から保護することはできません。この設計と気流特性は、化学実験室用のドラフトと似ています。

クラス II の細胞培養フードは、BSL-1、2、3 を必要とする物質を取り扱う作業に適した設計であり、細胞培養実験に必要な無菌環境も提供します。有害である可能性のある物質（霊長類由来の培養物、ウイルスに感染した培養物、放射性同位元素、発がん性試薬または有毒試薬など）を取り扱う際には、クラス II のバイオセーフティーキャビネットを使用する必要があります。クラス II のバイオセーフティーキャビネットは、もっとも一般的なタイプの細胞培養フードです。

クラス III のバイオセーフティーキャビネットは気密性があり、担当者および環境に対して達成し得るもっとも高いレベルの保護を提供します。既知のヒト病原体などの BSL-4 を必要とする物質を取り扱う作業には、クラス III のバイオセーフティーキャビネットが必要です。

細胞培養フードの気流特性

クラス II のバイオセーフティーキャビネットは、HEPA フィルターでろ過された空気を、作業領域上に常に一定方向に流し続けることにより、ほこりやその他の空気中の汚染物質から作業環境を保護します。

このフード (クラス II BSC) は、ユーザーと細胞培養物の両方に対して非常に高いレベルの保護を提供します。

クリーンベンチ

水平層流または垂直層流の「クリーンベンチ」は、バイオセーフティーキャビネットではありません。こうした装置は、HEPA フィルターでろ過された空気をキャビネットの背面から作業面を横切ってユーザーに向けて排気するため、有害である可能性のある物質にユーザーがさらされる可能性があります。こうした装置では、ベンチ内のみが保護されます。クリーンベンチは、ほこりのない状態における滅菌装置や電子機器の組み立てなど、特定のクリーンな作業に使用できます。細胞培養材料や薬物製剤を取り扱う際や、感染の可能性のある物質を取り扱う際には絶対に使用しないでください。

バイオセーフティーキャビネットの選択、設置、使用に関する詳細については、国立感染症研究所ホームページ (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/byougen-kanri.html>) から入手可能な「国立感染症研究所病原体等安全管理規定 (改訂第三版)」を参照してください。

細胞培養フード内のレイアウト

クラスIIのバイオセーフティーキャビネットは、一度に一人が使用するのに十分な大きさである必要があります。また、内外を簡単に清掃でき、十分な照明があり、不自然な姿勢をとらずに快適に使用できる必要があります。細胞培養フード内の作業スペースを清潔で整頓された状態に保ち、視線を遮るものがないようにしてください。細胞培養フードに入れた各アイテムに70%エタノールをスプレーし、きれいに拭いて消毒してください。

細胞培養フード内のアイテムの配置は、右利きの場合は以下のルールに従います。このルールは、特定の用途に使用する追加のアイテムを含める場合に変更できます。

- 中央には、広くて清潔な作業スペースと細胞培養容器
- 右手前にはピペッター、左にはガラスピペット(簡単に手が届くように)
- 右後方には試薬と培地(簡単にピペティングできるように)
- 中央後方には、廃液を入れるための小さな容器

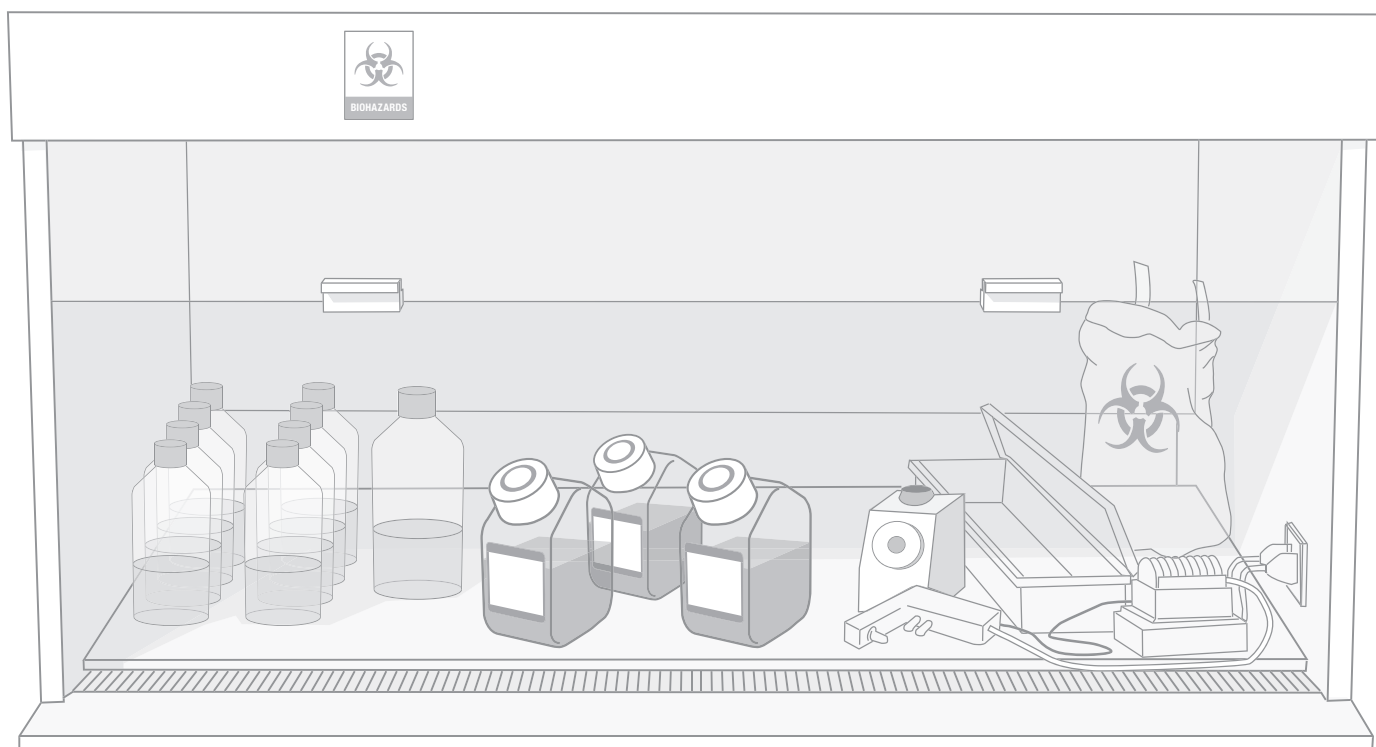


図 2.1: クラスII BSC内で「クリーンからダーティーへ」作業するための一般的なレイアウト。クリーンな培養物(左)を用いて、培養・実験を行います(中央)。汚染されたピペットはトレイに廃棄でき、他の汚染物質はバイオハザードバッグに入れられます(右)。左利きの人の場合は、この配置が逆になります。

細胞培養実験室 (続き)

インキュベーター インキュベーターの目的は、細胞が本来生存している体内環境に近い、細胞増殖に適した環境を提供することです。インキュベーターは十分に大きく、強制空気循環があり、 $\pm 0^{\circ}\text{C}$ 以内の温度制御ができる必要があります。ステンレス鋼のインキュベーターは、特にインキュベーションに湿った空気が必要な場合に、清掃が容易で、高い防食性能があります。純銅製インキュベーターは、清掃や手入れが簡単です。細胞培養インキュベーターの無菌状態の要件は、生物学的安全キャビネットの要件ほど厳格ではありませんが、細胞培養物の汚染のリスクを減らすために、インキュベーターの頻繁な清掃が不可欠です。

インキュベーターの種類

インキュベーターは、大きく分けてウォータージャケット式と直接加熱式(エアジャケット式)の CO_2 インキュベーターの2つのタイプがあります。ウォータージャケットインキュベーターは古い技術ですが、停電時に状態を維持するのに適しています。直接加熱式(エアジャケット式)インキュベーターは、自動化された高温滅菌サイクルを提供しますが、その効果を別途検証する必要があります。いずれにせよ、全体の均一な状態と、ドアを開けた後の迅速な回復を確保するには、ファンを使用したアクティブな空気循環が不可欠です。

保管エリア 細胞培養実験室には、培地や試薬などの液体、薬剤や抗生物質などの化学物質、使い捨てピペット、培養容器、手袋などの消耗品、培地ボトルやガラスピペットなどのガラス製品、特殊な装置、組織および細胞を保存するためのエリアが必要です。

ガラス製品、プラスチック、特殊な装置は、室温で棚や引き出しに保管できます。ただし、培地、試薬、化学薬品はすべて、ラベルに記載されている指示に従って保管することが重要です。

一部の培地、試薬、化学薬品は光に不安定です。通常の実験室における照明条件下で使用する場合は許容されますが、使用しないときは暗所で保管するか、アルミホイルで包む必要があります。

冷蔵庫

小規模な細胞培養実験室の場合は、試薬や培地を $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管するのに家庭用冷蔵庫(自動霜取り冷凍庫がないものが望ましい)があれば十分で、コストも安価に抑えられます。大規模な細胞培養実験室の場合は、細胞培養専用の冷蔵庫があった方が適切です。汚染を避けるために、冷蔵庫や冷蔵室は定期的に清掃してください。

冷凍庫

ほとんどの細胞培養試薬は $-5 \sim -20^{\circ}\text{C}$ で保管できます。そのため、ほとんどの試薬の場合、超低温冷凍庫 (-80°C の冷凍庫) での保管は、必ずしも必要ではありません。実験室用冷凍庫の代わりに家庭用冷凍庫を使用すると、コストを安価に抑えられます。ほとんどの試薬は自動霜取り (自動解凍) 冷凍庫における温度・振動に耐えられますが、抗生物質や酵素などの一部の試薬は、自動霜取りが行われない冷凍庫に保管する必要があります。

凍結保存 連続培養の細胞株は、継代数が増えるにつれて遺伝的に不安定になる可能性が高くなります。したがって、細胞のワーキングストックを準備し、凍結保存することが不可欠です。詳細については、「細胞の凍結」(ページ 42) を参照してください。細胞を -20°C または -80°C の冷凍庫に保管しないでください。こうした温度で保管すると、細胞の生存率が低下します。

液体窒素保存システムには、主に気相と液相の 2 つのタイプがあります。この保存容器には、広口と細口のいずれかがあります。気相システムは、凍結保存チューブによる爆発の危険性を最小限に抑えることができるため、バイオハザード物質を保管する際に必要となります。一方で液相システムは、通常、静的保持時間が長いいため、コストをより安価に抑えることができます。

細口容器は、窒素蒸発速度が遅く、コストをより安価に抑えることができます。広口容器は、アクセスが簡単で、保存容量が大きくなります。

セルカウンター セルカウンターは、増殖速度を定量的に観察するために不可欠です。実験室で 2 つまたは 3 つを超える細胞株を培養する場合に大きな利点があります。

Countess II 自動セルカウンターは、標準的なトリパンプルー取り込み技術を使用して、細胞数と生存率 (生細胞数、死細胞数、総細胞数) をサンプルあたり 1 分未満で正確かつ精密に測定できるベンチトップ機器です。Countess II 自動セルカウンターでは、血球計算盤で現在使用しているのと同じサンプル量を使用する場合、通常の細胞計数に要する時間はサンプルあたり 1 分未満です。そのため、さまざまな真核細胞に対応できます。

無菌操作

はじめに 細胞培養の成功は、細菌、真菌、ウイルスなどの微生物による汚染から細胞を保護することにかかっています。滅菌されていない消耗品、培地、試薬、微生物を含んだ浮遊粒子、汚れたインキュベーター、汚れた作業面がすべて生物学的汚染の原因となります。

無菌操作は、環境中の微生物と無菌細胞培養物との間にバリアを作ることが目的です。そのため、無菌操作では、こうした汚染源による汚染のリスクを減らすための一連の手順が重要となります。無菌操作は、無菌操作領域、個人衛生、滅菌試薬および滅菌培地、滅菌処理という要素で構成されています。

無菌操作領域 浮遊粒子やエアロゾルによる汚染（ほこり、孢子、皮膚の脱落、くしゃみなど）を減らすためのもっとも簡単で低コストな方法は、細胞培養フードを使用することです。

- クラス II バイオセーフティーキャビネットは、適切に設置する必要があります。ドア、窓、その他の機器からの通風がなく、外部との往来がない細胞培養専用のエリアに配置してください。
- 作業面は整頓されていて、特定の手順に必要な物のみが置かれている必要があります。保管場所としては使用しないでください。
- 作業面は、使用の前後に徹底的に消毒する必要があります。周辺の領域と機器は、定期的に清掃してください。
- 定期的な清掃を行う際は、作業前と作業中、特に液体がこぼれた場合に、作業面を 70% エタノールで拭いてください。
- 細胞培養フード内で、火災滅菌のためにブンゼンバーナーを使用する必要はなく、推奨しません。

細胞培養フードは常に稼働させたままにしてください。長期間使用しない場合にのみオフにしてください。

個人衛生 細胞培養を行う前後には手を洗ってください。また、個人用防護具を着用することで、有害物質から自分の身を守るだけでなく、脱落した皮膚、衣服の汚れやほこりによる汚染の可能性を減らすことができます。

滅菌試薬および滅菌培地 市販の試薬や培地は、無菌性を確保するために厳格な品質管理が行われていますが、取り扱い中に汚染する可能性があります。汚染を避けるため、滅菌処理に関する以下のガイドラインに従ってください。実験室で調製した試薬、培地、溶液は、適切な滅菌手順（オートクレーブ、滅菌フィルターなど）を使用して必ず滅菌してください。

滅菌処理

- 手と作業領域は、70% エタノールで常に拭いてください。
- 容器、フラスコ、プレート、ディッシュは、細胞培養フードに入れる前に、外側を70% エタノールで拭いてください。
- 培地と試薬をボトルやフラスコから直接注がないでください。
- 液体を取り扱う際は、滅菌ガラスまたは使い捨てプラスチックピペットおよびピペッターを使用してください。交差汚染を避けるために、各ピペットの使用は1回のみにしてください。滅菌ピペットは、使用するまで開封しないでください。ピペットは作業領域に保管してください。
- 使用後はボトルやフラスコに必ずふたをし、マルチウェルプレートをテープで密封するか、ジッパー付きの袋に入れて、微生物や空気中の汚染物質が侵入しないようにしてください。
- 滅菌したフラスコ、ボトル、ディッシュなどは、使用直前まで決してカバーを取らず、環境に曝露した状態で放置しないでください。作業が終わり次第、カバーを戻してください。
- キャップやカバーを取り外して作業面に置く必要がある場合は、開口部を下に向けて置いてください。
- ガラス器具およびその他の装置は、滅菌したもののみを使用してください。
- 滅菌手順を行う際には、会話をしたり、歌を歌ったり、口笛を吹いたりしないように注意してください。
- 汚染を最小限に抑えるため、実験はできる限り速やかに行うようにしてください。

無菌操作チェックリスト

以下のチェックリストには、無菌操作を確実にを行うためのガイドとなる推奨事項と手順が簡潔に記載されています。無菌操作の詳細については、『Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications』（Freshney, 2016）を参照してください。

作業領域	
クラスIIバイオセーフティーキャビネットは正しく設置されていますか？	
バイオセーフティーキャビネットは、通風および外部と往來のないエリアにありますか？	
作業面は整頓され、実験に必要な物のみが置かれていますか？	
作業前に作業面を70%エタノールで拭きましたか？	
インキュベーター、冷蔵庫、冷凍庫、その他の実験装置を定期的に清掃および滅菌していますか？	
個人衛生	
手を洗いましたか？	
個人用防護具を着用していますか？	
長髪の場合は、髪を後ろでまとめていますか？	
液体を取り扱う際は、ピペッターを使用していますか？	
試薬および培地	
実験室で調製した試薬、培地、溶液を適切な手順で滅菌しましたか？	
ボトル、フラスコ、プレートを作業面に置く前に、70%エタノールで外側を拭きましたか？	
ボトルやフラスコなどの容器はすべて、使用していないときにはふたをしていますか？	
プレートはすべて、ジッパー付きの滅菌バッグに保管されていますか？	
濁っている試薬や、汚染されているような試薬はありますか？ 浮遊物が混入していますか？ 異臭や色の異常がありますか？ もしあった場合には、滅菌して廃棄しましたか？	
操作	
無菌操作を意識して、ゆっくりと慎重に作業していますか？	
ピペッター、ボトル、フラスコを含むすべての物について、細胞培養フードに入れる前に表面を70%エタノールで拭きましたか？	
作業領域では、ふたやカバーを下向きに置いていますか？	
すべての液体の取り扱いには、滅菌ガラスピペットまたは滅菌済み使い捨てプラスチックピペットを使用していますか？	
交差汚染防止のため、滅菌済みピペットの使用を1回のみとしていますか？	
滅菌されていないものにピペットチップが触れないように注意していますか？	
液体がこぼれた場合はすぐに拭き取り、その部分を70%エタノールで拭きましたか？	

はじめに 細胞培養の汚染は、細胞培養実験室で発生するもっとも一般的な問題で、ときとして非常に深刻な結果を招くことがあります。細胞培養における汚染物質は、2つの主なカテゴリーに分類できます。培地、血清、水に含まれる不純物（エンドトキシン、可塑剤、界面活性剤を含む）などの化学的汚染物質と、細菌、カビ、酵母、ウイルス、マイコプラズマ（他の細胞株による交差汚染を含む）などの生物学的汚染物質です。汚染を完全に排除することは不可能ですが、汚染源を十分に理解し、適切な無菌操作を行うことにより、その頻度と重大性を低減させることは可能です。このセクションでは、生物学的汚染の主なタイプについて概要を紹介します。

細菌 細菌は、いたるところに存在する大型の単細胞微生物群です。通常、直径が数 μm で、球状、棒状、らせん状など、さまざまな形状があります。細菌はその遍在性、大きさ、速い成長速度により、酵母やカビとともに、細胞培養でもっともよく発生する生物学的汚染物質の1つです。細菌による汚染は、感染から数日以内に培養物を目視で点検することで簡単に検出できます。感染した培養物は通常濁って見え、表面に薄い膜がある場合もあります。培地の pH の急激な低下も頻繁に発生します。細菌を低倍率の顕微鏡で観察すると、細菌が細胞間の小さな顆粒のように見えますが、高倍率の顕微鏡で観察すると、個々の細菌の形状を見分けることができます。以下の画像は、大腸菌で汚染された接着性 293 細胞株を示しています。

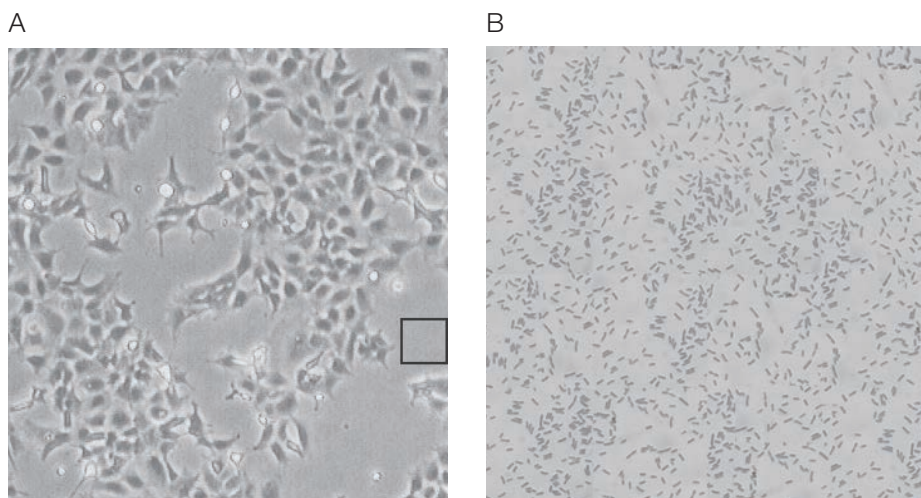


図 2.2：大腸菌で汚染された接着性 293 細胞の位相コントラスト画像。低倍率の顕微鏡下では、接着性細胞間のスペースにかすかに光る小さな顆粒が見られますが、個々の細菌を識別するのは困難です（パネル A）。黒い四角で囲んだ部分をさらに拡大すると、個々の大腸菌細胞（通常は桿状で、長さ約 $2 \mu\text{m}$ 、直径約 $0.5 \mu\text{m}$ ）を見分けることができます。パネル A にある黒い四角の各辺は $100 \mu\text{m}$ です。

生物学的汚染 (続き)

酵母 酵母は、菌界に属する単細胞性真核微生物です。その大きさは数 μm (通常) から 40 μm (まれ) の範囲に及びます。酵母によって汚染された培養物は、細菌の場合と同様に、特に汚染が進むと濁って見えます。酵母によって汚染された培養物の pH は、汚染が重度に進行するまではほとんど変化しませんが、汚染が進むと通常は上昇します。顕微鏡下では、個々の酵母が卵形または球形の粒子として観察され、さらに小さな粒子を出芽する場合があります。以下のシミュレーション画像は、播種後 24 時間の酵母が感染した接着性 293 細胞培養物を示しています。

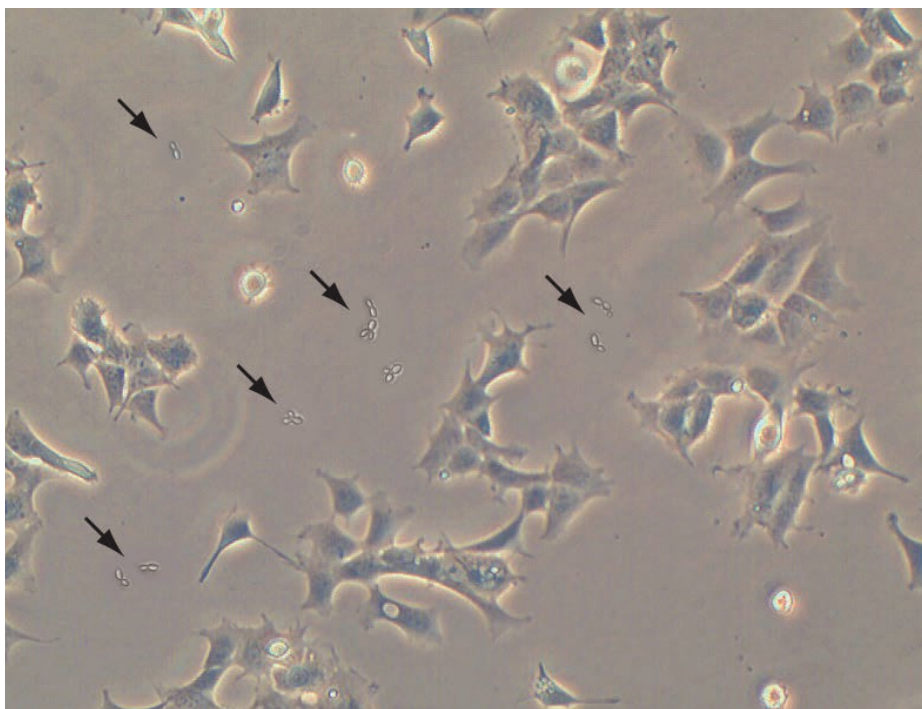


図 2.3 : 酵母で汚染された接着性培養物中における 293 細胞のシミュレーション位相コントラスト画像。汚染源である酵母細胞は卵形の粒子として観察され、自己複製する際に小さな粒子を出芽させています。

カビ カビは、菌界に属する真核微生物で、菌糸と呼ばれる多細胞性のフィラメントとして成長します。この多細胞性のフィラメントが連結したネットワークは、遺伝的に同一の核を含んでおり、コロニーまたは菌糸体と呼ばれています。培養物の pH は、酵母の場合と同様に、汚染の初期段階においては安定状態を保ちますが、感染がより重度に進行すると急激に上昇し、培養物が濁ってきます。菌糸体は、顕微鏡下では通常、薄く細いフィラメント状に見えますが、より密集した胞子の塊として観察されることもあります。カビの胞子は多くの種において、成育に適さない極めて厳しい環境でも休眠状態で生存し、成長に適した環境が訪れたときにのみ活性化されます。

ウイルス ウイルスは、宿主細胞の機構を乗っ取って複製を行う微細な感染性病原体です。サイズが極めて小さいため、ウイルスを培養物中で検出したり、細胞培養実験室で使用する試薬から除去したりすることは非常に困難です。ほとんどのウイルスは宿主に対して非常に高い特異性を持っているため、通常、宿主以外の種から調製した細胞培養物に悪影響を与えることはありません。しかし、ウイルスに感染した細胞培養物を使用すると、特に実験室でヒトまたは霊長類の細胞を培養している場合、実験室の担当者に重大な健康被害をもたらす可能性があります。細胞培養物がウイルスに感染しているかどうかは、電子顕微鏡、抗体パネルを用いた免疫染色、ELISA 分析、該当するウイルスプライマーを用いた PCR により検出できます。

マイコプラズマ マイコプラズマは、細胞壁を有さない単純な細菌で、自己複製できる最小の生物であると考えられています。サイズが極めて小さいため（通常 1 μm 未満）、超高密度に達して細胞培養物に悪影響を及ぼすようになるまでは、マイコプラズマを検出することは非常に困難です。多くの場合、そのような状態になるまでは、感染の兆候を目で見ることができません。成長速度の遅い一部のマイコプラズマは、細胞死を引き起こすことなく、細胞培養物中に存在し続けることがあります。培養物中にある宿主細胞の挙動と代謝を改変してしまう可能性があります。細胞増殖の速度低下、飽和密度の低下、浮遊培養物の凝集を伴う慢性的なマイコプラズマ感染が発現する場合があります。マイコプラズマ汚染を検出する唯一確実な方法は、蛍光染色（例：Hoechst 33258 染色）、ELISA、PCR、免疫染色、オートラジオグラフィ、微生物学的アッセイを用いて、培養物を定期的に検査することです。

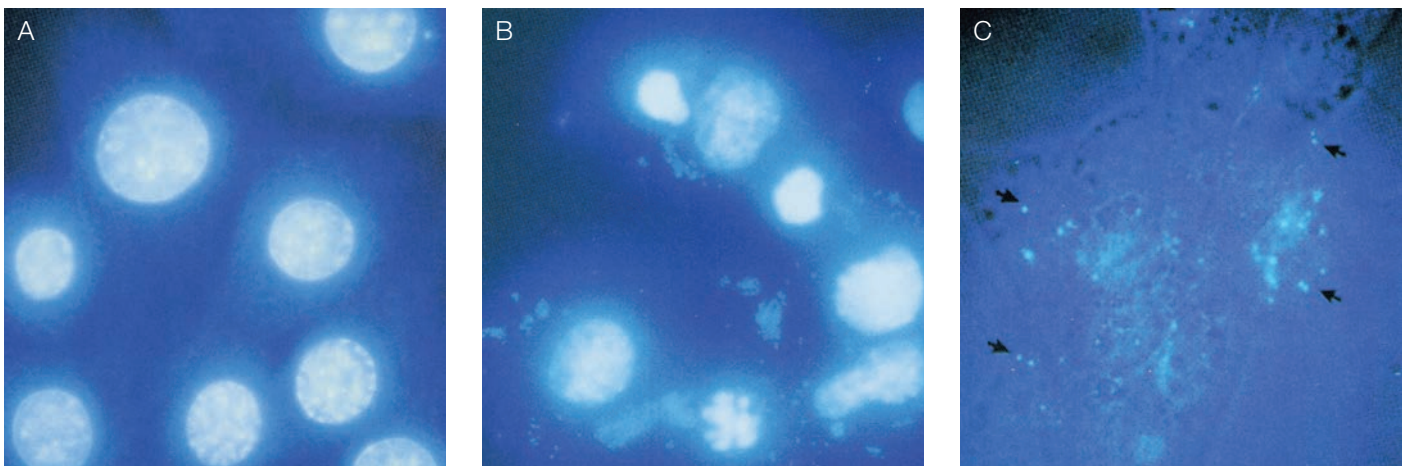


図 2.4：マイコプラズマを含まない培養細胞およびマイコプラズマに感染した細胞の顕微鏡像。本培養実験では、Invitrogen™ MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit を使用し、キット添付のプロトコルに従いました。(A) 固定細胞では、MycoFluor 試薬が細胞核に導入されます。細胞核は試薬によって強く染色されますが、蛍光性の核外物質が存在しないことから、培養物はマイコプラズマで汚染されていないことが示唆されます。(B) マイコプラズマに感染した固定細胞では、細胞核とマイコプラズマの両方が MycoFluor 試薬によって染色されます。しかし、細胞核における強い相対蛍光のために、細胞核またはその近くに存在するマイコプラズマが不明瞭になります。ただし、明るい細胞核から離れて存在するマイコプラズマは、容易に観察できます。(C) 生細胞では、MycoFluor 試薬が細胞核に導入されることはありません。しかし、細胞外に存在するマイコプラズマは容易に染色されます。キットに含まれるコントロールの発光スペクトルは、MycoFluor マイコプラズマ検出プロトコルに従って染色されたマイコプラズマの強度とほぼ一致する均一な強度を持つように設計されています。そのため、研究者は、染色されたマイコプラズマと他の形態のバックグラウンド発光（ウイルス、細菌、細胞の自家蛍光など）を区別することができます。これらの顕微鏡写真は、365 nm の励起、450 \pm 30 nm のバンドパスフィルターと組み合わせた 100/1.3 Plan Neofluar™ 対物レンズを使用して撮影しました。

生物学的汚染 (続き)

交差汚染 (クロスコンタミネーション)

多くの細胞株が HeLa 細胞株などの増殖の速い細胞株と広範囲にわたって交差汚染することは、微生物汚染ほど一般的ではありませんが、重大な結果を伴う問題として明確に認識されています。交差汚染を避けるためには、信頼できる細胞バンクから細胞株を入手し、細胞株の特性を定期的に検査し、無菌操作を徹底することが有用です。使用している細胞株に交差汚染があるかどうかは、DNA 指紋法、核型分析、アイソタイプ分析によって確認できます。

抗生物質の使用

細胞培養では、抗生物質を日常的に使用してはなりません。抗生物質を継続的に使用すると、抗生物質耐性株が発生しやすくなり、低レベルの汚染が持続することを許すことになるためです。そのような状況では、培地から抗生物質を除去した後に全面的な汚染へと発展する可能性があり、マイコプラズマ感染などの潜在的な汚染が認識されなくなるおそれがあります。また実験中に、一部の抗生物質が細胞と交差反応し、細胞内プロセスを妨害する可能性もあります。

抗生物質は、最後の手段として短期間に限り使用し、培養物からできるだけ早く除去してください。抗生物質を長期間にわたって使用する場合は、潜在的な感染の対照として、抗生物質を含まない培養物を並行して調製する必要があります。

3. 細胞培養の基礎

このセクションでは、細胞培養の基礎に関する情報を記載しています。実験に適した細胞株の選択、細胞培養の培地要件、接着培養と浮遊培養の比較、サーモフィッシャーサイエンティフィックから入手可能な不死化細胞株の形態について説明します。

以下に記載されている情報は、細胞培養の基礎の入門編であり、研究を行う際の出発点となることを目的としています。より詳細な情報については、発行されている文献や書籍、使用している製品に付属のマニュアルや製品情報シートを参照してください。

細胞株

適切な細胞株の選択 実験に適した細胞株を選択する際には、以下の基準を考慮してください：

- 種：通常、非ヒトおよび非霊長類の細胞株は、バイオセーフティーに関する制限が少なくなります。しかし、種特異的な培養物を使用するかどうかは、最終的には実験の内容によって決まります。
- 機能的特性：実験の目的は何ですか？たとえば、毒性試験には、肝臓や腎臓に由来する細胞株がより適している可能性があります。
- 有限寿命細胞株か不死化細胞株か：有限寿命細胞株を選択すると、正しい機能を発現させる選択肢が多くなる可能性があります。不死化細胞株を選択すると、たいいていの場合クローニングや維持が容易になります。
- 正常細胞か形質転換細胞か：形質導入された細胞株は通常、増殖速度が速く、コロニー形成率が高く、持続性があり、培地に必要な血清量が少なくて済みます。ただし、遺伝子形質導入によって表現型は恒久的に変化します。
- 増殖条件と特徴：増殖速度、飽和密度、クローニング効率、浮遊培養における増殖能に関して、どのような要件があるでしょうか。たとえば、組み換えタンパク質を高収率で発現させるには、増殖速度が速く、浮遊培養で増殖できる細胞株を選択することが推奨されます。
- その他の基準：有限寿命細胞株を使用している場合、十分なストックはありますか？細胞株は十分に特性化されていますか？それともお客さまご自身で検証が必要ですか？異常な細胞株を使用する場合は、対照として使用可能な正常細胞株を用意していますか？細胞株は安定していますか？安定していない場合、クローン化し、実験に十分な量の凍結ストックを調製することは容易ですか？

細胞株の入手 初代細胞からお客さまご自身で細胞培養物を確立するか、すでに確立された細胞培養物を営利団体または非営利団体の供給者（細胞バンク）から購入することができます。信頼できる供給者では、細胞株の完全性を確保し、培養物が汚染されていないことを確認するために厳格な試験が実施されているため、高品質な細胞株が得られます。他の研究室から培養物を借用することは、汚染のリスクが高くなるため、お勧めしません。いずれの供給者から入手した場合でも、新しい細胞株を使用する前には必ずマイコプラズマ汚染がないかすべての細胞株を試験してください。

当社は細胞培養実験用に、さまざまな初代培養細胞および確立した細胞株、試薬、培地、血清および成長因子を提供しています。付録には、サーモフィッシャーサイエンティフィックから入手可能な、汎用細胞株のリストが記載されています（ページ109参照）。

培養環境

細胞培養の主な利点の1つは、細胞が増殖する生理化学的環境（温度、pH、浸透圧、 O_2 および CO_2 の分圧）および生理学的環境（ホルモンおよび栄養素の濃度）を操作できることです。温度以外の培養環境は、増殖培地によって制御できます。培養の生理学的環境は生理化学的環境ほど明確には定義されていませんが、血清成分の把握、増殖に必要な成長因子の同定、培養中の細胞における微小環境の理解（細胞間相互作用、ガスの拡散、マトリックスとの相互作用）により、現在、特定の細胞株では無血清培地で培養できるようになりました。

接着培養と浮遊培養 培養中の細胞を増殖させる際には、2つの基本的なシステムがあります。人工基質上で行う単層培養（接着培養）と、培養培地中で行う浮遊培養（懸濁培養）です。造血細胞株およびその他いくつかの細胞株を除いて、脊椎動物に由来する細胞の大部分は接着依存性であり、細胞の接着および拡散を可能にするために特別に処理（組織培養処理）された適切な基質上で培養する必要があります。ただし、多くの細胞株は浮遊培養も可能です。同様に、市販の昆虫細胞株のほとんどは、単層培養でも浮遊培養でもよく増殖します。懸濁液で培養した細胞は、組織培養処理していない培養フラスコで維持できます。ただし、表面積あたりの細胞容量が増加すると（通常 $0.2\sim 0.5\text{ mL/cm}^2$ ）、適切なガス交換が妨げられるため、培地の攪拌が必要になります。このような攪拌を行う際は、通常、マグネチックスターラーまたは回転スピナーフラスコを使用します。

多くの場合、培養方法や培地の選択は、その細胞を用いて行われる一連の実験によって決定されます。細胞培養で望ましい結果が得られるように、標準的な組織培養処理および未処理の培養プラスチックに加えて、他の表面修飾技術が使用されます。たとえば、低接着表面処理を使用した場合は、接着依存性細胞が培養容器の表面に接着するのを直接防ぐことができるため、細胞スフェロイドの均一な浮遊培養を生成する上で、未処理よりも効果的です。このようなシステムとスピナーフラスコを組み合わせることで、スフェロイドを大量生産できる可能性があります。

接着培養	浮遊培養
初代培養を含むほとんどの細胞型に対応	浮遊培養に適応した細胞および他のいくつかの非接着性細胞株（造血細胞など）に対応
定期的な継代が必要だが、倒立顕微鏡下で簡単に目視検査が可能	継代は簡単だが、増殖パターンを追跡するには、細胞数と生存率を毎日測定することが必要。培養物を希釈して増殖を刺激することが可能
細胞は酵素的（例：Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme、トリプシン）または機械的に解離	酵素的／機械的な解離は不要
増殖は表面積によって制限されるため、発現タンパク質の収量が制限される可能性あり	増殖は培地中の細胞密度によって制限されるため、スケールアップが容易
表面処理した容器が必要	表面処理していない培養容器で維持できるが、十分なガス交換のために攪拌（振ったりかき混ぜたりする操作）が必要
細胞学研究や、継続的な培養産物の回収、および多くの研究用途で利用	大量生産、バッチ回収、および多くの研究用途で利用

培地 培地は、細胞の成長に必要な栄養素、成長因子、ホルモンを供給し、培養物の pH および浸透圧を制御するため、培養環境の中でもっとも重要な要素です。

初期の細胞培養実験は、組織抽出物や体液から得られる自然の培地を利用して行われていましたが、標準化や培地の品質に対するニーズ、および需要の増加から、合成培地が開発されました。基本的な培地の分類には、基本培地、低血清培地、無血清培地の三種類があり、それぞれ添加する血清の必要量が異なります。

基本培地

基本培地には、アミノ酸、ビタミン、無機塩、炭素源（グルコースなど）が含まれており、ほとんどの細胞株がこの培地で良好に増殖します。ただし、この基本培地の組成には、血清をさらに添加する必要があります。

低血清培地

細胞培養実験において、血清の望ましくない効果を低減させるためには、低血清培地を使用することもできます。低血清培地は、基本培地に栄養素と動物由来の因子を添加したものです。これを使用することで、必要な血清量が低減されます。





無血清培地

無血清培地 (SFM) に適切な栄養分とホルモンを添加することで動物血清の使用に伴う問題を回避できます。チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) の遺伝子組み換えタンパク質産生細胞株、各種の融合細胞株、昆虫細胞株 Sf9 および Sf21 (*Spodoptera frugiperda*: ツマジロクサヨトウ) などの多くの初代培養物および細胞株、ならびにウイルス産生の宿主となる細胞株 (293、VERO、MDCK、MDBK など) に対して、無血清培地が使用されます。無血清培地を使用する大きな利点の 1 つは、成長因子の適切な組み合わせを選択することによって、特定の細胞型に選択的な培地を調製できることです。無血清培地の利点と欠点を以下の表に記載します。

利点	欠点
<ul style="list-style-type: none">成分情報の明確さ優れた一貫性容易な精製および下流プロセス生産性の向上	<ul style="list-style-type: none">細胞機能の正確な評価生理学的応答のより優れた制御細胞メディエーターのより優れた検出
	<ul style="list-style-type: none">細胞型特異的な培地成分の必要性純度の高い試薬の必要性増殖速度の低下

細胞培養培地のベストプラクティス

ここでは、最適なパフォーマンスを得るように細胞培養培地を維持するための簡単なヒントとコツをいくつか紹介します。

	細胞培養培地が冷蔵 (2~8°C) されている場合は、使用前に温めてください。
	細胞培養培地は暗所で保管してください。光に曝露すると、細胞増殖に必要な培地中の必須ビタミンが分解されます。
	細胞培養培地にFBSを補充した後は、性能を維持するために培地全体を冷蔵庫 (2~8°C) で保管してください。
	汚染の可能性とpH変動の影響を減らすために、2~4週間以内に添加済みの培地を使用してください。

当社は、細胞培養実験用の増殖因子、サプリメント、抗生物質、試薬だけでなく、従来の基礎培地、低血清培地、無血清培地を幅広く提供しています。付録には、サーモフィッシュャーサイエンティフィックから入手可能な、汎用細胞培養製品のリストが記載されています。詳細については、[thermofisher.com/mammaliancellculture](https://www.thermofisher.com/mammaliancellculture) を参照してください。また、[thermofisher.com/media](https://www.thermofisher.com/media) と [thermofisher.com/cultureagents](https://www.thermofisher.com/cultureagents) もご覧ください。

血清 血清は、基本培地で細胞を培養する際に、増殖・接着因子、ホルモン、脂質、ミネラルの供給源として必要不可欠です。また、血清は細胞膜の透過性を調節し、脂質、酵素、微量栄養素、微量元素を細胞へ運ぶ担体として機能します。利用可能な動物血清（ウマ、ウサギ、ヤギ、ブタなど）の中で、現在もっとも広く使用されているのはウシ胎児血清（FBS）です。FBSには、微量のガンマグロブリンが含まれています。また、仔ウシ血清や成体ウシ血清と比較して、より高レベルの成長因子、より少量の補体タンパク質が含まれています。そのため、FBSは細胞増殖の促進に理想的です。また、FBSを使用すると、培養物中で哺乳類細胞が結合したり溶解したりする可能性が減るため、他の動物血清よりもFBSの方が優れていることがわかります。しかし、培地で血清を使用することには、いくつかの欠点があります。高コストに加えて、標準化、特異性、変動性の問題、望ましくない影響（特定の細胞培養物の増殖や細胞機能に対する刺激や阻害など）があります。血清が信頼できる供給源から得られていない場合は、コンタミネーションによって細胞培養実験が失敗する可能性もあります。当社のGibco™製品（血清を含む）では、コンタミネーションの有無が確認されており、品質、安全性、一貫性、ならびに規制への準拠が確保されています。当社は、基礎研究から特殊アッセイまで、特定の細胞培養ニーズに合わせてさまざまな血清を提供しています。Gibco製品では、ウイルスリスクが少ない血清、エンドトキシンレベルが最小の血清、特殊な用途やアッセイに適した血清をご用意しています。詳細については、thermofisher.com/fbsをご覧ください。

細胞培養プラスチック

細胞培養プラスチック表面

細胞培養および細胞ベースのアッセイには、長年にわたり、さまざまな種類のプラスチックが使用されてきました。ポリエチレンテレフタレート（PET）、高密度／低密度ポリエチレン（PE）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリプロピレン（PP）などがありますが、今日の実験室でもっとも頻繁に使用されるプラスチックはポリスチレン（PS）です。PSは、低コストな上、化学的に不活性であるため、使い捨ての培養表面として最適な選択肢です。

またPSは、疎水性であるため、浮遊細胞培養に理想的です。ただし、造血細胞株およびその他いくつかの細胞株を除いて、脊椎動物に由来する細胞の大部分は接着依存性であり、細胞の接着を可能にするために特別に処理された表面（組織培養（TC）処理表面または細胞培養処理表面）で培養する必要があります。このTC処理のプロセスには、PS表面をプラズマガスに曝す処理が含まれます。プラズマガスは、ポリマー鎖を部分的に修飾・切断し、ヒドロキシル基やカルボキシル基などの酸素含有官能基を生成します。PS表面に結果として生じる負電荷によって、PS表面の親水性が増し、接着依存性細胞の接着が改善されます。

PS表面の特性は、表面をコーティングすることで、さらに最適化することができます。たとえば、ペプチド（ポリ-D-リジンまたはPDLなど）、タンパク質（コラーゲンなど）、多糖類を使用します。PDLは、化学的に合成されたポリカチオン性の細胞外マトリックス（ECM）であり、細胞膜とプラスチック表面の両方における負電荷を調整できます。これにより、TC処理プラスチックへの細胞接着が促進されます。

コラーゲンなどのECMタンパク質は、通常のTC処理表面での増殖が困難な特定の細胞において、接着と増殖のための枠組みとなります。I型コラーゲンは、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、肝細胞に適しています。IV型コラーゲンは、基底膜の主成分であり、細胞に対してより生理学的に適した状態を提供します。

細胞培養容器

ディッシュ：細胞培養ディッシュは、培養中の細胞の成長と増殖をサポートするために特別に設計された使い捨ての浅い容器です。シングルウェルまたはマルチウェルの形式で、さまざまなサイズのもので提供されています。通常は PS またはポリカーボネートでできているため、顕微鏡像にひずみが生じません。細胞培養ディッシュには多くの場合、培養細胞を外気から保護しながら、継続的にガス交換が可能なふたが付属しています。ディッシュを使用すると、フラスコと比較して、トランスフェクションした細胞集団から個々のコロニーを選択することが非常に容易になります。

フラスコ：細胞培養フラスコは、用途に応じて、未処理フラスコ、TC 処理フラスコ、他の材料で処理されたフラスコが利用可能です。ストレートネックまたはアングルネックにおけるフラスコのサイズは、12.5 cm² から 300 cm² までさまざまです。アングルネックでは、増殖面全体に簡単にアクセスできる、キャップが培地に触れない、フラスコから培地を注ぐ際の滴りが少ないなど、いくつかの利点があります。

ローラーボトル：ローラーボトルは、ワクチン、モノクローナル抗体、生物学的製剤の大量生産などの用途に開発されており、PS またはポリエチレンテレフタレートグリコール (PETG) でできています。ローラーボトルはフラスコと比べて増殖面が広いいため、細胞上で培地をゆっくりと着実に混合でき、培地と細胞の接触面を大きくすることができます。

プレート：細胞培養プレートは、4 ウェルから 384 ウェルまであり、一度に複数の培養物に使用できます。用途に応じて、未処理プレート、TC 処理プレート、他の材料で処理されたプレートが利用可能です。TC 処理プレートの場合、底部のみが処理されているため、側面は疎水性です。TC 処理プレートは、均一で互換性のある表面となるため、細胞の接着と増殖に適しています。

チャンバースライド：チャンバースライドは、接着細胞培養用に処理されたスライドに取り外し可能な培地チャンバーを取り付けたものです。これにより、単一の顕微鏡スライド上で、播種、インキュベーション、固定、染色が可能になります。一部のチャンバースライドには、PDL コーティング様の化学修飾表面処理をしたものもあります。

チューブ：細胞を培養、遠心分離、保管するためのチューブには、さまざまな種類があります。TC 処理チューブは培養に使用できます。コニカルチューブは、サンプルの保管から細胞解離までさまざまな用途に有用です。

詳細については、thermofisher.com/cellcultureplastics をご覧ください。

pH ほとんどの正常な哺乳動物細胞株は、pH 7.4 で良好に増殖し、異なる細胞株間でのばらつきはほとんどありません。ただし、一部の形質転換細胞株は、わずかに酸性の環境 (pH 7.0 ~ 7.4) でより良好に増殖し、一部の正常な線維芽細胞株は、わずかにアルカリ性の環境 (pH 7.4 ~ 7.7) を好むことが報告されています。Sf9 や Sf21 などの昆虫細胞株は、pH 6.2 でもっとも良好に増殖します。

CO₂ 増殖培地は、培養物の pH を制御し、培養中の細胞を pH の変化から保護します。一般に、この緩衝作用は、増殖培地に有機化合物 (HEPES など) または CO₂-HCO₃⁻ (重炭酸塩) ベースの緩衝剤が含まれていることで実現します。培地の pH は、溶解している CO₂ と HCO₃⁻ の微妙なバランスで保たれているため、大気中の CO₂ が変化すると培地の pH も変化する可能性があります。そのため、CO₂-HCO₃⁻ (重炭酸塩) ベースの緩衝剤で緩衝した培地を使用する際には、外因性 CO₂ を使用する必要があります。特に、細胞を開放型のディッシュを用いて培養する場合や、形質転換した細胞株を高濃度で培養する場合には必要です。ほとんどの研究者は通常、大気中 5 ~ 7% の CO₂ を使用していますが、ほとんどの細胞培養実験では、4 ~ 10% の CO₂ が一般的です。ただし、各培地には、適正な pH と浸透圧を達成するための推奨 CO₂ 分圧および重炭酸塩濃度が存在します。詳細については、培地製造メーカーの説明書を参照してください。

温度 細胞培養の最適温度は、細胞を分離した宿主の体温に大きく依存し、温度の解剖学的差異 (例:皮膚の温度は、骨格筋の温度よりも低い場合がある) にもある程度依存します。細胞培養では、過度の低温よりも、過度の高温の方が重大な問題です。そのため、インキュベーター内の温度は多くの場合、最適温度よりもわずかに低い温度に設定されています。

- ほとんどのヒトおよび哺乳動物の細胞株は、最適な生育条件である 36 ~ 37°C で維持します。
- 昆虫細胞は、最適な生育条件である 27°C で培養します。27°C よりも低い温度や 28 ~ 30°C の温度では、生育が遅くなります。30°C を超えると、昆虫細胞の生存率は低下し、その後温度を 27°C に戻しても、細胞は回復しません。
- 鳥類の細胞株には、最適な生育条件として 38.5°C が必要です。37°C でも細胞を維持できますが、生育が遅くなります。
- 冷血動物 (例:両生類や冷水魚) 由来の細胞株は、15 ~ 26°C の広い温度範囲に耐えられます。



細胞培養条件は、細胞型ごとに異なることに注意してください。特定の細胞型に必要な培養条件から逸脱すると、異常な表現型の発現から、細胞培養の完全な失敗まで、さまざまな結果を招く可能性があります。そのため、取り扱う細胞株に精通し、実験に使用する各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

細胞の形態

細胞培養実験の成功には、培養中の細胞の形態（形状と外観）を定期的にチェックすることが不可欠です。細胞の健康状態を確認することに加え、細胞を取り扱う際には毎回目視検査と顕微鏡検査を行うことで、汚染の兆候があるかどうかを検出でき、汚染が実験室内の他の培養物に広がる前に封じ込めることができます。

細胞劣化の兆候としては、核の周りの粒子形成、基質からの細胞の脱離、細胞質の空洞化などがあります。劣化は、培養物の汚染、細胞株の老化、培地中の毒性物質の存在などさまざまな理由によって引き起こされている可能性があります。また、単に培地の交換が必要であることを示している場合もあります。劣化が進み過ぎると、回復不能となります。

哺乳類細胞

哺乳類細胞における形態のバリエーション

培養中のほとんどの哺乳類細胞は、その形態に基づいて3つの基本的カテゴリーに分類されます。

- 線維芽（または線維芽様）細胞は、双極性または多極性であり、細長い形状を有しています。この細胞は基質に接着して増殖します。
- 上皮様細胞は、より規則的な多角形をしており、個別のパッチで基質に接着して増殖します。
- リンパ芽球様細胞は球形で、通常は表面に接着することなく浮遊状態で増殖します。

特定の細胞では、上記の基本的なカテゴリーに加え、宿主における特殊な役割に特有の形態的特徴を示します。

- 神経細胞は、さまざまな形状とサイズで存在しますが、大まかには形態に基づく2つの基本的カテゴリーに分類されます。シグナルを長距離に伝達するための長い軸索を有するI型と、軸索を有さないII型です。典型的なニューロンは、細胞を伸長させ細胞体から多くの枝を出します。これを樹状突起といいます。神経細胞は、樹状突起と軸索が同一の突起から出ている場合は、単極性または偽単極性となります。樹状突起と軸索が神経細胞体（細胞の中の核を有する部分）の反対側から出ている場合は双極性となります。2つ以上の樹状突起を有する場合は多極性となります。

293 細胞の形態

293 細胞株は、ヒト胎児由来腎臓から樹立された永久細胞株であり、せん断されたヒトアデノウイルス 5 型 DNA で形質転換されています。この細胞株に発現しているアデノウイルス遺伝子により、細胞は極めて高いレベルの組み換えタンパク質を生産できるようになります。当社では、無血清培地中の高密度浮遊培養に適応する細胞株を含む、293 細胞株のバリエーションをいくつか提供しています。詳細については、当社ウェブサイトの哺乳類細胞培養に関するページをご覧ください。

以下の位相コントラスト画像は、接着培養の 80% コンフルエント状態 (図 3.1) および浮遊培養 (図 3.2) における正常な 293 細胞の形態を示しています。接着性哺乳類細胞は、コンフルエントに達する前の対数増殖期に、継代する必要があることに注意してください (「継代の時期」(ページ 31) を参照)。

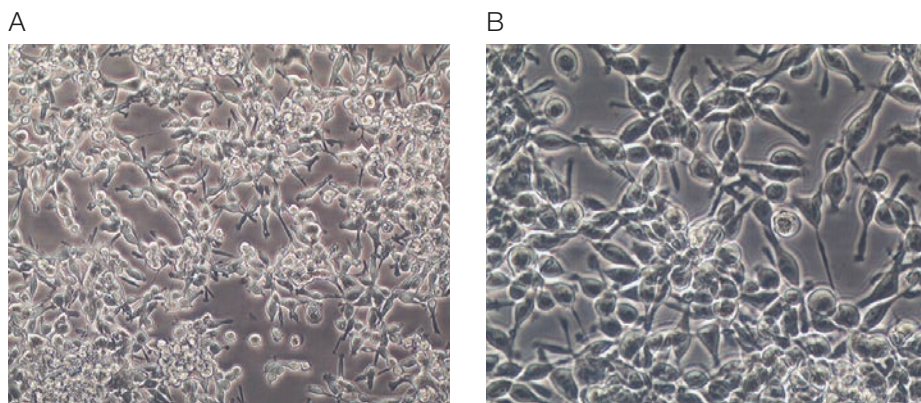


図 3.1: 接着培養における正常な 293 細胞の位相コントラスト画像。Gibco™ 293 SFM II 培地の播種密度が 5×10^4 生細胞/cm² となるように細胞を播種し、5% CO₂ の加湿空気を用いた 37°C のインキュベーターで単層として生育しました。これらの画像は、播種後 4 日目に、それぞれ (A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

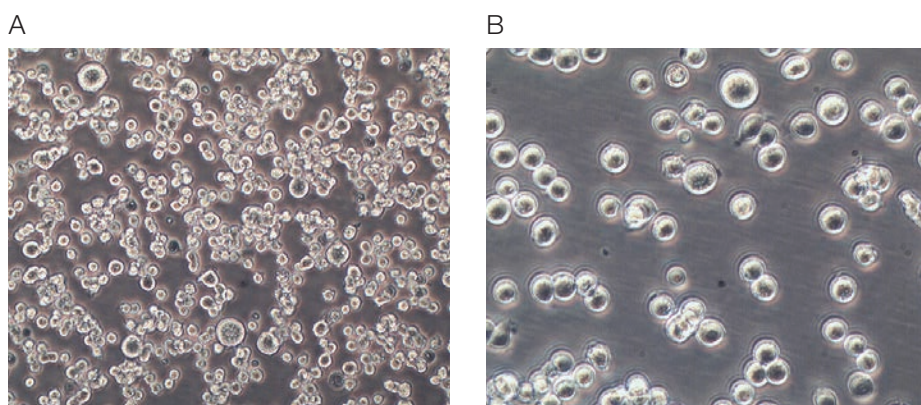


図 3.2: 浮遊培養における正常な 293F 細胞の位相コントラスト画像。Gibco 293 SFM II 培地の播種密度が 2×10^5 生細胞/mL となるように、振とうフラスコ内で培養を開始し、5% CO₂ の加湿空気を用いた 37°C のインキュベーターで生育しました。これらの画像は、播種後 4 日目に、細胞を 1:3 の希釈率で希釈し、(A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

Sf21 細胞の形態 Sf21 細胞 (IPLB-Sf21-AE) は、*Spodoptera frugiperda* (ツマジロクサヨトウ) から分離された卵巣細胞です。形状は球形で、大きさは均一ではなく、やや粒状の外観を呈しています。Sf21 細胞は、解凍してそのまま浮遊培養に使用できるため、細胞ストックの迅速な拡大、バキュロウイルスストックの培養、組み換えタンパク質の生産に適しています。Sf21 細胞は表面にしっかりと接着するため、形質転換またはプラークアッセイの用途に、単層として使用できます。

以下の画像は、浮遊培養 (図 3.3) および接着培養のコンフルエント状態 (図 3.4) における正常な Sf21 昆虫細胞の形態を示しています。昆虫細胞は、コンフルエントに達した時点で継代する必要があることに注意してください (「継代の時期」(ページ 31) を参照)。

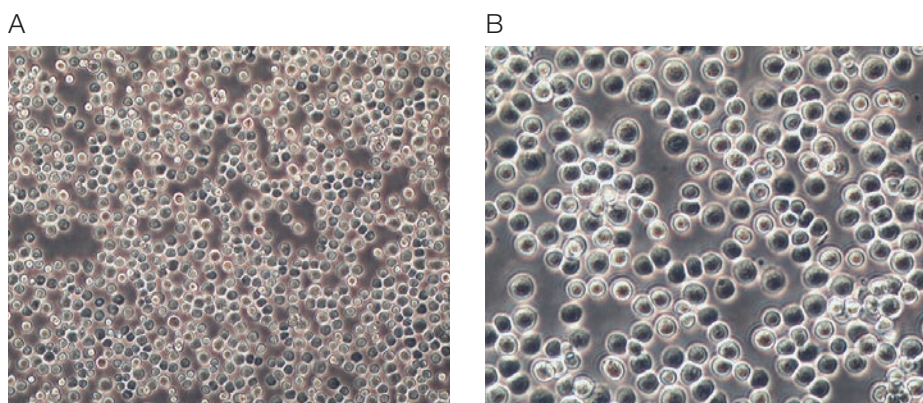


図 3.3 : 浮遊培養における正常な Sf21 昆虫細胞の位相コントラスト画像。Gibco™ Sf-900™ II SFM 培地の播種密度が 3×10^5 生細胞 / mL となるように、振とうフラスコ内で培養を開始し、28℃、非加湿の環境大気制御型インキュベーターで維持しました。これらの画像は、播種後 3 日目に、それぞれ (A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

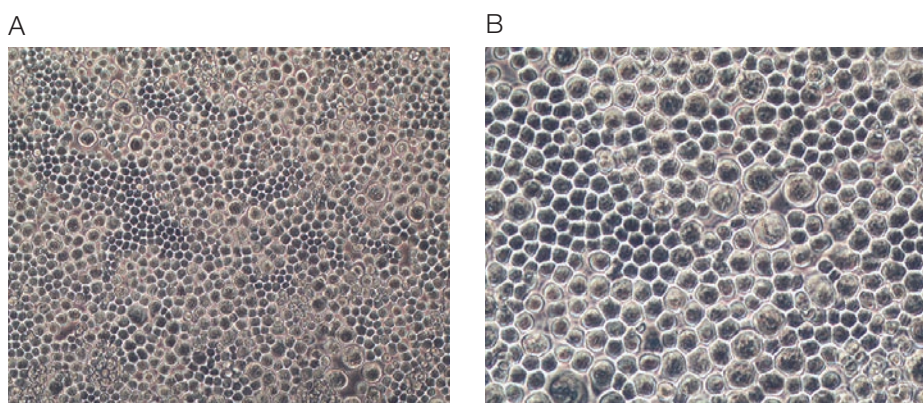


図 3.4 : Gibco 293 SFM II 培地中に接着性の単層として生育した Sf21 昆虫細胞の位相コントラスト画像。T-25 フラスコ内で播種密度が 5×10^4 生細胞 / cm^2 となるように細胞を播種し、28℃、非加湿の環境大気制御型インキュベーターで生育しました。これらの画像は、播種後 7 日目で培養物がコンフルエントに達したときに、それぞれ (A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

Sf9 細胞の形態

Sf9 昆虫細胞株は、親株である *Spodoptera frugiperda* 細胞株 IPLB-Sf21-AE に由来するクローン分離株です。バキュロウイルス発現システム (Gibco™ Bac-to-Bac™ 発現システムや Invitrogen™ Bac-N-Blue™ 発現システムなど) で、組み換えタンパク質の発現に使用する宿主に適しています。昆虫細胞は従来、T 型フラスコと血清添加基本培地を使用した静置培養系で培養されてきました。しかし、一般に昆虫細胞は接着依存性ではないため、浮遊培養でも容易に維持することができます。

以下の画像は、浮遊培養および接着培養における正常な Sf9 昆虫細胞の形態を示しています。Sf9 細胞は表面にしっかりと接着し、サイズが小さく均一であるため、単層およびプラークの形成に非常に適しています。

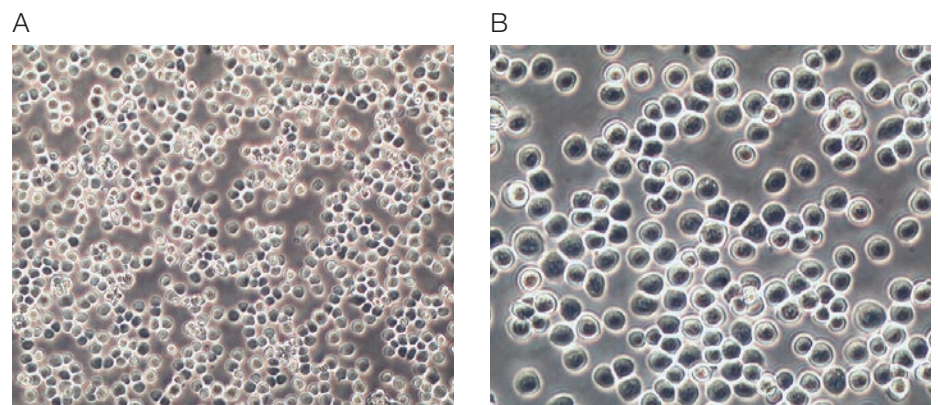


図 3.5: 浮遊培養における正常な Sf9 昆虫細胞の位相コントラスト画像。Sf-900 II SFM 培地の播種密度が 3×10^5 生細胞 / mL となるように、振とうフラスコ内で培養を開始し、28℃、非加湿の環境大気制御型インキュベーターで維持しました。これらの画像は、播種後 3 日目に、それぞれ (A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

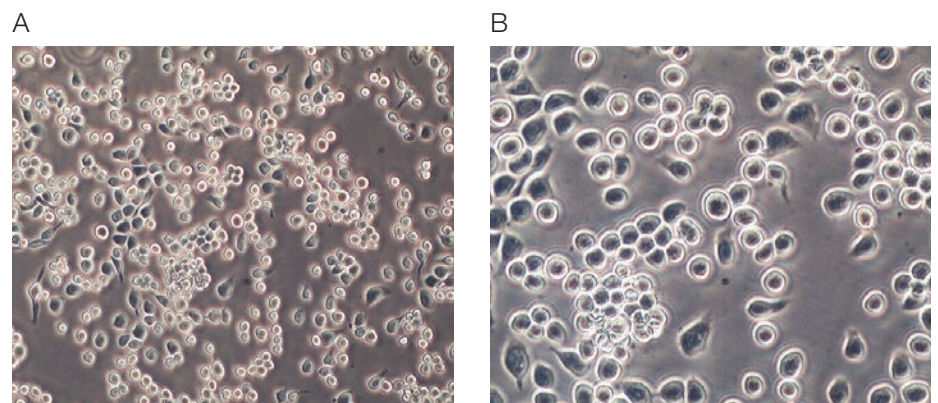


図 3.6: 接着培養における正常な Sf9 昆虫細胞の位相コントラスト画像。T フラスコ内で Sf-900 II SFM 培地の播種密度が 5×10^4 生細胞 / cm^2 となるように細胞を播種し、28℃、非加湿の環境大気制御型インキュベーターで維持しました。これらの画像は、播種後 3 日目に、それぞれ (A) 10 倍および (B) 20 倍の対物レンズを使用して撮影しました。

4. 細胞培養法



このセクションでは、培養中の細胞に対して日常的に行われる継代培養、凍結、融解に関するガイドラインと、一般的な手順について説明します。細胞培養条件は、細胞型ごとに異なることに注意してください。特定の細胞型に必要な培養条件から逸脱すると、異常な表現型の発現から、細胞培養の完全な失敗まで、さまざまな結果を招く可能性があります。そのため、取り扱う細胞株に精通し、実験に使用する各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

培養細胞を維持するためのガイドライン

継代培養とは？ 継代培養（植え継ぎとも呼ばれます）とは、培地を取り除き、細胞を前の培養物から新しい増殖培地に移すことであり、細胞株または細胞系をさらに増殖させる手順です。

培養中の細胞は、播種後の誘導期から対数増殖期に移行すると、指数関数的に増殖します。接着培養系の細胞が基質全体を覆い拡大する余地がなくなったとき、または浮遊培養系の細胞が培地の容量を超えてさらに増殖することができなくなったとき、細胞増殖は大幅に抑制されるか完全に停止します（図 4.1）。細胞が継続的に増殖できる最適な密度に保ち、さらなる増殖を促すには、培養系を分割し、新しい培地を供給する必要があります。

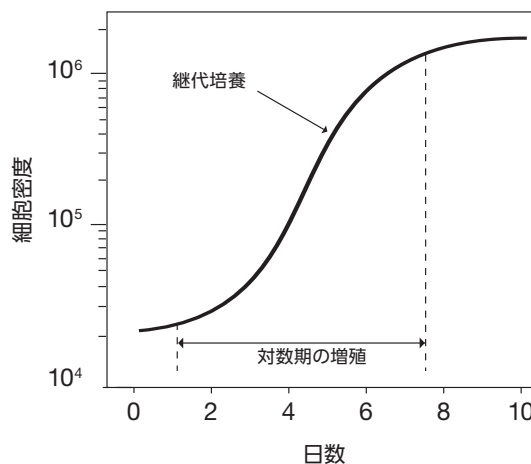


図 4.1：培養細胞に特徴的な増殖パターン。細胞密度と培養日数の片対数プロットです。培養中の細胞は、一般には標準的な増殖パターンに従って増殖します。播種後最初の増殖期間は誘導期と呼ばれ、細胞が培養環境に適応し、急速な増殖への準備を行う生育の遅い期間です。誘導期の後は対数増殖期が続きます。対数増殖期では、細胞が指数関数的に増殖し、増殖培地中の栄養素を消費します。増殖培地がすべて消費される（1種類または複数種類の栄養素が枯渇する）か、細胞が基質全体を覆うと、細胞は静止期（定常期）に入り、増殖が大幅に抑制されるか完全に停止します。

継代の時期 継代が必要かどうかの基準は、接着培養と浮遊培養で類似していますが、哺乳類細胞株と昆虫細胞株では若干の差があります。

細胞密度

- 哺乳類細胞：接着性培養物は、コンフルエントに達する前の対数増殖期に継代する必要があります。正常な細胞は、コンフルエントに達すると増殖を停止し（接触阻害）、再び播種しても回復するまで時間がかかります。形質転換した細胞は、コンフルエントに達した後も増殖を継続できますが、通常は約2回の倍化後に劣化します。同様に、浮遊培養細胞も、コンフルエントに達する前の対数増殖期に継代する必要があります。浮遊培養細胞は、コンフルエントに達すると凝集し、培養フラスコを回転させると培地が濁って見えます。
- 昆虫細胞：昆虫細胞は、コンフルエントに達する前の対数増殖期に継代する必要があります。しっかりと接着した昆虫細胞は、培養容器から容易に剥がすことができ、コンフルエントに達した状態で継代できますが、一方、コンフルエント状態を超える密度で継代を繰り返した昆虫細胞は、倍化時間の減少、生存率の低下、接着性の低下が見られます。その一方で、接着培養している昆虫細胞をコンフルエントに達する前に継代すると、単層から細胞を分離するのにより大きな機械的力が必要になります。コンフルエントに達する前に継代を繰り返すと、細胞は倍化時間の減少、生存率の低下が見られ、不健康であるとみなされます。

培地の枯渇

- 哺乳類細胞：増殖培地におけるpHの低下は、一般的には乳酸（細胞代謝の副産物）の蓄積を示唆しています。乳酸は細胞にとって有毒である可能性があります。そのため、pHの低下は細胞の生育にとって最適ではありません。pHの変化速度は、一般的に細胞密度によって異なります。細胞密度が高い培養物は、細胞密度が低い培養物よりも培地の枯渇が速くなります。細胞密度が増加し、pHの急速な低下（0.1～0.2を超えるpHの低下）が見られる場合は、細胞を継代する必要があります。
- 昆虫細胞：一般的に昆虫細胞は、哺乳類細胞に使用される増殖培地よりも酸性の強い増殖培地で培養されます。たとえば、Sf9細胞の培養に使用されるTNM-FHおよびグレース培地のpHは6.2です。昆虫細胞は哺乳類細胞とは異なり、細胞の増殖に伴いpHが徐々に上昇しますが、通常pH 6.4を超えることはありません。しかし、昆虫細胞の密度がより高くなると、哺乳類細胞と同様に、増殖培地のpHが低下し始めます。

培養細胞を維持するためのガイドライン (続き)

継代培養のスケジュール

厳密なスケジュールに従って細胞を継代することで、性質の再現性を確保し、細胞の健康状態を監視することができます。培養物の播種密度を、細胞型に適した増殖速度および収率が得られるまで、一定の値から変化させてください。確立されている増殖パターンからの逸脱は、一般的には、培養物が正常ではない(劣化や汚染など)、または培養系の成分が正しく機能していない(温度が最適ではない、培地が古過ぎるなど)ということを示唆しています。詳細な細胞培養記録を作成し、補給および継代のスケジュール、使用した培地の種類、解離法、継代比率、形態観察結果、播種濃度、収率、抗生物質の使用の有無を記録することを強く推奨します。

実験およびその他の特別な操作(培地の種類の変更など)を行う際は、継代のスケジュールに従うことが推奨されます。決まっている継代のスケジュールに実験スケジュールが合っていない場合は、細胞が誘導期にある間や、コンフルエントに達して増殖が停止しているときは、細胞を継代しないようにしてください。

一般的な細胞株に推奨される培地

多くの不死化哺乳類細胞株は、血清を添加した MEM などの比較的単純な培地上で維持できます。MEM で培養した細胞は、DMEM または Gibco™ Medium 199 でも容易に培養できる可能性があります。しかし、特別な機能が発現されている場合には、より複雑な培地が必要になる可能性があります。特定の細胞に対して適切な培地を選択するための情報については、通常、文献を参照することができます。細胞の供給者や細胞バンクから情報を入手できる場合もあります。

ご使用の細胞型に関する適切な培地情報が入手できない場合は、増殖培地と血清を経験に基づいて選択するか、数種類の異なる培地を試験して、最適な結果の得られる培地を選択してください。最初に選択する培地としては、一般的に接着細胞には MEM、浮遊細胞には RPMI 1640 が推奨されます。以下にリストした条件は、新しい哺乳類細胞培養をセットアップする際のガイドラインとして使用できます。

一般的に昆虫細胞は、哺乳類細胞に使用される増殖培地よりも酸性の強い増殖培地(TNM-FH やグレース培地など)で培養されます。

哺乳類細胞培養

細胞株	細胞型	種	組織	培地*
293	線維芽	ヒト	胎児由来腎臓	MEM、10% FBS
3T6	線維芽	マウス	胎児	DMEM、10% FBS
A549	上皮	ヒト	肺がん腫	F-12K、10% FBS
A9	線維芽	マウス	結合組織	DMEM、10% FBS
AtT-20	上皮	マウス	下垂体腫瘍	F-10、15% ウマ血清、2.5% FBS
BALB/3T3	線維芽	マウス	胎児	DMEM、10% FBS
BHK-21	線維芽	ハムスター	腎臓	GMEM、10% FBS、または MEM、10% FBS、NEAA
BHL-100	上皮	ヒト	乳房	McCoy's 5A、10% FBS
BT	線維芽	ウシ	鼻中介細胞	MEM、10% FBS、NEAA
Caco-2	上皮	ヒト	結腸腺がん	MEM、20% FBS、NEAA
Chang	上皮	ヒト	肝臓	BME、10% 仔ウシ血清
CHO-K1	上皮	ハムスター	卵巣	F-12、10% FBS
Clone 9	上皮	ラット	肝臓	F-12K、10% FBS
Clone M-3	上皮	マウス	黒色腫	F-10、15% ウマ血清、2.5% FBS
COS-1、COS-3、COS-7	線維芽	サル	腎臓	DMEM、10% FBS
CRFK	上皮	ネコ	腎臓	MEM、10% FBS、NEAA
CV-1	線維芽	サル	腎臓	MEM、10% FBS
D-17	上皮	イヌ	骨肉腫	MEM、10% FBS、NEAA
Daudi	リンパ芽球	ヒト	リンパ腫患者の血液	RPMI 1640、10% FBS
GH1、GH3	上皮	ラット	下垂体腫瘍	F-10、15% ウマ血清、2.5% FBS
H9	リンパ芽球	ヒト	T細胞リンパ腫	RPMI 1640、20% FBS
HaK	上皮	ハムスター	腎臓	BME、10% 仔ウシ血清
HCT-15	上皮	ヒト	結腸直腸腺がん	RPMI 1640、10% FBS
HeLa	上皮	ヒト	子宮頸がん	MEM、10% FBS、NEAA (懸濁、S-MEM)
HEp-2	上皮	ヒト	喉頭がん	MEM、10% FBS
HL-60	リンパ芽球	ヒト	前骨髄球性白血病	RPMI 1640、20% FBS
HT-1080	上皮	ヒト	線維肉腫	MEM、10% HI FBS、NEAA
HT-29	上皮	ヒト	結腸腺がん	McCoy's 5A、10% FBS
HUVEC	内皮	ヒト	臍帯	F-12K、10% FBS、100 µg/mL ヘパリン
I-10	上皮	マウス	精巣腫瘍	F-10、15% ウマ血清、2.5% FBS
IM-9	リンパ芽球	ヒト	骨髄腫患者の骨髄	RPMI 1640、10% FBS
JEG-2	上皮	ヒト	絨毛がん	MEM、10% FBS
Jensen	線維芽	ラット	肉腫	McCoy's 5A、5% FBS
Jurkat	リンパ芽球	ヒト	リンパ腫	RPMI 1640、10% FBS
K-562	リンパ芽球	ヒト	骨髄性白血病	RPMI 1640、10% FBS
KB	上皮	ヒト	口腔がん	MEM、10% FBS、NEAA
KG-1	骨髄芽球	ヒト	赤白血病患者の骨髄	IMDM、20% FBS
L2	上皮	ラット	肺	F-12K、10% FBS
LLC-WRC 256	上皮	ラット	がん腫	Medium 199、5% ウマ血清
McCoy	線維芽	マウス	不明	MEM、10% FBS
MCF7	上皮	ヒト	乳腺がん	MEM、10% FBS、NEAA、10 µg/mL インスリン
WI-38	上皮	ヒト	胎児肺	BME、10% FBS
WISH	上皮	ヒト	羊膜	BME、10% FBS
XC	上皮	ラット	肉腫	MEM、10% FBS、NEAA
Y-1	上皮	マウス	副腎腫瘍	F-10、15% ウマ血清、2.5% FBS

昆虫細胞培養

Sf9、Sf21	ツマジロクサヨトウ (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	蛹の卵巣	TNM-FH、10% FBS、または Gibco Sf-900 II SFM (無血清)、または Sf-900 III SFM (無血清)
High Five (BTI-TN-5B1-4)	キャバツシャフトリムシ (<i>Trichoplusia ni</i>)	卵巣	TNM-FH、10% FBS、または Express Five SFM (無血清)
Schneider 2 (S2)、D.Mel-2	ショウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>)	胎児	シュナイダーショウジョウバエ培地、10% 熱非動化 FBS

* BME: Basal Medium Eagle (イーグル基礎培地)、DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (ダルベッコ改変イーグル培地)、FBS: Fetal Bovine Serum (ウシ胎児血清)、GMEM: Glasgow Minimum Essential Medium (グラスゴー最小必須培地)、IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (イスコフ改変ダルベッコ培地)、MEM: Minimum Essential Medium (最小必須培地)、NEAA: Non-Essential Amino Acids Solution (非必須アミノ酸溶液)、TNM-FH: Trichoplusia ni Medium-Formulation Hink (サプリメントを添加したグレース昆虫培地)。

培養細胞を維持するためのガイドライン (続き)

接着細胞を継代する最初のステップは、酵素的または機械的な手段によって培養容器の表面から細胞を剥離することです。以下の表に、さまざまな細胞解離手順を示します。

手順	解離剤	用途
振り落とし	培養容器の穏やかな振とう、または激しいピペッティング	緩く接着した細胞、有糸分裂細胞
スクレーピング	セルスクレーパー	プロテアーゼに敏感な細胞株（一部の細胞が損傷する可能性がある）
酵素的解離	トリプシン	強く接着した細胞
	トリプシンおよびコラゲナーゼ	高密度培養、複数の層を形成している培養（特に線維芽細胞）
	ディスパーゼ	コンフルエントの状態では上皮細胞を剥離（細胞を解離することなく、培養ディッシュの表面からシート状態のまま剥離）
	TrypLE 解離酵素	強く接着した細胞、トリプシンの代用、動物由来成分を含まない試薬が必要な場合

TrypLE 解離酵素

Gibco™ TrypLE™ Express および TrypLE™ Select Enzyme は、微生物により産生された細胞解離酵素で、トリプシンと同様の動態と切断特異性を備えています。TrypLE 酵素は、解離手順においてプロトコルを変更することなく、トリプシンの直接代替として使用できますが、最良の結果を得るためには、解離のインキュベーション時間をまず最適化することをお勧めします。TrypLE 酵素は組み換え真菌トリプシン様プロテアーゼであるため、動物由来成分を含まない試薬が必要な用途に最適です。以下の表では、TrypLE Express および TrypLE Select Enzyme とトリプシンを比較しています。詳細については、thermofisher.com/tryple をご覧ください。

TrypLE Express および TrypLE Select Enzyme	トリプシン
動物由来およびヒト由来の成分がまったく含まれていない	ブタ由来またはウシ由来
室温で安定	室温で不安定
血清によって阻害されない	血清によって阻害される
トリプシン不活性化剤が不要	トリプシン不活性化剤が必要

接着細胞の継代

以下のプロトコルは、培養中の接着性哺乳類細胞を継代するための一般的な手順です。昆虫細胞を継代する手順は、いくつかの重要なステップにおいて、哺乳類細胞の手順とは異なることに注意してください。詳細については、「接着性昆虫細胞の継代に関する注意事項」(次ページ)を参照してください。

細胞株を継代するには、実験に使用している各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。特定の細胞型に必要な培養条件から逸脱すると、異常な表現型の発現から、細胞培養の完全な失敗まで、さまざまな結果を招く可能性があります。

必要な物品

- 接着細胞を含む培養容器
- 組織培養処理したフラスコ、プレート、またはディッシュ
- あらかじめ 37°C に温めておいた完全増殖培地
- 使い捨ての滅菌済み 15 mL チューブ
- 5% CO₂ の加湿空気を用いた 37°C のインキュベーター
- カルシウム、マグネシウム、フェノールレッドを含まない、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) などの平衡塩溶液
- フェノールレッドを含まない、トリプシンまたは TrypLE Express Enzyme などの解離試薬
- 生細胞数および総細胞数を測定するための試薬および機器 (Countess II 自動セルカウンターなど)

接着細胞の継代プロトコル

細胞と接触するすべての溶液と機器は無菌である必要があります。常に適切な滅菌操作を実施し、層流フード内で作業してください。

1. 使用済みの細胞培養培地を培養容器から取り出して廃棄します。
2. カルシウムおよびマグネシウムを含まない平衡塩溶液 (培養表面積 10 cm² あたり約 2 mL) を用いて細胞を洗浄します。細胞層を乱さないように、接着した細胞層とは反対側の容器側面に洗浄液を静かに加え、容器を前後に数回揺り動かします。

注: この洗浄ステップにより、解離試薬の作用を阻害する微量の血清、カルシウム、マグネシウムが除去されます。

3. 洗浄溶液を培養容器から取り除いて廃棄します。
4. トリプシンまたは TrypLE 酵素などのあらかじめ温めておいた解離試薬をフラスコの側面に加えます。細胞層を覆うのに十分な量の試薬を使用してください (10 cm² あたり約 0.5 mL)。容器をゆっくりと揺り動かして、試薬が細胞層を完全に覆うようにします。

接着細胞の継代 (続き)

5. 培養容器を室温で約 2 分間インキュベーションします。実際のインキュベーション時間は、使用する細胞株によって異なることに注意してください。
6. 細胞の剥離状態を顕微鏡で観察します。細胞の剥離が 90% 未満の場合は、インキュベーション時間を数分間延長し、30 秒ごとに剥離状態を確認してください。容器を軽くたたいて細胞の剥離を促進することもできます。
7. 細胞の 90% 以上が剥離したら、できるだけ短い時間で容器を傾けて細胞を排出します。あらかじめ温めておいた完全増殖培地を 2 倍量 (解離試薬に使用した量の 2 倍) 加えます。細胞層表面上で数回ピペティングすることにより、培地を分散させます。
8. 細胞を 15 mL のコニカルチューブに移し、 $200 \times g$ で 5 ~ 10 分間遠心分離します。遠心分離の速度と時間は、細胞型によって異なることに注意してください。
9. あらかじめ温めておいた最少量の完全増殖培地に細胞ペレットを再懸濁させ、カウント用にサンプルを採取します。
10. 血球計算盤、セルカウンター、トリパンブルー色素排除法、または Countess II 自動セルカウンターを使用して、細胞の総数と生存率を測定します。必要に応じて、細胞に増殖培地を添加して希望する細胞密度に調整し、細胞を再計測してください。
11. 細胞懸濁液をその細胞株に推奨される播種密度に希釈し、適切な量をピペットで新しい細胞培養容器に移し、細胞をインキュベーターに戻します。

注：培養フラスコを使用している場合、培養フラスコをインキュベーターに入れる前には、ガス透過性キャップの付いた通気フラスコでない限り、適切にガス交換ができるようにキャップを緩めてください。

接着性昆虫細胞の継代に関する注意事項

昆虫細胞を継代する際の一般的な手順は哺乳類細胞と同じですが、それぞれの培養システムにおいて重要な要件がいくつか異なります。最良の結果を得るためには、実験に使用している各製品に付属の説明書に必ず従ってください。

- 昆虫細胞は対数増殖期に継代してください。ただし、昆虫細胞が強く接着している場合は、コンフルエント時、または昆虫細胞がフラスコの底から離れ始めた少し後に継代を行うことができます。こうすることで、細胞を簡単に剥離できます。
- 密度が 20% コンフルエント未満の場合は、増殖が阻害されます。対数増殖期の培養物から採取した細胞が、もっとも健康な細胞です。
- 昆虫細胞培養に CO₂ 交換は推奨されません。
- 昆虫細胞は、非加湿環境下、27℃で維持してください。細胞は、引き出しの中に入れるか、遮光されている場合は実験台の上に置いて、室温で維持できます。ただし、27℃で管理された環境が推奨されます。
- 昆虫細胞の増殖用に特別に調製された培地を使用してください。
- 昆虫細胞は、無血清条件下で基質に非常に強く接着するため、剥離するには追加の作業が必要になります。細胞を剥離するには、フラスコを手首のスナップを使ってすばやく 1 回振る必要がある場合があります。汚染を避けるため、この手順の前には必ずキャップをしっかりと締めてください。

注：フラスコを激しく振ることはお勧めしません。細胞が損傷する可能性があります。

浮遊細胞の継代

以下のプロトコルは、浮遊培養の哺乳類細胞を継代するための一般的な手順です。昆虫細胞を継代する手順は、いくつかの重要なステップにおいて、哺乳類細胞の手順とは異なることに注意してください。詳細については、「浮遊性昆虫細胞の継代に関する注意事項」(ページ 41) を参照してください。

細胞株を継代するには、実験に使用している各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。特定の細胞型に必要な培養条件から逸脱すると、異常な表現型の発現から、細胞培養の完全な失敗まで、さまざまな結果を招く可能性があります。

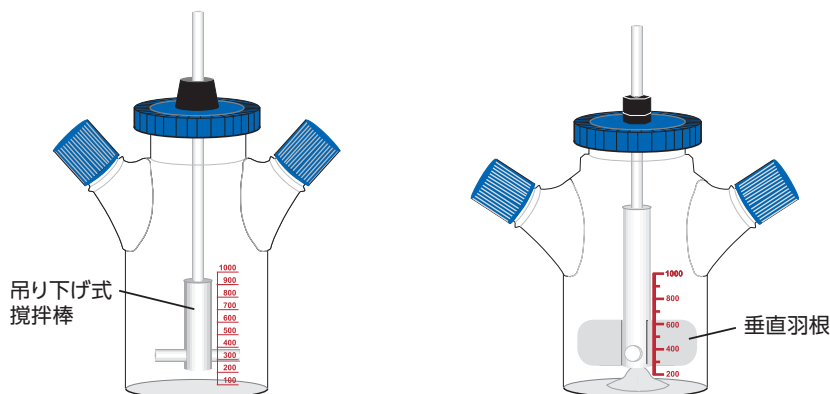
浮遊培養物の継代

浮遊細胞の継代は、接着細胞の継代よりもやや簡単です。浮遊培養では細胞がすでに増殖培地に懸濁しているため、細胞を酵素処理して培養容器の表面から剥離する必要はありません。そのため、工程全体がより迅速で、細胞の損傷がより少なくなります。浮遊培養では、増殖培地の交換を行いません。その代わりに、細胞がコンフルエントに達するまで2～3日ごとに補給を行うことで細胞を維持します。このとき、培養フラスコ内の細胞を直接希釈して増殖を継続させるか、培養フラスコから細胞の一部を取り除き、残りの細胞をその細胞株に適切な播種密度まで希釈します。通常、継代後の誘導期は、接着培養で観察される誘導期よりも短くなります。

浮遊培養容器

浮遊培養物は、組織培養処理していない滅菌培養フラスコ中で維持できます。しかし、浮遊細胞培養用に特別に設計されたスピナーフラスコ(スターラーボトル)を使用すれば、ガス交換効率が向上し、より大容量の細胞を培養できます。浮遊培養物の攪拌には、ラックで回転するローラーボトルも使用できます。

スピナーフラスコには、吊り下げ攪拌棒アセンブリまたは垂直攪拌羽根が備わっており、これによって培地が攪拌されます。垂直攪拌羽根の方が通気に優れています。適切な通気を行うためには、スピナーフラスコ中の総培地容量が、スピナーフラスコに表示されている容量の半分を超えてはなりません(たとえば、500 mLのスピナーフラスコには、250 mLを超える培地を入れてはいけません)。



必要な物品

- 浮遊細胞を含む培養容器
- バッフルの付いていない振とうフラスコ、またはスピナーボトル（前ページの「浮遊培養容器」を参照）
- あらかじめ 37°C に温めておいた完全増殖培地
- 5% CO₂ の加湿空気を用いた 37°C のインキュベーター
- マグネチックスターラー（スピナーフラスコを使用する場合）、ローラーラック（ローラーボトルを使用する場合）、または振とう培養器（従来型の培養フラスコまたはペトリ皿を使用する場合）
- 生細胞数および総細胞数を測定するための試薬および機器（Countess II 自動セルカウンターなど）

浮遊細胞の継代プロトコル

細胞と接触するすべての溶液と機器は無菌である必要があります。常に適切な滅菌操作を実施し、層流フード内で作業してください。細胞は、コンフルエントに達する前の対数増殖期に継代する必要があります。浮遊培養細胞は、コンフルエントに達すると凝集し、培養フラスコを振り混ぜると培地が濁って見えます。継代前の推奨される最大細胞密度は、細胞株によって異なります。詳細については、細胞に特有の製品添付文書またはマニュアルを参照してください。

振とうフラスコ内で生育した細胞

以下のプロトコルは、振とうインキュベーターで振とうフラスコを使用し、浮遊培養の哺乳類細胞を継代するための一般的な手順です。詳細なプロトコルについては、必ず細胞に特有の製品添付文書を参照してください。

注：振とうフラスコにバッフル（攪拌を促進するように設計されたフラスコ底面の突起）がないことを確認してください。バッフルがあると、振とうのリズムが乱されます。

1. 細胞が継代に適した状態（コンフルエントに達する前の対数増殖期）になったら、フラスコを振とうインキュベーターから取り出し、少量のサンプルを滅菌済ピペットを用いて採取します。サンプルの採取前に細胞が沈降してしまった場合は、細胞が培地中に均一に分散するように、フラスコを揺り動かしてください。
2. 採取したサンプルから、Countess II 自動セルカウンターまたは血球計算盤、セルカウンター、トリパンプルー色素排除法を使用して、細胞の総数と生存率を測定します。
3. 培養物を推奨される播種密度に希釈するのに必要な、培地の添加容量を計算します。
4. あらかじめ温めておいた適切な容量の増殖培地を、培養フラスコに無菌的に添加します。必要であれば、培養物を複数のフラスコに分割することもできます。

浮遊細胞の継代 (続き)

- 適切なガス交換ができるように、培養フラスコのキャップを1回転分緩めて（または、ガス透過性キャップを使用して）、振とうインキュベーターに戻します。振とう速度は、細胞株によって異なります。

注：振とう培養物中における細胞片および代謝老廃副産物の蓄積を最小限に抑えるため、3週間ごとに（または必要に応じて）、細胞懸濁液を100 × gで5～10分間緩やかに遠心分離し、細胞ペレットを新しい増殖培地に再懸濁してください。

スピナーフラスコ内で生育した細胞

以下のプロトコルは、スピナーフラスコを使用し、浮遊培養の哺乳類細胞を継代するための一般的な手順です。詳細なプロトコルについては、必ず細胞に特有の製品添付文書を参照してください。

細胞は物理的なせん断により損傷しやすいことに注意してください。攪拌羽根装置がスムーズに回転し、培養容器の側面や底面に接触しないことを確認してください。培養物に対して十分な通気を確保するためには、パドルの上部が培地よりもわずかに上にあることが必要です。スピナー装置を調節して、パドルが培養容器の側面および底面に触れないようにしてください。以下の表に、それぞれのサイズのスピナーフラスコに必要な培地の最小容量を示します。

スピナーフラスコのサイズ	培地の最少量
100 mL	30 mL
250 mL	80 mL
500 mL	200 mL

500 mL より大きなスピナーフラスコで、スピナーを用いて培養を行うことはお勧めしません。すでに確立されている小さなスピナーからスケールアップすることをお勧めします。

- 細胞が継代に適した状態（コンフルエントに達する前の対数増殖期）になったら、フラスコを振とうインキュベーターから取り出し、少量のサンプルを滅菌済ピペットを用いて採取します。サンプルの採取前に細胞が沈降してしまった場合は、細胞が培地中に均一に分散するように、フラスコを揺り動かしてください。
- 採取したサンプルから、Countess II 自動セルカウンターまたは血球計算盤、セルカウンター、トリパンブルー色素排除法を使用して、細胞の総数と生存率を測定します。
- 培養物を推奨される播種密度に希釈するのに必要な、培地の添加容量を計算します。

4. あらかじめ温めておいた適切な容量の増殖培地を、培養フラスコに無菌的に添加します。必要であれば、培養物を複数のフラスコに分割することもできます。
5. 適切なガス交換ができるように、スピナーフラスコのサイドアームキャップを1回転緩めて、振とうインキュベーターに戻します。スピナーの速度は、細胞株および攪拌羽根のタイプによって異なります。細胞がせん断応力によって損傷しないように、スピナー速度が推奨値内にあることを確認してください。

注：スピナー培養物中における細胞片および代謝老廃副産物の蓄積を最小限に抑えるため、3週間ごとに（または必要に応じて）、細胞懸濁液を100×gで5～10分間緩やかに遠心分離し、細胞ペレットを新しい増殖培地に再懸濁してください。

浮遊性昆虫細胞の継代に関する注意事項

昆虫細胞を継代する際の一般的な手順は、哺乳類細胞と同じですが、それぞれの培養システムにおいて重要な要件がいくつか異なります。最良の結果を得るためには、実験に使用している昆虫細胞株に付属の説明書に必ず従ってください。

- 浮遊培養では、培地を交換する必要はありません。通常の継代では、細胞懸濁液を取り除き、培養物を適切な密度に希釈するのに十分な量の培地を添加する必要があります（細胞ごとに製品添付文書を参照）。新しい培地を添加することで、細胞に必要な栄養素を十分に補充できます。
- 昆虫細胞培養にCO₂交換は推奨されません。
- 昆虫細胞は、非加湿環境下、27°Cで維持してください。細胞は、実験台の上に置か引出しの中に入れて、室温で維持できます。ただし、27°Cで管理された環境が推奨されます。
- 昆虫細胞の増殖用に特別に調製された培地を使用してください。
- せん断を減少させるために、界面活性剤を使用してください。スピナー昆虫細胞培養には、0.1% Gibco™ Pluronic™ F-68 Non-ionic Surfactant が推奨されます。この界面活性剤を使用することで、攪拌羽根による細胞膜のせん断が低減されます。

注：Sf-900 II SFM および Express Five SFM には、すでに界面活性剤が含まれています。

- 一部の昆虫細胞株には、浮遊培養への適応化が必要な場合があります。詳細については、細胞ごとに製品添付文書またはマニュアルを参照してください。

細胞の凍結

凍結保存 不死化細胞株は遺伝的浮動を起こしやすく、有限寿命細胞株は老化する運命にあります。すべての細胞培養には微生物汚染のリスクがあり、最高レベルの研究所でさえ、装置が故障する可能性があります。樹立された細胞株は貴重な資源であり、その置き換えには費用と時間がかかるため、それらを凍結して長期保存することが非常に重要です。

継代培養から少量の余剰な細胞が入手可能になったら、すぐにこの細胞をシードストックとして凍結して保管し、一般的な実験室では使用できないようにしてください。ワーキングストックは、凍結シードストックから調製および補充できます。凍結保存したワーキングストックは、シードストックが枯渇した場合に、最初の凍結から世代数が増えるのを最小限に抑えた新しいシードストックを調製するためのソースとして機能します。

培養細胞を凍結保存する場合は、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの凍結保護剤の存在下で、完全培地で液体窒素中に保存することが推奨されます。凍結保護剤を使用することで、培地の凝固点を下げ、冷却速度を遅くすることができます。また、細胞に損傷を与えて細胞死を引き起こす可能性がある、氷晶形成のリスクを大幅に低減できます。

注：DMSO は、有機分子が組織に侵入するのを促進することが知られています。DMSO を含む試薬は、このような材料がもたらす危険性に対応した装置および手順を用いて取り扱ってください。地域の規制に従って試薬を廃棄してください。

凍結保存のガイドライン 細胞株を将来的に使用するために凍結保存するには、以下のガイドラインに従う必要があります。最良の結果を得るためには、他の細胞培養手順と同様に、細胞株に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

- 培養細胞は、高濃度で、できる限り少ない継代数で凍結してください。凍結する前に、細胞の生存率が 90% 以上であることを確認してください。最適な凍結条件は、使用する細胞株によって異なることに注意してください。
- プログラムフリーザーまたは凍結処理容器 (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ 凍結保存容器など) を使用して、1 分あたり約 1°C 温度を下げて細胞をゆっくりと凍結させてください。
- 推奨された凍結用培地を必ず使用してください。凍結用培地には、DMSO またはグリセロールなどの凍結保護剤が含まれている必要があります (「継代培養とは?」(ページ 30) を参照)。
- 凍結細胞は -70°C 未満で保存してください。-50°C を超えると劣化し始めます。
- 凍結細胞の保存には、滅菌済みクライオバイアルを必ず使用してください。凍結細胞を含むクライオバイアルは、液体窒素に浸した状態か、液体窒素上の気相で保存できます (次ページの安全上の注意を参照)。
- 個人用防護具を常に着用してください。
- 細胞と接触するすべての溶液と機器は無菌である必要があります。常に適切な滅菌操作を実施し、層流フード内で作業してください。



安全上の注意

バイオハザード物質は、液体窒素上の気相で保存する必要があります。密封したクライオバイアルを気相で保存することで、破裂のリスクがなくなります。液相に保存する場合は、ガラス製とプラスチック製両方のクライオバイアルに破裂のリスクがあることに注意し、常にフェイスシールドまたはゴーグルを着用してください。

凍結培地

細胞の凍結保存には、推奨された凍結用培地を必ず使用してください。凍結用培地には、DMSO またはグリセロールなどの凍結保護剤が含まれている必要があります。Gibco™ Recovery™ Cell Culture Freezing Medium や Gibco™ Synth-a-Freeze™ Cryopreservation Medium など、特別に調製された完全凍結保存培地を使用することもできます。

Recovery Cell Culture Freezing Medium は、哺乳類細胞培養ですぐに使用できる完全凍結保存培地です。ウシ胎児血清とウシ血清が最適な比率で含まれており、解凍後の細胞生存率および細胞回復を改善することができます。

Synth-a-Freeze Cryopreservation Medium は、10% DMSO を含む、タンパク質を含まない、既知組成の滅菌済み凍結保存培地であり、メラニン細胞を除く、多くの幹細胞および初代細胞の凍結保存に適しています。

詳細については、thermofisher.com/freezingmedia をご覧ください。

必要な物品

- 対数増殖期の培養細胞を含む培養容器
- 完全増殖培地
- DMSO などの凍結保護剤（細胞培養用にとっておいたボトルを使用。層流フード内でのみ開封）または Synth-a-Freeze Cryopreservation Medium や Recovery Cell Culture Freezing Medium などの凍結培地
- 使い捨ての滅菌済み 15 mL または 50 mL コニカルチューブ
- 生細胞数および総細胞数を測定するための試薬および機器（Countess II 自動セルカウンターなど）
- 滅菌済み凍結保存バイアル（クライオバイアル）
- プログラムフリーザーまたはインプロパノールチャンバー
- 液体窒素保存容器

接着細胞の凍結には、上記に加えて、以下のものが必要です：

- カルシウム、マグネシウム、フェノールレッドを含まない、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）などの平衡塩溶液
- フェノールレッドを含まない、トリプシンまたは TrypLE Express Enzyme などの解離試薬

細胞の凍結（続き）

培養細胞の凍結保存プロトコル

以下のプロトコルは、培養細胞を凍結保存するための一般的な手順です。詳細なプロトコルについては、必ず細胞に特有の製品添付文書を参照してください。

1. 凍結培地を調製し、使用するまで 2 ~ 8℃ で保存します。最適な凍結培地は、細胞株によって異なることに注意してください。
2. 接着細胞の場合は、継代培養中に使用した手順に従って、組織培養容器から細胞を静かに剥離します。その細胞型に必要な完全培地で、細胞を再懸濁します。
3. 血球計算盤、セルカウンター、トリパンプルー色素排除法、または Countess II 自動セルカウンターを使用して、細胞の総数と生存率を測定します。望ましい生細胞密度に応じて、凍結用培地の必要容量を計算します。
4. 細胞懸濁液を 100 ~ 200 × g で 5 ~ 10 分間遠心分離します。細胞ペレットを乱さないようにして、上清を無菌的にデカントします。

注：遠心分離の速度および時間は、細胞型によって異なります。

5. 特定の細胞型に対して推奨される生細胞密度で、細胞ペレットを低温の凍結用培地に再懸濁させます。
6. 細胞懸濁液のアリコートを凍結保存バイアルに分注します。分注の際には、細胞の穏やかな混合を繰り返し、均一な細胞懸濁液状態を維持してください。
7. プログラムフリーザー内で細胞を凍結し、温度を 1 分あたり約 1℃ 下げます。もしくは、細胞を含むクライオバイアルをイソプロパノールチャンバーに入れ、-80℃ で一晩保存します。
8. 凍結細胞を液体窒素に移し、液体窒素上の気相で保存します。

凍結細胞の融解

融解のガイドライン

融解操作は凍結細胞にとって負荷となります。そのため、融解操作後の高い細胞生存率を確保するためには、適切な技術を使用し、迅速に作業することが必要です。最良の結果を得るためには、他の細胞培養手順と同様に、細胞および他の試薬に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

- 凍結細胞を 37°C のウォーターバスで迅速に（1 分未満で）融解してください。
- 融解した細胞は、あらかじめ温めておいた増殖培地を用いてゆっくりと希釈してください。
- 細胞の回復を最適化するために、融解した細胞を高濃度で播種してください。
- 常に適切な無菌操作を実施し、層流フード内で作業してください。
- フェイスマスクやゴーグルなどの個人用防護具を必ず着用してください。液相で保存したクライオバイアルは、融解時に破裂する危険があります。
- 一部の凍結用培地には DMSO が含まれています。DMSO は、有機分子が組織に侵入するのを促進することが知られています。DMSO を含む試薬は、このような材料がもたらす危険性に対応した装置および手順を用いて取り扱ってください。

必要な物品

- 凍結細胞を含むクライオバイアル
- あらかじめ 37°C に温めておいた完全増殖培地
- 使い捨ての滅菌済み遠心分離チューブ
- 37°C のウォーターバス
- 70% エタノール
- 組織培養処理したフラスコ、プレート、またはディッシュ

凍結細胞の融解 (続き)

凍結細胞の融解 以下のプロトコルは、凍結保存された細胞を融解するための一般的な手順です。詳細なプロトコルについては、必ず細胞ごとに添付されている添付文書を参照してください。

1. 凍結細胞が入ったクライオバイアルを液体窒素容器から取り出し、直ちに 37°C のウォーターバスに移します。
2. 細胞をすみやかに (1 分以内で) 融解します。バイアル中に氷が少し残るくらいまで、37°C のウォーターバス内でバイアルをゆっくりと回してください。
3. バイアルを層流フードに移します。開封する前に、バイアルの外側を 70% エタノールで拭いてください。
4. 使用している細胞株に適した完全増殖培地を、任意の量をあらかじめ温めて入れておいた遠心分離チューブに、融解した細胞を滴下します。
5. 細胞懸濁液を 200 × g で 5 ~ 10 分間遠心分離します。遠心分離の実際の速度および時間は、細胞型によって異なります。
6. 遠心分離後、上清が透明で、ペレット全体を目視できることを確認します。細胞ペレットを乱さないようにして、上清を無菌的にデカントします。
7. 細胞を完全増殖培地で静かに再懸濁させ、推奨される培養環境で適切な培養容器に移します。

注：適切なフラスコサイズは、クライオバイアル中で凍結した細胞の数によって異なります。培養環境は、細胞および培地の種類によって異なります。

5. トランスフェクションの基礎

この章では、さまざまなトランスフェクション技術に関する一般的な情報や、細胞株や実験のニーズに適したトランスフェクション法の選択など、トランスフェクションの概要を説明します。DNA および RNA による細胞のトランスフェクションのガイドライン、トランスフェクション実験を成功させるための考慮事項、実験ワークフローは、「トランスフェクション法」の章 (ページ 79) に記載されています。

詳細については、thermofisher.com/transfectionbasics をご覧ください。

トランスフェクション入門

トランスフェクションとは?

広義でトランスフェクションとは、ウイルス感染以外の方法で、核酸 (DNA または RNA) を人工的に細胞に導入するプロセスです。さまざまな化学的手法、生物学的手法、物理的手法を用いて外部から核酸を導入すると、細胞の特性を変化させることができるため、細胞における遺伝子機能とタンパク質発現を調べることができます。

トランスフェクションにおいて、導入した核酸は細胞内で一時的にしか存在できない場合もあれば (限られた期間でのみ発現し、複製は行われません)、安定した状態となり宿主のゲノムに組み込まれる場合もあります (宿主のゲノムが複製されるときに、導入した核酸も複製されます)。(「トランスフェクションの種類」(ページ 49) を参照)。

用語

各遺伝子導入システムに使用される用語は、この分野における技術の進歩とともに変化しており、さまざまな手法および細胞型を識別するために細分化され続けています。

トランスフェクション

トランスフェクションは、核酸を真核細胞 (より具体的には動物細胞) に導入することを一般的には指します。従来、トランスフェクションという用語は、原核生物に感染したウイルスまたはバクテリオファージからウイルス核酸を取り込むことで、感染して成熟ウイルス粒子が産生されることを意味しました。しかし現在では、人工的に外部から核酸を細胞に導入することを意味するようになりました。

形質転換

形質転換という用語は、非ウイルス DNA を細菌、非動物真核細胞、植物細胞に導入することを示すためによく使用されます。ただし、形質転換という用語は、動物細胞の表現型に恒久的な変化をもたらす特定のイベントまたは一連のイベントも指しており、遺伝子的に不安定で、がん化しやすいことを示唆しています。この意味での形質転換は、形質転換ウイルスによる感染や遺伝子導入によって起こる可能性があります。自然発生、または電離放射線や化学変異原などの外部のストレス要因によっても起こる可能性があります。そのため、この用語は、動物細胞に外来遺伝子を導入することを示す際には使用しないでください。

形質導入

形質導入という用語は、ウイルスを介した DNA 転移を指します。一方で、トランスフェクションという用語は、真核ウイルスまたはバクテリオファージから単離したウイルス核酸を用いて、細胞を特異的に感染させることも指します。

用途 トランスフェクションにおける 2 つの主な目的は、組み換えタンパク質を産生することと、トランスフェクションされた細胞内での遺伝子発現を特異的に促進または阻害することです。そのため、トランスフェクションは、遺伝子または遺伝子産物の機能と制御に関する研究、遺伝子組み換え生物の作製、遺伝子治療の分野において強力な分析ツールとなります。

遺伝子発現

プラスミドベクターまたは mRNA を用いて、培養細胞(または動物モデル) で目的のタンパク質を発現させる際には、トランスフェクションがもっとも一般的に実施されます。真核細胞でタンパク質を発現させると、その機能が必要とされる適切な折りたたみと翻訳後修飾を受けた組み換えタンパク質が産生されます。容易に検出可能なマーカーとその他の修飾を含むタンパク質をさらに細胞に導入すると、プロモーターおよびエンハンサーの配列、またはタンパク質間相互作用を調べることができます。

また、トランスフェクションは、トランスフェクション法に応じて、さまざまな形態のバイオプロダクションに用いることができます。たとえば、リプログラミング転写因子を導入すると、人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製できます。一方で、安定トランスフェクションを行うと、さまざまな治療用分子のバイオプロダクションに利用できる細胞が得られます。

遺伝子阻害

RNA 干渉 (RNAi) によって特定のタンパク質の発現を阻害する際にも、トランスフェクションがよく用いられています。哺乳類細胞では、microRNA (miRNA: 二重鎖 RNA (dsRNA) 前駆体由来) の形態で内因的に発現したノンコーディング RNA を介して RNAi が生じます。この前駆体はプロセシングされて成熟 miRNA となり、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の一部となります。RISC は、相補的な標的 mRNA の翻訳を阻害するように作用します。

ベクターベースのシステムでは、miRNA 前駆体または低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) 前駆体が発現されます。これらの前駆体は細胞内機構によってプロセシングされ、それぞれ miRNA と shRNA を生じ、遺伝子発現を阻害するように作用します。このシステムを使用することで、組み換えコンストラクトの安定トランスフェクションが可能となり、前駆体分子を誘導発現することができます。

化学的に合成した低分子干渉 RNA (siRNA) を RISC に組み込み、相補的な mRNA を標的として分解することで、遺伝子サイレンシングを誘導することもできます。siRNA を修飾することで、オフターゲット効果を防止できるだけでなく、dsRNA の活性鎖を RISC に確実に組み込むこともできます。

トランスフェクションの種類

核酸を細胞に導入するには、数多くの生物学的手法、化学的手法、物理的手法があります。こうした手法のすべてを、あらゆるタイプの細胞や実験に適用できるわけではありません。トランスフェクション効率、細胞毒性、正常な生理機能への影響、遺伝子発現レベルに応じて、幅広いバリエーションが存在します。しかし、すべてのトランスフェクション法は、大きく2つのタイプに分類できます。導入した核酸が限られた期間しか細胞内に存在できないかどうか（一過性トランスフェクション）、長期間にわたり細胞内に存在し続け、トランスフェクションした細胞の子孫に引き継がれるかどうか（安定トランスフェクション）に基づきます。

一過性トランスフェクション

一過性トランスフェクションでは、導入した核酸は限られた期間しか細胞内に存在できず、ゲノムに組み込まれることはありません。そのため、一時的にトランスフェクションされた遺伝形質は、細胞分裂によって世代から世代へと受け継がれることはなく、環境因子によって失われるか、細胞分裂を通して次第に薄まっていく可能性があります。しかし、トランスフェクションされた遺伝形質のコピー数が高い場合は、遺伝形質が細胞内に存在する期間において、タンパク質が高レベルで発現します。

一時的に発現される導入遺伝子は、使用するコンストラクトに応じて、一般的に1～7日間にわたり検出されます。しかし、一時的にトランスフェクションされた細胞は、通常トランスフェクション後24～96時間で回収されます。遺伝子産物を解析するには、酵素活性アッセイやイムノアッセイに使用するRNAやタンパク質を単離することが必要になる場合があります。最適なインターバル期間は、細胞型、研究目標、導入された遺伝子に特有の発現特性、ならびにレポーターが安定な状態に到達するまでの期間によって異なります。しかし、大部分の外来DNAは、数日以内にヌクレアーゼによって分解されるか、細胞分裂によって希釈され、1週間後には検出されなくなります。

一過性トランスフェクションは、スーパーコイルプラスミドDNAを用いる場合にもっとも効率的です。理由としては、より効率的に細胞に取り込まれることが考えられます。siRNA、miRNA、mRNAに加え、タンパク質も一過性トランスフェクションに用いることができます。しかし、プラスミドDNAと同様に、こうした高分子は高品質、つまり比較的純度が高いことが求められます（「トランスフェクション効率に影響を与える要因」（ページ79）を参照）。トランスフェクションされたDNAは核に移行して転写されるのに対し、トランスフェクションされたRNAはサイトゾルに残り、そこでトランスフェクション後数分間以内に発現するか（mRNA）、mRNAに結合して標的遺伝子（siRNAおよびmiRNA）の発現を抑制します（「RNAトランスフェクションのガイドライン」（ページ101）を参照）。

トランスフェクションの種類 (続き)

安定トランスフェクション 安定トランスフェクションにおいて、外来 DNA は細胞内ゲノムに組み込まれるか、エピソームプラスミドとして維持されます。安定トランスフェクションは、一過性トランスフェクションとは異なり、トランスフェクションされた細胞とその子孫に、外来 DNA を長期間にわたり維持することができます。そのため、導入した遺伝子を複数世代にわたって持続的に発現させることができます。このことは、組み換えタンパク質の生産や、外来 DNA 発現の下流または長期的影響の解析に有用となる可能性があります。しかし、細胞のゲノムに組み込まれる外来 DNA は、通常は 1 コピーか数コピーです。そのため、遺伝子の発現レベルは、一過性トランスフェクションで導入された遺伝子の発現レベルよりも低い傾向があります。

ゲノムに外来 DNA が安定的に組み込まれることは比較的まれであるため、良好な安定トランスフェクションを実現するためには、効果的な DNA 導入と、その DNA を取り込んだ細胞を選択する方法が必要となります。トランスフェクションされた DNA が安定的に発現されている細胞を選択するためのもっとも信頼できる方法の 1 つは、トランスフェクションに用いられる DNA コンストラクトに選択マーカースを含ませて、短い回復期間後に細胞に適切な選択圧をかけることです（「安定的なトランスフェクタントの選択」（ページ 94）を参照）。

よく使用される選択マーカースは、さまざまな選択薬剤への耐性を与える遺伝子、あるいはトランスフェクションされる細胞株で欠損している必須遺伝子を補う遺伝子です。選択培地で培養すると、トランスフェクションされていない細胞、または一過性にトランスフェクションされた細胞は最終的に死滅し、抗生物質耐性遺伝子を十分なレベルで発現している細胞、または必須遺伝子の欠損を補うことができる細胞は生存します。

特定のケースでは、トランスフェクションされた細胞における表現型または形態の変化を、スクリーニング可能な形質として用いることもできます。たとえば、ウシパピローマウイルスに由来するベクターでトランスフェクションされたマウス Cl127 細胞は、形態変化を生じます (Sarver et al.1981)。

直鎖状 DNA では、スーパーコイル DNA に比べて細胞への DNA 取り込み量が少ないですが、宿主ゲノムへの DNA 組み込みが最適となります（「トランスフェクション効率に影響を与える要因」（ページ 79）を参照）。一般に、安定トランスフェクションは DNA ベクターに限定されますが、選択可能な DNA ベクターから作製した低分子ヘアピン型転写物として siRNA および miRNA を導入すると、安定的に細胞に導入することができます（「ベクター媒介 RNAi」（ページ 99）を参照）。ただし、RNA 分子自体を安定トランスフェクションに使用することはできません。

トランスフェクション法の選択

一過性トランスフェクションと安定発現トランスフェクションのどちらを必要とするかは、実施する実験の期間と最終目標によって決まります。一過性トランスフェクションされた細胞は、通常はトランスフェクション後 24 ~ 96 時間で回収されます。多くの場合、遺伝子の短期発現または遺伝子産物の影響に関する研究、RNA 干渉 (RNAi)、組み換えタンパク質の迅速な生産などの用途に用いられます。mRNA を用いた一過性トランスフェクションでは、より迅速に結果が得られます。mRNA が核への移行や転写プロセスなしに、サイトゾルで発現されるためです。一部のシステムでは、トランスフェクションされた mRNA をトランスフェクション後、数分以内に発現させることが可能です。

これに対して、安定発現トランスフェクションは、長期の遺伝子発現が必要な場合や、トランスフェクションされた細胞を多くの実験で必要とする場合に有用です。染色体に DNA ベクターが組み込まれることはまれであるため、選択的スクリーニングとクローン単離を必要とする安定発現トランスフェクションは、より多くの労力を要するプロセスです。そのため、通常は、大規模なタンパク質生産、長期的な薬理学的研究、遺伝子治療、長期的な遺伝子調節機構に関する研究などの用途に用いられます。

哺乳類細胞の一過性トランスフェクションは、トランスフェクション試薬の発明以来、翻訳後修飾 (細菌で組み換えタンパク質を発現させる場合には行われません) が施される組み換えタンパク質の生産に用いられてきました。しかし、ミリグラムからグラム単位の組み換えタンパク質の発現は、主に安定発現株を用いて行われました。最近では、浮遊培養に適応させた HEK293 細胞および CHO 細胞に対して大量に一過性トランスフェクションを行うことで、面倒な安定細胞株を作成することなく、大量の組み換えタンパク質を取得することができます。一過性トランスフェクションにより高い収量で組み換えタンパク質を取得でき、トランスフェクション後 3 日から 7 日で 1 リットルあたりミリグラム量の組み換えタンパク質を生産できます。

Gibco™ Expi293™ Expression System および Gibco™ ExpiCHO™ Expression System は、哺乳類細胞を用いて迅速で高収量のタンパク質生産を実現することを目指した一過性発現技術において、大きなブレイクスルーとなる発現システムです。この発現システムは、キットの細胞、培地や導入試薬は最適化されており、Gibco™ 高密度細胞、Gibco™ 発現培地、カチオン性脂質ベースの Gibco™ トランスフェクション試薬、最適化したトランスフェクションエンハンサーで構成されています。Expi293 Expression System では最大 1 g/L、ExpiCHO Expression System では最大 3 g/L の発現レベルが実現します。詳細については、thermofisher.com/exp293 または thermofisher.com/expicho をご覧ください。

トランスフェクションの種類 (続き)

安定した高発現細胞は、臨床用の生物学的製剤の製造によく使用されています。きわめて大きな規模においても、バッチ間の一貫性と低コストを実現できるためです。しかし、多くの創薬用途では、一過性トランスフェクション法を用いてタンパク質コンストラクトを迅速にスクリーニングすることが推奨されます。一過性トランスフェクション法では、1週間未満でさまざまな候補分子を同時に評価できます。多くの場合、一過性トランスフェクションは、より多くのリソースを消費する安定細胞株の開発（完了までに3カ月を超えることがある）と並行して実施されます。

一過性トランスフェクション	安定トランスフェクション
トランスフェクションされた DNA はゲノムに組み込まれず、核内に留まります。	トランスフェクションされた DNA はゲノムに組み込まれます。
トランスフェクションされた遺伝形質は次世代に受け継がれません。遺伝子変異は恒久的ではありません。	トランスフェクションされた遺伝形質は世代から世代へと安定して受け継がれます。遺伝子変異は恒久的です。
選択的スクリーニングは必要ありません。	安定的なトランスフェクタントを単離するための選択的スクリーニングが必要です。
DNA ベクターと RNA の両方を使用できます。	DNA ベクターのみを使用できます。RNA 自体を細胞に安定的に導入することはできません。
トランスフェクションされた遺伝形質のコピー数が多いと、タンパク質の発現レベルが高くなります。	安定して組み込んだ DNA のコピー数が1つである、または少ないと、タンパク質の発現レベルが低くなります。
通常、細胞はトランスフェクションから 24 ~ 96 時間以内に回収されます。	安定してトランスフェクションされたコロニーを単離するには、2~3週間の選択的スクリーニングが必要です。
一般的に、誘導性プロモーターを有するベクターを用いる研究には適していません。	誘導性プロモーターを有するベクターを用いる研究に適しています。

細胞膜は、タンパク質が埋め込まれたリン脂質二重層で構成されており、正味の負電荷を帯びています。そのため、細胞膜は、DNA や RNA のリン酸骨格のような負に荷電している大きな分子を通過させないためのバリアとして機能します。細胞膜を核酸が通過できるように、多くの技術が開発されてきました。核酸を化学物質とキャリア分子でコーティングして中和する方法から、DNA を細胞に直接導入するために細胞膜に一時的な細孔を作る物理的な方法まで、それぞれ異なるアプローチが用いられています。

現在利用可能なトランスフェクション技術は、大きく3つのグループに分けることができます：1) 化学的方法：キャリア分子を使用して、負に荷電した核酸を中和します（正電荷を与える）、2) 生物学的方法：遺伝子操作されたウイルスを利用して、非ウイルス遺伝子を細胞に導入します（形質導入としても知られています）、3) 物理的方法：核酸を細胞質または細胞核に直接送達します。ただし、1つの方法をすべての細胞、すべての実験に適用できるわけではありません。最適なアプローチは、細胞型と実験のニーズに応じて選択する必要があります。トランスフェクション効率が高く、細胞毒性が低く、正常な生理機能への影響が最小限で、使いやすく、再現性が高いことが必要です (Kim and Eberwine, 2010)。

遺伝子導入技術

技術	利点	欠点
化学的遺伝子導入法		
カチオン性脂質による導入	<ul style="list-style-type: none"> 迅速で簡便なプロトコル 市販品を入手でき、再現性のある結果 高効率および高発現量 広範囲の細胞株および高スループットスクリーニングに適用可能 DNA、RNA、タンパク質の導入に使用可能 パッケージ化された核酸にサイズ制限なし 一過性と安定の両方のタンパク質生産に適用可能 核酸の <i>in vivo</i> 導入に使用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 最適化が必要な場合がある：一部の細胞株はカチオン性脂質に敏感 一部の細胞株はカチオン性脂質でトランスフェクションされにくい 血清が存在すると、複合体形成が妨げられ、トランスフェクション効率落ちる可能性がある 無血清培地の場合は、細胞毒性が増加する可能性がある
リン酸カルシウム共沈殿法	<ul style="list-style-type: none"> 安価で容易に入手可能 一過性と安定の両方のタンパク質生産に適用可能 高効率（細胞株によって異なる） 	<ul style="list-style-type: none"> 慎重な試薬調製が必要：リン酸カルシウム溶液は pH、温度、バッファー塩濃度の変化に敏感 再現性が問題になる可能性がある 細胞毒性（特に初代細胞において） リン酸塩濃度が高い RPMI 培地ではうまくいかない 動物全体に対する <i>in vivo</i> 遺伝子導入には適さない
DEAE-デキストラン	<ul style="list-style-type: none"> 手法が比較的シンプル 再現性のある結果 安価 	<ul style="list-style-type: none"> 一部の細胞型において化学的細胞毒性あり 一過性トランスフェクションに限定 トランスフェクション効率が低い（特に初代細胞において）
他のカチオン性ポリマー（ポリブレン、PEI、デンドリマーなど）による導入	<ul style="list-style-type: none"> 一般的に、血清中で安定しており、温度に敏感ではない 高効率（細胞株によって異なる） 再現性のある結果 	<ul style="list-style-type: none"> 一部の細胞型において細胞毒性あり 非生物分解性（デンドリマー） 一過性トランスフェクションに限定
生物学的遺伝子導入法		
ウイルス導入	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子導入法の中でもっとも高効率（初代細胞で 80 ~ 90% の導入効率） トランスフェクションが困難な細胞型にも良好に導入可能 核酸の <i>in vivo</i> 導入に使用可能 安定細胞株の作製（レトロウイルスベクター）、または一過性発現（アデノウイルスベクター）に使用可能 	<ul style="list-style-type: none"> トランスフェクションする細胞株にウイルス受容体が必要 挿入サイズに制限がある（ほとんどのウイルスベクター：約 10 kb、非ウイルスベクター：約 100 kb） 組み換えウイルスの作製が技術的に困難で時間がかかる バイオセーフティーの問題（潜在的疾病の活性化、免疫原性反応、細胞毒性、挿入変異、細胞の悪性形質転換）
物理的遺伝子導入法		
エレクトロポレーション	<ul style="list-style-type: none"> シンプルな原理 最適化後の再現性のある結果 ベクターが不要 細胞型と条件への依存性が少ない 最適化後、多数の細胞を迅速にトランスフェクション可能 	<ul style="list-style-type: none"> 特別な装置が必要 電気パルスおよび電界強度のパラメーターを最適化することが必要 細胞の操作が非常に多く必要 高い毒性レベルが観察される可能性がある 細胞死亡率が高いため、多数の細胞が必要 細胞膜が不可逆的に損傷し、細胞が溶解する可能性がある
パーティクルガン法（微粒子銃）	<ul style="list-style-type: none"> 細胞型と条件への依存性が少ない 核酸の <i>in vivo</i> 導入に使用可能 信頼できる結果が得られる直接的な方法 導入できる遺伝子のサイズと数が無制限 主に遺伝子ワクチン接種および農業の用途に使用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 高価な装置が必要 サンプルの物理的な損傷の原因となる 細胞死亡率が高いため、多数の細胞が必要 微粒子の調製が必要 研究用途には比較的高価 一般的に、エレクトロポレーションまたはウイルス/脂質による導入よりも低効率
直接マイクロインジェクション	<ul style="list-style-type: none"> 細胞型と条件への依存性が少ない シングルセルのトランスフェクションが可能 信頼できる結果が得られる直接的な方法 導入できる遺伝子のサイズと数が無制限 ベクターが不要 	<ul style="list-style-type: none"> 高価な装置が必要 技術的に困難で、非常に手間がかかる（細胞を 1 つずつ処理） 細胞死がよく生じる
レーザー法によるトランスフェクション（フォトトランスフェクション）	<ul style="list-style-type: none"> DNA、RNA、タンパク質、イオン、デキストラン、低分子、半導体ナノ結晶の導入に使用可能 非常に小さな細胞に適用可能 シングルセルトランスフェクション、または多数の細胞に対するコトランスフェクションが可能 ベクターが不要 高効率 広範囲の細胞株に適用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 高価なレーザー顕微鏡システムが必要 細胞の接着が必要 技術的に困難

遺伝子導入技術 (続き)

カチオン性脂質による導入

カチオン性脂質媒介性トランスフェクションは、外来遺伝形質を細胞に導入するためのもっとも一般的な手法の1つです。第一世代の脂質ベースのトランスフェクション試薬では、核酸を封入した後、細胞膜と融合して、そのカーゴを内部に蓄積する人工リポソームが必要でしたが (Fraleley et al., 1980)、新しいカチオン性脂質ベースの試薬では、負に荷電した核酸と正に荷電した合成脂質試薬の頭部基の間における静電相互作用によって、核酸 - カチオン性脂質試薬複合体が自然に形成されます。複合体はエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ、細胞質に放出されると考えられます。トランスフェクションされた DNA は、いったん細胞内に入ると、核に移行して未知のメカニズムによって発現されます。一方、RNA やアンチセンスオリゴヌクレオチドは、転座ステップをスキップし、細胞質内に留まります (「カチオン性脂質媒介性トランスフェクション」 (ページ 63) を参照)。

カチオン性脂質媒介性トランスフェクションの利点は、幅広い細胞株を高効率にトランスフェクションでき、ハイスループットスクリーニングに適合し、すべてのサイズの DNA、RNA、タンパク質を導入できることです。また、この手法は安定発現と一過性発現の両方に適合できます。他の化学的手法とは異なり、DNA や RNA を動物およびヒトに *in vivo* 導入する際に使用できます。カチオン性脂質媒介性トランスフェクションの主な欠点は、トランスフェクション効率が細胞型と培養条件に依存するため、それぞれの細胞型とトランスフェクション試薬についてトランスフェクション条件を最適化する必要があることです (「カチオン性脂質による導入で考慮すべきこと」 (ページ 90) を参照)。

当社は、DNA、RNA、siRNA、またはオリゴヌクレオチドをさまざまな細胞型に効率的に導入するための Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent をはじめとするカチオン性脂質媒介性トランスフェクション試薬を幅広く提供しています。Lipofectamine 3000 試薬を使用すると、最先端の脂質ナノ粒子テクノロジーにより、導入困難なさまざまな細胞型において優れたトランスフェクション効率を実現し、再現性の高い結果が得られ、細胞生存率が向上します (thermofisher.com/3000)。用途に合ったトランスフェクション試薬の選択に関する詳細については、「カチオン性脂質トランスフェクション試薬」(ページ 64) を参照してください。

DNA、siRNA、オリゴヌクレオチドのいずれかとトランスフェクション試薬を別々のチューブで希釈します。



核酸とトランスフェクション試薬を混合して複合体を形成させます。カチオン性脂質の正電荷が、核酸のリン酸骨格に結合します。



核酸-トランスフェクション試薬複合体を細胞に添加します。カチオン性脂質の正電荷によって、複合体が膜に結合します。



エンドサイトーシスを介して、複合体が細胞に取り込まれます。



トランスフェクションされた細胞の遺伝子発現またはサイレンシングをアッセイします。

図 5.1 : カチオン性脂質媒介性トランスフェクションのワークフロー

遺伝子導入技術 (続き)

リン酸カルシウム共沈殿法

リン酸カルシウム共沈殿法は、必要な成分が入手しやすく、安価であるため、1970年代初期に導入されて以来 (Graham and van der Eb, 1973)、よく用いられているトランスフェクション法です。また、この手法はマスターしやすく、多くの培養細胞型に効果的であるため、さまざまな培養細胞型の一過性トランスフェクションと安定トランスフェクションの両方に使用できます。しかし、リン酸カルシウム共沈殿法は、pH、温度、バッファー塩濃度の微小な変化に対する感受性が高いため、変動しやすい傾向があります。また、多くの種類の細胞培養 (特に初代細胞) に対して毒性となる可能性があります。また、すべての動物に対して核酸を *in vivo* 導入する際には適しません。脂質媒介性トランスフェクションなどの他の化学的トランスフェクション法に比べて、低いトランスフェクション効率を示します。

リン酸カルシウム共沈殿法の原理としては、リン酸緩衝生理食塩水中で DNA を塩化カルシウムと混合し、生成されたリン酸カルシウム-DNA 共沈殿物を培養細胞の上に分散させます。リン酸カルシウムによって、共沈殿物中に濃縮されている DNA の細胞表面への結合が促進され、DNA がエンドサイトーシスにより細胞に侵入します。DNA-塩化カルシウム溶液を添加しながらリン酸バッファーを通気することで、形成される沈殿物を可能な限り微細にすることができます。凝集した DNA は細胞に付着せず、効率的に侵入できないため、この操作は重要です。

DNAを塩化カルシウムと混合し、緩衝生理食塩水／リン酸溶液に慎重に添加します。



室温でインキュベートします。凝縮したDNAを含む非常に小さな不溶性粒子が沈殿物として生成されます。



DNA-リン酸カルシウム共沈物を細胞に添加します (細胞膜に付着します)。



この共沈物は、エンドサイトーシスを介して細胞質に取り込まれます。



細胞における一過性の遺伝子発現をアッセイするか、安定トランスフェクションを選択します。

図 5.2 : リン酸カルシウム共沈殿法のワークフロー

DEAE-デキストラン法による導入

ジエチルアミノエチル (DEAE) -デキストランは、炭水化物ポリマー (デキストラン) のポリカチオン性誘導体であり、核酸を培養哺乳類細胞に導入するために用いられた最初の化学試薬の1つです (Vaehri and Pagano, 1965)。カチオン性 DEAE-デキストラン分子は、負に荷電した核酸骨格に強固に結合します。これにより生じた核酸と DEAE-デキストラン複合体は正味の正電荷を持つため、細胞膜に付着し、エンドサイトーシスあるいは DMSO またはグリセロールによって誘導される浸透圧ショックにより細胞質に取り込まれます。

DEAE-デキストラン法の利点は、比較的シンプルで、再現性が高く、低コストであることです。一方で欠点は、細胞毒性があり、幅広い細胞型においてトランスフェクション効率が低く (一般的に、初代細胞で 10% 未満)、トランスフェクション手順中に血清含有率の低い培地を使用する必要があることです。また、この手法は一過性トランスフェクションに限定されており、安定細胞株の作製には適しません。

核酸をトランスフェクション培地中の DEAE-デキストラン溶液、またはリン酸緩衝生理食塩水と混合します。



ポリマーと核酸リン酸骨格間の静電相互作用を介して、核酸-DEAE-デキストラン複合体が形成されます。



核酸-DEAE-デキストラン複合体を細胞に添加します (静電相互作用を介して細胞表面に付着します)。



DMSO またはグリセロールを使用した浸透圧ショックにより、核酸-DEAE-デキストラン複合体の取り込みを誘導します。



細胞を洗浄して複合体を除去し、インキュベートすることで遺伝子発現させます。



細胞における一過性の遺伝子発現をアッセイします。

図 5.3 : DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションのワークフロー

遺伝子導入技術 (続き)

他のカチオン性ポリマーによる導入

遺伝子導入に使用される他のカチオン性ポリマーとしては、カチオン性ペプチドおよびその誘導体 (例: ポリリジン、ポリオルニチン)、直鎖または分岐鎖の合成ポリマー (例: ポリブレン、ポリエチレンイミン)、多糖ベースの導入分子 (例: シクロデキストリン、キトサン)、天然ポリマー (例: ヒストン、コラーゲン)、活性型および非活性型のデンドリマーが挙げられます。

カチオン性ポリマーは、疎水性部分を含まず、水に完全に溶解する点で、カチオン性脂質とは異なります。カチオン性ポリマーとカチオン性脂質は、トランスフェクション効率と細胞毒性の程度が著しく異なります。しかし、カチオン性ポリマーは、核酸-ポリマー複合体を形成することによってすべて同様に作用します。核酸-ポリマー複合体は、静電相互作用を介して細胞膜に付着し、エンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれます。取り込み効率は、細胞標的リガンドまたは核移行シグナルをポリマーに結合させることによって改善できます。

カチオン性ポリマーを使用することで、DEAE-デキストランと比較して、複合体の安定性、結果の再現性、トランスフェクション効率を向上できますが、細胞毒性があり、一過性トランスフェクションの研究に限定されるという主な制限は引き続き存在します。高分子量のカチオン性ポリマーは、非生物分解性であり、低分子ポリマーよりも細胞毒性が高い傾向がある一方、ポリマー:核酸の電荷比が増加することによって高いトランスフェクション効率を示します。しかし、高分子ポリマーの高い毒性は、高分子ポリマー構造に低分子ポリマーの生物分解性架橋を取り入れることによって減少させることができます。

核酸をトランスフェクション培地中のカチオン性ポリマー溶液、またはリン酸緩衝生理食塩水と混合します。



ポリマーと核酸リン酸骨格の間の静電相互作用を介して、核酸-カチオン性ポリマー複合体が形成されます。



核酸-トランスフェクション試薬複合体を細胞に添加します。この複合体は、静電相互作用を介して細胞表面に結合します。



核酸-カチオン性ポリマー複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ、細胞質に放出されます。



細胞における一過性の遺伝子発現をアッセイします。

図 5.4: カチオン性ポリマー媒介性トランスフェクションのワークフロー

ウイルスによる導入

脂質媒介性トランスフェクションが適さない細胞型には、ウイルスベクターがよく用いられます。ウイルス媒介性トランスフェクションは、形質導入としても知られ、トランスフェクションが困難な細胞型でタンパク質過剰発現やノックダウンを行う手段として、臨床研究においてもっとも一般的に用いられている手法です (Glover et al., 2005; Pfeifer and Verma, 2001)。アデノウイルス、オンコレトロウイルス、レンチウイルスのベクターは、哺乳類細胞培養および *in vivo* での遺伝子導入に幅広く用いられています。ウイルス遺伝子導入に関する他のよく知られた例としては、バキュロウイルスベースおよびワクシニアウイルスベースのベクターによるものがあります。さまざまなウイルス導入システムの詳細については、「ウイルスによる遺伝子導入」(ページ 66) を参照してください。

ウイルスは、*in vivo* トランスフェクション効率が高く、宿主ゲノムに組み込まれることによって遺伝子発現が維持されるため、臨床試験の遺伝子導入に好まれて使用されています。しかし、ウイルスによる導入には数多くの欠点があります。免疫原性および細胞毒性、技術的に困難で労力を要するベクターの製造手順、バイオセーフティーの要件を満たすための高いコスト、低いパッケージング容量 (非ウイルス性ベクターが約 100 kb であるのに対し、ほとんどのウイルスベクターは約 10 kb)、ウイルスベクター調製物における感染力の変動などが挙げられます (Glover et al., 2005; Kim and Eberwine, 2010; Vorburger and Hunt, 2002)。

遺伝子導入技術 (続き)

一般的な形質導入プロトコルには、導入遺伝子を運ぶ組み換えウイルスの設計、パッケージング細胞株における組み換えウイルス粒子の増幅、増幅したウイルス粒子の精製および滴定、次の目的の細胞に対する感染などがあります。初代細胞および細胞株において達成された形質導入効率が非常に高い(約 90 ~ 100%) 場合は、ウイルス特異的受容体を運ぶ細胞のみがウイルスに感染します。ウイルス増幅に用いられるパッケージング細胞株は、非ウイルストランスフェクション法によってトランスフェクションする必要があります。あることにも注意してください。

遺伝子クローニングにより、組み換えウイルスを作製します。



非ウイルス法を使用してパッケージング細胞株をトランスフェクションし、ウイルスベクターを増幅・単離します。



導入遺伝子を含むウイルスベクターを精製・滴定します。



目的の細胞(ウイルス特異的受容体を含む)に適切な感染多重度(MOI)で感染させます。



培養物からウイルスを除去するか、新しい培地を追加します(あるいはその両方を行います)。



形質導入された細胞の遺伝子発現またはサイレンシングをアッセイします。

図 5.5 : ウイルスによる導入のワークフロー

エレクトロポレーション

エレクトロポレーションは、電気パルスを用いて細胞膜に一時的に孔を形成し、その孔を通して、核酸のような物質を細胞内に通過させる物理的トランスフェクション法です。これは、外部から核酸を細菌細胞や哺乳類細胞など、多くの細胞型に導入する上で非常に効率的な方法です。

エレクトロポレーションはシンプルなプロセスに基づいています。宿主細胞および選択した分子を導電性溶液に懸濁し、混合液周囲の電気回路を閉じます。細胞懸濁液に対し、電気パルスを最適な電圧で、わずか数マイクロ秒からミリ秒継続してかけます。これによって、細胞膜のリン脂質二重膜が乱され、一時的に孔が形成されます。同時に細胞膜の電位差が増大し、DNAのような電荷を持つ分子が電気泳動と同じように孔を通して細胞膜を通過します (Shigekawa and Dower, 1988)。

エレクトロポレーションの主な利点は、すべての細胞型における一過性トランスフェクションおよび安定トランスフェクションに適用可能であることです。また、エレクトロポレーションは簡単で迅速であるため、いったん最適なエレクトロポレーション条件が決定されると、短時間で数多くの細胞をトランスフェクションできます。エレクトロポレーションの主な欠点は、高電圧パルスによって相当数の細胞死が引き起こされ、細胞膜は部分的にしか修復されないため、化学的トランスフェクション法に比べて多量の細胞が必要とされることです。Invitrogen™ Neon™ Transfection System などの最新の装置では、電気パルスを細胞間で均一に分配し、エレクトロポレーションチャンバー全体を安定な pH に維持することによって、高い細胞死率が克服されていますが、エレクトロポレーション効率と細胞生存率のバランスを取るために、パルスおよび電界強度のパラメーターを最適化することが必要です (「エレクトロポレーションー Neon Transfection System」 (ページ 69) を参照)。

エレクトロポレーションバッファーに懸濁して細胞を調製します。



特殊なバッファーと核酸の存在下で、細胞に電気パルスを印加します。



電気パルスによって細胞膜全体に電位差が生じ、膜に一時的な細孔が誘導され、核酸が通過できるようになります。



細胞を増殖条件に戻し、回復させます。



細胞の遺伝子発現またはサイレンシングをアッセイします。

図 5.6: エレクトロポレーションのワークフロー

遺伝子導入技術 (続き)

その他の物理的導入法

エレクトロポレーション以外の物理的遺伝子導入法には、パーティクルガン法、直接マイクロインジェクション、レーザー法によるトランスフェクションがあります。これらの物理的手法は使用するツールがそれぞれ異なりますが、すべてに共通しているのは、化学的手法やウイルス的手法を使用することなく、細胞膜を通過させることにより、核酸を細胞質または核に直接導入できることです。

パーティクルガン法 (微粒子銃としても知られる) は、核酸でコーティングした微細な重金属粒子 (多くの場合、金またはタングステン) を弾道装置 (「遺伝子銃」) を用いて受容細胞に高速で噴射する方法です。パーティクルガン法は、培養中の分裂細胞および非分裂細胞、ならびに *in vivo* 細胞への一過性トランスフェクションに使用できるため、遺伝子ワクチン接種や農業の用途によく用いられています (Klein et al., 1992; Ye et al., 1990; Burkholder et al., 1993)。この手法は信頼性が高く、迅速である一方、高額な設備を必要とし、サンプルに物理的な損傷が生じ、細胞死率が高いことから多くの細胞数が必要とされます。

直接マイクロインジェクションは、細胞ごとに、核酸を細針を用いて細胞質または核に送達する方法です。そのため、この方法は、遺伝子を卵母細胞に導入してトランスジェニック動物を作製したり、人工染色体を導入したりする *ex vivo* 用途に限定されます (Cappechi, 1980; Cappechi, 1989; Telenius et al., 1999)。直接マイクロインジェクションは導入効率がほぼ 100% ですが、かなりの技術的熟練が必要とされ、非常に手間がかかり、細胞死がよく生じます。そのため、この方法は、多数の細胞のトランスフェクションが必要とされる研究には適しません。

レーザー法によるトランスフェクションは、フォトトランスフェクション、レーザーフェクション、オプトポレーションとしても知られ、レーザーパルスを用いて細胞膜に対して一時的に透過性を与える方法です (Shirahata et al., 2001; Schneckenburger et al., 2002)。レーザーにより細胞膜に孔が生じると、培地とサイトゾルの浸透圧差によって、培地中にある核酸や他の目的物質 (イオン、低分子、タンパク質、半導体ナノ結晶など) が細胞に侵入するように促進されます。レーザー法によるトランスフェクションの利点は、トランスフェクション効率が高いことと、細胞のあらゆる位置に孔を形成できることです。しかし、この方法では、高価なレーザー顕微鏡システムが必要であり、細胞を基質に付着させる必要があります。

上述の方法に加えて、他の物理的導入法としては、流体力学上の圧力、超音波、または磁場を用いて、非修飾核酸または核酸 - 微粒子複合体を受容細胞に送達する方法があります。

カチオン性脂質媒介性トランスフェクション

メカニズム Lipofectamine トランスフェクション試薬などの特別に設計されたカチオン性脂質は、DNA および siRNA の細胞への送達を促進します (Chesnoy and Huang, 2000; Hirko et al., 2003; Liu et al., 2003)。カチオン性脂質の基本構造は、正に荷電した頭部基と、1 つまたは 2 つの炭化水素鎖で構成されています。荷電した頭部基は、脂質と核酸リン酸骨格との間の相互作用を支配し、DNA 凝縮を促進します。多くの場合、カチオン性脂質は中性の共脂質または補助脂質が添加された後、放出または微少溶液化操作が行われます。これにより、水中で正の表面電荷を持つ単層のリポソーム構造が得られます。

リポソームの正の表面電荷は、核酸と細胞膜の相互作用を媒介し、リポソーム/核酸トランスフェクション複合体と負に帯電した細胞膜との融合を可能にします。トランスフェクション複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれると考えられています。エンドサイトーシスは、細胞膜の局所領域が、膜結合/細胞内小胞を形成することによって DNA-リポソーム複合体を取り込むプロセスです。複合体は細胞内に取り込まれた後、エンドソーム経路を避け、細胞質を介して拡散し、遺伝子発現のために核に入ります。カチオン性脂質は、プロセスの初期段階で、DNA 凝縮および DNA と細胞の相互作用を媒介することにより、トランスフェクションを促進すると考えられています。

したがって、カチオン性脂質試薬を使用した送達の原理は、トランスフェクションに中性リポソームを使用する以前の試みとは異なります。カチオン性脂質試薬を使用すると、DNA 溶液はリポソーム内でカプセル化されません。負に荷電した DNA は、正に荷電したリポソームと自然に結合し、DNA-カチオン性脂質複合体を形成します。

リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-デキストラン法、ポリブレン法、エレクトロポレーションなどの従来のトランスフェクション法に伴う問題としては、DNA 導入効率が低い、再現性が低い、細胞毒性、不便などがあります。対照的に、カチオン性脂質試薬媒介性トランスフェクションでは、これまでさまざまな真核細胞で達成できなかった高いトランスフェクション効率が得られます。簡単に実行でき、一貫した再現性の高い結果が得られます。また、他の方法によるトランスフェクションに通常耐性のある多くの細胞株は、カチオン性脂質試薬を用いて正常にトランスフェクションできます。

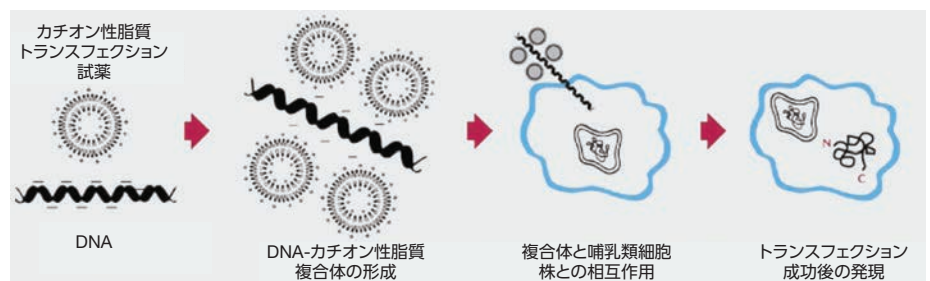


図 5.7 : カチオン性脂質による導入のメカニズム







カチオン性脂質媒介性トランスフェクション (続き)

カチオン性脂質トランスフェクション試薬 カチオン性脂質による導入は、真核細胞に DNA、RNA、siRNA、オリゴヌクレオチドを簡単に導入できる迅速かつシンプルで再現性の高い方法です。接着細胞、浮遊細胞、昆虫細胞、初代培養物など、幅広い細胞型の高効率トランスフェクションが可能です。トランスフェクション試薬の選択はトランスフェクション結果に大きく影響するため、選択する際には、導入したい分子 (DNA、RNA、タンパク質) とトランスフェクションする細胞型を考慮する必要があります。

以下の表は、サーモフィッシャーサイエンティフィックから入手可能なさまざまなカチオン性脂質トランスフェクション試薬の主な機能と用途を示しています。各トランスフェクション試薬の詳細や、さまざまな細胞株向けに最適化されたトランスフェクションプロトコルの詳細については、thermofisher.com/transfection をご覧ください。

トランスフェクション試薬	ペイロード	主な機能と用途
広域スペクトル試薬		
Lipofectamine 3000		<ul style="list-style-type: none"> プラスミドとRNAiのコトランスフェクションで最高レベルの効率と発現率 低容量でも高いトランスフェクション効率 幅広い細胞型 (接着性と浮遊性の両方) で効果的に機能 トランスフェクションの前後に洗浄ステップは不要 複合体は、血清培地で増殖する細胞に添加可能 がん細胞、トランスフェクションが困難な細胞、遺伝子編集の用途に推奨
Lipofectamine 2000		<ul style="list-style-type: none"> プラスミドまたはRNAiのトランスフェクションで高い効率と発現率 幅広い細胞型 (接着性と浮遊性の両方) で効果的に機能 堅牢な細胞向け トランスフェクションの前後に洗浄ステップは不要 複合体は、血清培地で増殖する細胞に添加可能 トランスフェクション時のコンフルエント >90% で最適 高スループット
Lipofectamine 2000 CD		<ul style="list-style-type: none"> Lipofectamine 2000試薬と同じ性能で、動物由来成分を含まない試薬 (「CD」=既知組成)

凡例

記号	説明	記号	説明	記号	説明	記号	説明
	タンパク質、shRNA、miRNA の発現に用いるプラスミド DNA		遺伝子発現の RNAi に用いるノンコーディング RNA		RNAi ベクターと siRNA を同時にトランスフェクションするための同時導入		タンパク質の導入に用いる CRISPR-Cas9
	タンパク質の発現に用いるプラスミド DNA		タンパク質の発現に用いる mRNA		遺伝子発現のアンチセンス阻害に用いるオリゴヌクレオチド		

トランスフェクション試薬	ペイロード	主な機能と用途
RNA 試薬		
Lipofectamine RNAiMAX		<ul style="list-style-type: none"> Stealth RNAi および <i>Silencer Select</i> siRNA、Dicer 産生 siRNA のプール、mirVana miRNA ミミックおよび阻害剤、mRNA、snRNA の一過性導入に推奨 効果的な遺伝子ノックダウンが可能な、低濃度な siRNA を導入 最小限の細胞毒性 さまざまな細胞種に効率よく導入可能 <i>in vitro</i> トランスフェクション試薬
Lipofectamine MessengerMAX		<ul style="list-style-type: none"> ニューロンおよびさまざまな初代細胞型で高いトランスフェクション効率 Cas9 mRNA を使用するゲノム編集実験に使用可能 インテグレーションのリスクがなく、より迅速なタンパク質発現が可能
Invivofectamine 3.0		<ul style="list-style-type: none"> 全身投与により <i>in vivo</i> で siRNA を効率的に導入 マウスの肝臓で効果的な mRNA やタンパク質の機能のノックダウン 低毒性で簡便
Oligofectamine		<ul style="list-style-type: none"> アンチセンスオリゴヌクレオチドのトランスフェクション 非常に特異的で無毒性 低コンフルエント（トランスフェクション時 30 ~ 50%）に最適
タンパク質生産用試薬		
Lipofectamine CRISPRMAX		<ul style="list-style-type: none"> Cas9 タンパク質導入用に最適化された最初の脂質ナノ粒子トランスフェクション試薬 実証済みの切断効率：iPSC、mESC、N2A、CHO、A549、HCT116、HeLa、HEK293 など 20 個の細胞型で検証済み 低い細胞毒性：実験開始に必要な細胞数が少ない 高スループットに最適：96 ウェルフォーマットに最適な導入ソリューション
ExpiFectamine 293		<ul style="list-style-type: none"> バイオ生産における高密度浮遊培養した 293 細胞用のトランスフェクション試薬 293 細胞の高密度培養で使用される他のトランスフェクション試薬よりも 2 ~ 10 倍高い収量 安定性・再現性のあるトランスフェクション結果 1 mL 未満から 10 L 以上の培地にも導入可能なトランスフェクション試薬
FreeStyle MAX		<ul style="list-style-type: none"> バイオ生産における一過性哺乳類タンパク質発現に使用可能 ミリグラム単位のタンパク質収量が可能 CHO 浮遊細胞での一過性トランスフェクション用に最適化されており、HEK293 細胞にも対応
293fectin		<ul style="list-style-type: none"> FreeStyle 293 Expression System と組み合わせて、一過性タンパク質バイオ生産に使用 FreeStyle 293-F 細胞（浮遊細胞）用に最適化
Optifect		<ul style="list-style-type: none"> 低コンフルエント（トランスフェクション時 <70%）に最適 トランスフェクション試薬に対する感受性が高い細胞株用
Cellfectin		<ul style="list-style-type: none"> S2、Sf9、Sf21、High Five 細胞を含む昆虫細胞の最適なトランスフェクション
DMRIE-C Reagent		<ul style="list-style-type: none"> CHO、リンパ球、Jurkat の細胞株を含む浮遊細胞のトランスフェクション

ウイルスによる遺伝子導入

脂質媒介性トランスフェクションが適さない細胞型には、ウイルスベクターがよく用いられます。ウイルス媒介性トランスフェクションは、形質導入としても知られ、トランスフェクションが困難な細胞型でタンパク質過剰発現やノックダウンを行う手段として、臨床研究においてもっとも一般的に用いられている手法です (Glover et al., 2005; Pfeifer and Verma, 2001)。ウイルス導入の主な利点の1つは、そのプロセスを生体内 (*in vivo*) または細胞培養 (*in vitro*) で実行でき、約 95 ~ 100% の遺伝子導入効率を達成できることです。

ウイルスベクターの主な特徴

ウイルスベクターは、特定の用途に合わせて作製されますが、一般的にいくつかの主要な特性は共通している必要があります。

- **安全性**：ウイルスベクターは、多くの場合、病原性ウイルスから作製されますが、取り扱う際のリスクを最小化するように改変されます。この改変には、通常、ウイルスの複製に必要な不可欠なウイルスゲノムの一部の欠失が含まれます。これにより、ウイルスは細胞に効率よく感染して分子を導入できるようになりますが、この欠損している不可欠なタンパク質を供給するヘルパーウイルスが存在しない条件下では、新しいウイルス粒子の産生は妨げられます。しかし、ウイルスベクターを使用する際には、挿入変異が安全上の懸念として残されています。挿入変異では、ウイルス DNA の異所性染色体組み込みによって、がん抑制遺伝子の発現が妨げられたり、がん遺伝子が活性化されたりすることで、細胞の悪性形質転換が生じます (Glover et al., 2005)。
- **低毒性**：ウイルスベクターが細胞に感染することで、細胞の生理機能に与える影響は最小限にする必要があります。このことは、*in vivo* の遺伝子導入を必要とする研究においては特に重要です。体内でベクターが異物と見なされると、免疫反応が誘導されるためです (Nayak and Herzog, 2009)。
- **安定性**：一部のウイルスは遺伝的に不安定で、急速にゲノム再編成が起きる可能性があります。このことは、ウイルスベクターを用いて研究を実施する際に、結果の予測性と再現性に弊害となります。そのため、不安定なベクターは通常使用されません。
- **細胞型の特異性**：ほとんどのウイルスベクターは、できるだけ幅広い細胞型に感染できるように設計されています。しかし、逆に特異性の高いものが推奨される場合もあります。ウイルスが特定の細胞型を標的とするように、ウイルス受容体を改変できます。このように改変したウイルスをシュードタイプといいます。
- **選択性**：ウイルスベクターには、特定の抗生物質に対して耐性を持つような選択マーカー遺伝子を含ませる必要があります。これによって、ウイルスベクターが導入された細胞を単離できます。

一般的なウイルスベクター

アデノウイルスは、ほぼすべての哺乳類細胞型に一過性に形質を導入できる、幅広い細胞指向性を持つ DNA ウイルスです。アデノウイルスは、コクサッキー/アデノウイルス受容体 (CAR) と結合することにより、標的細胞に侵入します (Bergelson et al., 1997)。アデノウイルスは CAR と結合した後、インテグリンを介したエンドサイトーシスを経て内在化し、続いて核に能動輸送されて、その DNA がエピソームとして発現されます (Hirata and Russell, 2000)。アデノウイルスベクターは、多くの細胞型の一過性導入で良好に機能します。しかし、非分裂細胞など一部の導入困難な細胞株の場合や、安定的な発現が必要な場合には、レンチウイルスベクターが適しています。アデノウイルスのパッケージング容量は 7~8 kb です。

レトロウイルスは、宿主細胞の染色体に自らのゲノムを安定的に組み込ませるプラス鎖 RNA ウイルスです。レトロウイルスを水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) などの幅広い指向性を有するエンベロープでシュードタイピングすると、ほぼすべての哺乳類細胞型に侵入させることができます。しかし、ほとんどのレトロウイルスは、細胞分裂中における核膜崩壊がなければ細胞に感染できません。そのため、形質導入にレトロウイルスを使用することは、細胞の複製に関する要件によって制限されます。レトロウイルスの他の欠点としては、挿入変異の可能性や、潜在的疾患の発症の可能性などが挙げられます。レトロウイルスは、アデノウイルスと同様に約 8 kb の外来遺伝子を運ぶことができます。

レンチウイルスは、レトロウイルスファミリーのサブグループです。そのため、宿主細胞ゲノムに組み込むことができ、安定的な長期発現が可能です (Anson, 2004)。レンチウイルスは他のレトロウイルスよりも汎用性の高いツールです。活性化された核輸送経路を介して、神経細胞や造血細胞などの分裂しない最終分化細胞集団に対しても形質導入を行えます。

アデノ随伴ウイルスは、幅広いタイプの分裂細胞および非分裂細胞に形質導入を行うことができます。ただし、パッケージング細胞で組み換えウイルス粒子を産生するためには、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスとの共感染が必要になります。これにより、ヘルパーウイルスを含まない高品質のウイルスストックが得られにくくなります。また、アデノ随伴ウイルスのパッケージング容量はわずか 4.9 kb です。その一方で、アデノ随伴ウイルスはほとんどの細胞型で低い免疫原性を示し、ヒト染色体の特定の領域に組み込むことが可能であるため、挿入変異を回避することができます。

ウイルスによる遺伝子導入 (続き)

タンパク質の過剰発現に使用できる他のウイルスベクターシステムには、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルスをベースとするベクターがあります。バキュロウイルスは通常、昆虫細胞に感染しますが、組み換えバキュロウイルスは、広範な哺乳類細胞型で、組み換えタンパク質の一過性発現における遺伝子導入媒介物として機能します。また、バキュロウイルスベクターに優性選択マーカールを含ませることによって、安定的に組み換え遺伝子を発現するように細胞株を誘導できます (Condreay et al., 1999)。ワクシニアウイルスをベースとするベクターは、大きな DNA フラグメントを幅広い哺乳類細胞に導入する際に使用できます。しかし、ワクシニアウイルスが感染した細胞は 1～2 日以内に死滅するため、このシステムの使用は一過性タンパク質生産に限定されます。単純ヘルペスウイルスは、神経細胞に感染する二本鎖 DNA ウイルスです。

ウイルスシステム	サイズ	DNA インサートサイズ	最大力価 (粒子 / mL)	感染	発現	欠点
アデノウイルス	36 kb (dsDNA)	8 kb	1×10^{13}	分裂細胞および非分裂細胞	一過性	強力な抗ウイルス免疫反応を誘発
レトロウイルス	7～11 kb (ssRNA)	8 kb	1×10^9	分裂細胞	安定	挿入変異の可能性
レンチウイルス	8 kb (ssRNA)	9 kb	1×10^9	分裂細胞および非分裂細胞	安定	挿入変異の可能性
アデノ随伴ウイルス	8.5 kb (ssDNA)	5 kb	1×10^{11}	分裂細胞および非分裂細胞	安定、部位特異的な組み込み	複製にはヘルパーウイルスが必要、高純度なウイルスストックの産生が困難
バキュロウイルス	80～180 kb (dsDNA)	上限は不明	2×10^8	分裂細胞および非分裂細胞	一過性または安定	限定的な哺乳類宿主範囲
ワクシニアウイルス	190 kb (dsDNA)	25 kb	3×10^9	分裂細胞	一過性	細胞変性効果の可能性
単純ヘルペスウイルス	150 kb (dsDNA)	30～40 kb	1×10^9	分裂細胞および非分裂細胞	一過性	潜伏感染時には遺伝子が発現しない

エレクトロポレーションー Neon Transfection System

Neon Transfection System は、サーモフィッシャーサイエンティフィックが提供するベンチトップ型の次世代エレクトロポレーション装置です。エレクトロポレーションチャンバーとして電動ピペットチップを使用して、初代造血細胞および不死化造血細胞、幹細胞、初代細胞を含む哺乳類細胞に対して効率的にトランスフェクションを行うことができます。エレクトロポレーションチャンバーは、細胞間で電流を均質に分布させ、チャンバー全体で安定な pH を維持できるように設計されています。これにより、イオン形成とごくわずかな熱の生成が抑えられ、キュベットを用いる従来のエレクトロポレーションシステムに比べて細胞生存率とトランスフェクション効率が向上します。

Neon Transfection System を使用すると、核酸、タンパク質、siRNA を初代細胞や幹細胞を含むあらゆる哺乳類細胞型に効率よく導入することができ、高い細胞生存率が得られます。さまざまな細胞培養フォーマット (60 mm、6 ウェル、48 ウェル、24 ウェルのプレート) で、10 μ L または 100 μ L のサンプル容量を用いて、1 回の反応で 1×10^4 個から 5×10^6 個の細胞にトランスフェクションすることができます。

Neon Transfection System には、初代細胞や幹細胞を含むさまざまな哺乳類細胞型に対応できる 1 つのトランスフェクションキットが使用されるため、細胞型ごとに最適なバッファを決定する必要はありません。また、Neon 装置には、核酸 / siRNA と細胞型に対して条件を最適化するための 24 ウェル用最適化プロトコルがあらかじめプログラムされています。Neon 装置のデータベースでは、最大 50 個の細胞固有プロトコルをプログラミングおよび保存できます。最適化されたプロトコルも [thermofisher.com/neon](https://www.thermofisher.com/neon) から簡単にダウンロードできるため、一般的に使用される多くの細胞型においてトランスフェクション効率を最大化できます。

エレクトロポレーションー Neon Transfection System (続き)

Neon Transfection Systemでトランスフェクションに成功した細胞型*					
血球/免疫細胞					
ヒトBC-1細胞	ヒトJiyoye細胞	ヒトRaji細胞	ヒトSKW6.4細胞	ヒトHL-60細胞	ヒトマクロファージ細胞
ヒトBJAB細胞	ヒトK-562細胞	ヒトRamos細胞	ヒトRPMI8226細胞	ヒトNAMALWA細胞	ヒトKG-1細胞
ヒトIM-9細胞	ヒトLCL細胞	ヒト樹状細胞	ヒトRS4-11細胞	ヒトPBMC細胞	ヒトCCRF-CEM細胞
ヒトSCID.adh細胞	ヒトU-937細胞	ヒトJurkat細胞	マウスRAW 264.7細胞	マウスMPC-11細胞	マウスRamos細胞
マウスRBL-2H3細胞	マウスBW5147 (T200-A)5.2細胞	マウスM1細胞	マウスEL4細胞	マウスP815細胞	
結合組織					
ヒトHOS細胞	ヒトMH7A細胞	ヒトBJ細胞	ヒトHT-1080細胞	ヒトU-2 OS細胞	ヒトIMR-90細胞
ヒトSaos-2細胞	Gibcoヒト新生児皮膚線維芽細胞	ヒトWI-38細胞	マウス胚性線維芽細胞 (MEF)	マウスNIH/3T3細胞	マウスPA317細胞
マウスL-929細胞	マウス3T3-L1細胞	サルCOS-7細胞	サルVero細胞	ウマ胚性皮膚線維芽細胞 (NBL-6)	
上皮細胞					
ヒトT24細胞	ヒトChangX-31細胞	ヒトHEK293細胞	ヒトARPE-19細胞	ヒトCOLO 201細胞	ヒトHCT 116細胞
ヒト253J細胞	ヒトHT-29細胞	ヒトHCT15細胞	ヒトRKO細胞	ヒトSW480細胞	ヒトWiDr細胞
ヒト293A細胞	ヒトJ82細胞	ヒトRT4細胞	ヒトHep G2細胞	ヒトHep3B細胞	ヒトBT-20細胞
Gibcoヒト乳腺上皮細胞	ヒトSK-HEP-1細胞	ヒトSNU-387細胞	ヒトHCC1937細胞	ヒトHs-578T細胞	ヒトMCF7細胞
ヒトMDA-MB-231細胞	ヒトSK-BR-3細胞	ヒトT-47D細胞	ヒトSK-OV-3細胞	ヒトDU 145細胞	ヒトMCF-ADR細胞
ヒトLNCaP細胞	ヒトA549細胞	ヒトPANC-1細胞	ヒトBxPC-3細胞	ヒトNCI-H23細胞	ヒトPC-3細胞
ヒトTSU-Pr1細胞	ヒトBEAS-2B細胞	ヒトNCI-H69細胞	ヒトHN3細胞	ヒトG-361細胞	ヒトARO細胞
ヒトHeLa細胞 (ATCC)	ヒトFRO細胞	ヒトCalu-3細胞	ヒトMEWO細胞	ヒトNPA細胞	ヒトA-431細胞
ヒトC-33 A細胞	マウスP19細胞	ラットGH3細胞	ラットNRK細胞	ラットPC-12細胞	ラットH-4-II-E細胞
チャイニーズハムスターCHO-K1細胞	チャイニーズハムスターCHO DG44細胞	ハムスターBHK-21細胞	イヌMDCK細胞		
内皮細胞					
Gibcoヒト内皮細胞	ヒトHUVEC細胞	マウスb-END.3細胞			
筋細胞					
Gibcoヒト大動脈平滑筋細胞	マウスC2C12細胞	ラットL6細胞	ラット心筋細胞		
神経/グリア細胞					
ヒトT98G細胞	ヒトU-87 MG細胞	ヒトSK-N-MC細胞	ヒトSH-SY5Y細胞	マウスGT1-1細胞	マウスGT1-7細胞
マウスグリア細胞	Gibcoラット皮質星状細胞	Gibcoラット初代皮質ニューロン細胞	ラット星状細胞	Gibcoラットグリア前駆細胞	Gibcoラット初代海馬神経細胞
ラットHiB5細胞	ラットC6グリア細胞	ラットSCN2.2細胞	ラットF-11細胞		
分泌細胞					
ヒトSW-13細胞	ヒトSV40 MES 13細胞				
幹細胞					
ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)	ヒトBGO1V胚性幹細胞	ヒトH9胚性幹細胞	Gibcoヒト神経幹細胞	ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC)	マウス胚性幹細胞
Gibcoラット神経幹細胞					

*ここに掲載されている細胞型に対して最適化されたNeonトランスフェクションプロトコルの詳細については、thermofisher.com/neonをご覧ください。

安定トランスフェクションにおける細胞の選択

良好な安定トランスフェクションを実現するためには、効果的な DNA 導入と、その DNA を取り込んだ細胞を選択する方法が必要となります。DNA が安定的に導入されるのは、トランスフェクションされた細胞の約 10^4 個に 1 個です (この効率は、細胞型の違いや、線状 DNA と環状 DNA のどちらを使用するかによって異なります)。線状 DNA を使用すると、導入がもっとも効率的になります。

トランスフェクションされた DNA が安定的に発現する細胞を選択する上で、もっとも信頼できる方法の 1 つは、トランスフェクションに用いられる DNA コンストラクト、または細胞にコトランスフェクションされる別のベクターに選択マーカーを含ませて、短い回復期間後に細胞に適切な選択圧をかけることです。コトランスフェクションされたベクターの選択マーカーを発現させる際には、選択マーカーが含まれる細胞に目的の遺伝子も含まれていることを確認するため、目的の遺伝子を有するベクターと選択マーカーを有するベクターのモル比を 5 : 1 ~ 10 : 1 の範囲にする必要があります。

よく使用される選択マーカーは、さまざまな選択薬剤への耐性を与える遺伝子、あるいはトランスフェクションされる細胞株で欠損している必須遺伝子を補う遺伝子です。選択培地で培養すると、トランスフェクションされていない細胞、または一過性にトランスフェクションされた細胞は死滅し、抗生物質耐性遺伝子を十分なレベルで発現している細胞、または必須遺伝子の欠損を補うことができる細胞は生存します。

真核生物のための抗生物質の選択

当社では、さまざまな選択的真核生物発現ベクターの補足となる高品質の選択試薬を提供しています。安定細胞トランスフェクションで選択抗生物質としてもっとも一般的に使用されているのは、Gibco™ Geneticin™ (G418 硫酸塩)、Zeocin™、ハイグロマイシン B、ピューロマイシン、ブラストサイジンです。こうした抗生物質は、二重選択や、迅速な安定細胞株樹立など、各研究ニーズに合わせて選択します。

Geneticin 選択抗生物質

Geneticin 試薬 (G418 硫酸塩としても知られています) は、一般的に哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞の選択に用いられます。当社の Geneticin 試薬は高純度であることから、他社の G418 製品より 15 ~ 30% 低い濃度で同等の選択能を発揮するため、生存クローンコロニーがより早く生じ、外観がより健康な細胞が得られることが期待できます。

Zeocin 選択抗生物質

Zeocin 試薬は、哺乳類細胞株、酵母、昆虫細胞、細菌に対して選択能があります。Zeocin 試薬への耐性は、She ble 遺伝子によって付与されます。この遺伝子のタンパク質が発現した細胞では、Zeocin 試薬の結合と細胞内 DNA の切断が防止されます。選択に必要とされる濃度は 50 ~ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (一般的には 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の範囲で、細胞型によって異なります。

安定トランスフェクションにおける細胞の選択 (続き)

ハイグロマイシンB選択抗生物質

ハイグロマイシン B は、80S リボソームにおいて転座を阻害し、翻訳ミスを促進することで、タンパク質合成を阻害するアミノグリコシド系抗生物質です。ハイグロマイシン B は、作用機序が Geneticin 試薬や Zeocin 試薬とは異なるため、二重選択の実験で使用できます。ハイグロマイシン B への耐性は、大腸菌由来のハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg または hph) によって付与されます。選択に必要なとされる濃度は 100 ~ 1,000 µg/mL (一般的には 200 µg/mL) の範囲で、各細胞株に合わせて最適化する必要があります。

ピューロマイシン二塩酸塩選択抗生物質

Gibco™ピューロマイシン二塩酸塩は、原核細胞と真核細胞の両方において翻訳を阻害する、*Streptomyces alboniger* 由来のアミノヌクレオシド系抗生物質です。*Streptomyces* 由来のピューロマイシン N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (pac) によって耐性が付与されます。ピューロマイシンの作用機序は迅速であるため、低濃度の抗生物質でも急速な細胞死が引き起こされ、1週間未満でピューロマイシン耐性安定細胞株が得られます。哺乳類の接着細胞は 2 ~ 5 µg/mL の濃度に感受性を示す一方、浮遊細胞は 0.5 ~ 2 µg/mL の低濃度に感受性を示します。

ブラストサイジンS HCl選択抗生物質

ブラストサイジンは、原核細胞と真核細胞の両方において翻訳を強力に阻害する、*Streptomyces griseochromogenes* 由来のヌクレオシド系抗生物質です。*Aspergillus terreus* 由来の bsd 遺伝子によって耐性が付与されます。大腸菌株は 50 µg/mL の濃度に感受性を示す一方、哺乳類細胞は 2 ~ 10 µg/mL の低濃度に感受性を示します。ブラストサイジンに感受性を示す細胞では細胞死が急速に引き起こされるため、低濃度の抗生物質でも1週間未満でブラストサイジン耐性の安定哺乳類細胞株が得られます。

レポーター遺伝子アッセイ

レポーター遺伝子は、トランスフェクション後に遺伝子産物が容易にアッセイ可能な遺伝子です。良好にトランスフェクションされた細胞のスクリーニングや、遺伝子発現の調節に関する研究に使用するマーカーとして、あるいはトランスフェクション効率を標準化するためのコントロールとして使用できます。

理想的なレポーター遺伝子としては、研究で使用する細胞には存在せず、元の構造を保持した遺伝子とは容易に識別可能である必要があります。また、簡便にアッセイ可能で、広範囲な直線検出範囲を持つ必要があります。レポーター遺伝子の存在が、トランスフェクションされた細胞の正常な生理機能や一般的な健康状態に影響しないことも重要です。

レポーター遺伝子は、構成的に発現するか、 β -ガラクトシダーゼ系における IPTG の誘導のような外的介入によって誘導的に発現します。レポーター遺伝子アッセイは、一般的にはトランスフェクションの 1～3 日後に行います。ただし、アッセイの最適な時期は実験に基づいて決定する必要があります。

トランスフェクション アッセイ

トランスフェクタントのスクリーニングにレポーター遺伝子を使用した場合、細胞死や成長阻害を引き起こす可能性のある選択試薬から生体を保護する選択マーカーとは異なり、レポーター遺伝子を含む細胞を視覚的に識別することができます。このように用いたレポーター遺伝子は、通常、目的の導入遺伝子のプロモーターとは独立したレポーター遺伝子自体のプロモーターで発現します。これにより、目的遺伝子がある特定の条件下あるいはアクセス困難な組織でしか発現しない場合でも、良好にトランスフェクションされた細胞をスクリーニングできます。

レポーター遺伝子は、トランスフェクションのコントロールとしても使用できます。たとえば、すべての実験で用いたレポーター遺伝子の発現レベルを比較することで、異なる実験間のトランスフェクション効率を標準化できます。

遺伝子調節アッセイ

レポーター遺伝子アッセイは、cis 活性化因子（遺伝子調節要素）と trans 活性化因子（転写因子または外的調節因子）の両方を用いた遺伝子発現調節を研究する上で非常に重要です。また、レポーター遺伝子システムでは、特定のイベントやプロセスのバイオマーカーとして、経路特異的な遺伝子プロモーター、組織特異的な遺伝子プロモーター、あるいは発生過程で調節される遺伝子プロモーターを使用できます。

検出可能なレポーター遺伝子は、これらのアッセイにおいて、研究対象とする遺伝子におけるコーディング領域の代替として機能します。レポーター遺伝子コンストラクトには、解析すべき遺伝子調節要素、レポーター遺伝子の配列、機能的 mRNA の転写に必要な配列が 1 つまたは複数含まれています。レポーターコンストラクトを細胞に導入すると、レポータータンパク質の酵素活性を直接測定することで、レポーター遺伝子の発現レベルをモニタリングできます。

レポーター遺伝子アッセイ (続き)

一般的なレポーター遺伝子 一般的に用いられているレポーター遺伝子は、通常、蛍光タンパク質や発光タンパク質を発現することで、視覚的に識別可能な特性を誘導します。

緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現している細胞は、UV 光下で緑色に光ります。個々の細胞を識別するためには、特殊な顕微鏡が必要です。黄色や赤色の蛍光タンパク質も利用可能であるため、1 度に複数の遺伝子を解析できます。通常は、遺伝子発現を測定する際に用いられます。

研究用試薬として用いられるルシフェラーゼは、多くの場合 *P. pyralis* ルシフェラーゼを指します (他のいくつかのホタル種が由来となる組み換えルシフェラーゼも市販されています)。ルシフェラーゼ酵素は、基質 (通常、ルシフェリン) との反応を触媒して、黄緑色または青色の光 (ルシフェラーゼ遺伝子によって異なります) を発します。ルシフェラーゼ生物発光は光励起を必要としないため、自己蛍光が最小限に抑えられ、ほぼバックグラウンドフリーの蛍光となります。

GUS アッセイ (β -グルクロニダーゼを使用) は、複雑な装置を一切使用することなく、1 つの細胞を青色に染色して検出する優れた手法です。欠点は、処理中に細胞が死滅することです。植物学においては、特に一般的な手法です。

細菌細胞と真核細胞の両方で使用される方法として、ブルーホワイトセレクションがあります。細菌の *lacZ* 遺伝子は、 β -ガラクトシダーゼ酵素をコードします。一定量のガラクトシド (例: X-gal) を含む培地を添加すると、*lacZ* 遺伝子が発現している細胞では X-gal が青色の生成物に変換され、肉眼で確認できます。

RNAi とノンコーディング RNA の研究

RNA 干渉 (RNAi) は、細胞生物学を研究する上で非常に強力なツールです。遺伝子発現をノックダウンすることで、さまざまな細胞型のタンパク質機能を解析することができます。RNAi は特定の研究室でのみ使用される技術と見られていましたが、現在では遺伝子機能の研究に欠かせないものであると考えられています。RNAi は、タンパク質ノックダウン研究、表現型解析、機能回復、経路解析、*in vivo* ノックダウン、創薬ターゲット探索において重要なツールとなっています。

RNAi に関する一般用語集

RNAi

リボ核酸干渉 (Ribonucleic acid interference) (Fire and Mello et al., 1998 で初めて使用)。

siRNA

低分子干渉 RNA (Short interfering RNA)。siRNA は、ジヌクレオチド 3' オーバーハングが付いた 21 ~ 25 bp の dsRNA です。RNAi 経路で、長い dsRNA が Dicer によって切断されることで生成されます。哺乳類細胞に合成 siRNA を導入すると、RNAi を誘導することができます。siRNA は、内在性前駆体から生成される場合もあります。

shRNA

低分子ヘアピン RNA (Short hairpin RNA) (低分子干渉ヘアピンとも呼ばれます)。shRNA は、安定した遺伝子サイレンシングを実現するために siRNA を細胞に供給するベクターベースのアプローチに用いられます。さまざまな長さのヘアピンやループを形成するように設計されたターゲット配列が、強力な Pol III 系プロモーターによって転写開始されます。このヘアピンやループは、細胞内 siRNA 機構によってプロセシングされます。shRNA を細胞内に導入すると、RNAi により相補配列を持つ遺伝子の発現を抑制することができます。

miR RNAi

microRNA を発現して RNAi を引き起こすベクター。miRNA は、19 ~ 23 nt の一本鎖 RNA であり、不完全な塩基対で形成されるヘアピン構造を特徴とする一本鎖の前駆体転写物から生成されます。miRNA は、RISC と同一ではないものの類似したサイレンシング複合体の中で機能します (次ページの図を参照)。

化学修飾 siRNA

化学修飾を受けた siRNA 分子。

RISC

RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC)。タンパク質と siRNA から構成されるヌクレアーゼ複合体です。RISC 複体内では、siRNA に相補的な内在性 mRNA が標的として切断されます。

RNAiとノンコーディングRNAの研究(続き)

オフターゲット効果

siRNAまたはDicer基質siRNA(D-siRNA)プールの導入後に、1個または数個の非特異的な遺伝子において、遺伝子機能の喪失が見られる効果です。この効果は、siRNAのセンス鎖によって媒介される場合があり、無関係な遺伝子の機能喪失が開始されます。特定のsiRNAにおけるアンチセンス鎖が、標的ではない遺伝子の発現をノックダウンするのに十分な相同性を持つ場合は、その二次的効果としてオフターゲット効果が生じることもあります。

RNAiのしくみ RNAiでは、2つのタイプの低分子RNAが機能しています。1つ目は、合成低分子干渉RNA(siRNA)分子です。mRNAを切断し、目的遺伝子の発現を効果的にノックダウンします。2つ目は、microRNA(miRNA)分子です。自然発生する19~22ヌクレオチド長の一本鎖RNAで、標的mRNAの3'非翻訳領域(UTR)に結合し、翻訳を阻害することによって、遺伝子発現を調節します(Ambros, 2004)。RNAiの詳細については、thermofisher.com/rnaiをご覧ください。

siRNA解析 RNAiを誘導するには、合成分子、RNAiベクター、*in vitro* dicingなどのいくつかの方法があります(以下の図5.8を参照)。哺乳類細胞では、dsRNAの短い断片(低分子干渉RNA)によって、標的細胞内mRNAの特異的分解が開始されます。このプロセスで、siRNAのアンチセンス鎖は多タンパク質複合体(RNA誘導サイレンシング複合体(RISC))の一部となります。その後、対応するmRNAを識別して、特異的部位で切断します。次に、この切断が繰り返されることでmRNAが分解され、最終的にタンパク質の発現抑制が起こります。siRNA解析の詳細については、thermofisher.com/sirnaをご覧ください。

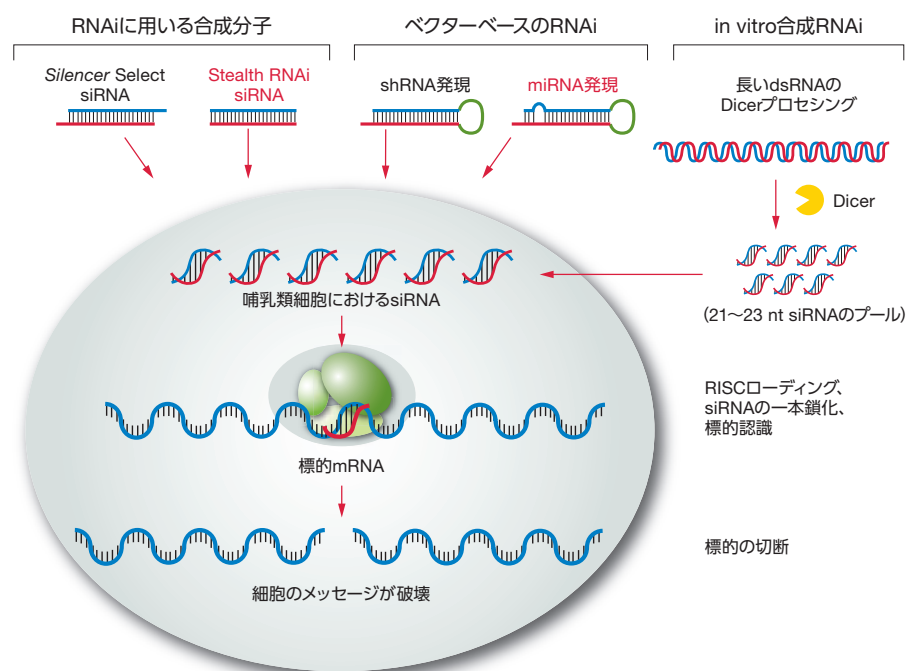


図 5.8: 哺乳類細胞で RNAi ノックダウンを行う方法

miRNA 解析

RNA ポリメラーゼ II と RNA ポリメラーゼ III の両方によって、miRNA が含まれる遺伝子が転写され、長い一次転写産物 (pri-miRNA) が生成されます。この一次転写産物は、RNase III 型酵素の Drosha によってプロセッシングされ、70 ~ 90 bp 長のヘアピン構造 (pre-miRNA) が生じます。pre-miRNA ヘアピンは細胞質に輸送され、RNase III タンパク質の Dicer によって 19 ~ 22 ヌクレオチド長の短い二本鎖 miRNA までさらにプロセッシングされます。この二本鎖 miRNA は、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) (多タンパク質ヌクレアーゼ複合体) によって認識されます。二本鎖のうち一方の鎖であるガイド鎖によって、このタンパク質複合体は相補的な mRNA 転写産物を認識できます。RISC-miRNA 複合体は、配列相同性が不完全な領域において、標的 mRNA の 3' UTR と相互作用することがよくあります。これにより、メカニズムはまだ完全に解明されていませんが、タンパク質合成が阻害されます (図 5.9)。

植物の miRNA は、正確な (あるいは、ほぼ正確な) 相補的塩基対形成により、標的 mRNA 上の配列と結合して mRNA の切断と分解を指示することができます (Rhoades et al., 2002; Chen, 2005)。標的 mRNA における単一ホスホジエステル結合の切断は、RNA 干渉 (RNAi) のメカニズムと同様、10 塩基目と 11 塩基目の間で行われます (Elbashir et al., 2001)。一方、動物の miRNA では、これまでに研究されたほぼすべての miRNA において、標的 mRNA に対する完全な相補性は示されていません。標的 mRNA の安定性が維持されながら、タンパク質合成が阻害されるようです (Ambros, 2004)。転写産物が複数の miRNA によって制御されており、個々の miRNA が多数の転写産物を標的としている可能性があることが示唆されています。研究によると、ヒト遺伝子の 3 分の 1 が miRNA によって制御されている可能性があります (Lim et al., 2003)。さまざまな生物で数百もの miRNA が発見されていますが、それらの細胞内機能についてはほとんどわかっていません。miRNA 固有のいくつかの物理的特性 (低分子、ポリアダニル化されたテールの欠如、不完全な配列相同性で標的 mRNA に結合する傾向など) により、miRNA を研究することが困難となっています。miRNA 解析の詳細については、thermofisher.com/mirna をご覧ください。

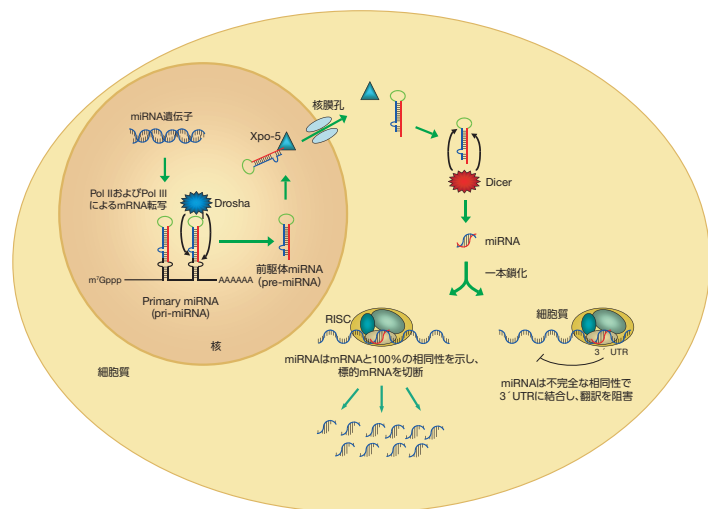


図 5.9: miRNA の生合成と機能。RNA ポリメラーゼ II および RNA ポリメラーゼ III によって生成された microRNA 転写産物は、RNase III 酵素の Drosha (核内) と Dicer (細胞質内) によってプロセッシングされ、19 ~ 22 ヌクレオチドの二本鎖 miRNA が生じます。この二本鎖のうち一方の鎖は、タンパク質発現を調節する RISC 複合体に組み込まれます。

RNAi とノンコーディング RNA の研究 (続き)

RNAi 法の選択 RNAi のプロセスは、siRNA または miRNA によって調整することができます。siRNA と miRNA は両方とも、Dicer と呼ばれる酵素によって細胞内でプロセシングされ、RISC (RNA 誘導サイレンシング複合体) と呼ばれる複合体に組み込まれます。しかし、siRNA と miRNA にはわずかに違いがあります。

siRNA は、化学合成されてから細胞に直接導入されるか、siRNA の前駆体である低分子ヘアピン RNA (shRNA) を発現するベクターが導入されることによって細胞内で産生される外来二本鎖 RNA です。一方、miRNA は、大きな RNA 分子のイントロン内に存在する内在性ノンコーディング RNA から生成される一本鎖 RNA です。ただし、shRNA から機能性 siRNA へのプロセシングは、ゲノムにコードされた miRNA が自然にプロセシングされる細胞内 RNAi 機構と同じ機構で行われます。この機構は、mRNA の安定性、翻訳、クロマチン構造を調節するものであるため、遺伝子発現の細胞内調節に重要な役割を果たしています (Hutvagner and Zamore, 2002)。

siRNA と miRNA の他の違いとして、siRNA は通常、動物の標的 mRNA に完全かつ特異的に結合するのにに対し、miRNA は相補性が不完全であることから、多くの異なる mRNA 配列の翻訳を阻害する可能性があります。植物の場合は、miRNA がより相補的な配列を持つ傾向があるため、翻訳が抑制されるだけでなく、mRNA 切断が誘導されます。

siRNA と miRNA はいずれも、RNA 誘導転写サイレンシング (RITS) と呼ばれるプロセスを介してエピジェネティクスに関与している可能性があります。また、siRNA と miRNA はいずれも、遺伝子発現を制御する役割を果たしていることから、治療用途の重要なターゲットでもあります。

	siRNA	miRNA
発生	植物および下等動物で自然発生します。哺乳類で自然発生するかどうかは解明されていません。	植物および動物で自然発生します。
構造	二本鎖	一本鎖
鎖長	21 ~ 22 nt	19 ~ 25 nt
標的 mRNA に対する相補性	100% 完全に一致します。そのため、オフターゲット効果による例外は少しあるものの、特異的な遺伝子がノックダウンされます。	正確ではありません。1つの miRNA が最大数百個の mRNA を標的とする場合があります。
生合成	siRNA を発現する遺伝子を調節します。	miRNA を作製することを目的とした遺伝子によって発現されますが、miRNA を発現する遺伝子以外の遺伝子 (mRNA) を調節します。
作用	mRNA の切断	mRNA の翻訳阻害
機能	抗体や細胞媒介性免疫を持たない植物および動物において、遺伝子サイレンシングの守護者として機能します。	遺伝子 (mRNA) の調節因子 (阻害剤) として機能します。
用途	siRNA は、遺伝子をノックダウンする上で有用なツールであり、ほぼすべての分子生物学研究室で使用されています。いくつかの siRNA が、有望な治療薬として臨床試験中です。	創薬ターゲットとして、または治療薬として、治療用途に使用できる可能性があります。miRNA の発現レベルを診断ツールやバイオマーカーツールとして利用することができます。

※表はMack, 2007より引用

6. トランスフェクション法

このセクションでは、プラスミド DNA、オリゴヌクレオチド、RNA を用いた細胞のトランスフェクション、*in vitro* および *in vivo* のトランスフェクションに用いる培養物の調製、トランスフェクションされた細胞の選択に関して、有用な情報と一般的なガイドラインを記載しています。



トランスフェクション実験は、基本的な部分でいくつかの共通点があるものの、トランスフェクションに使用する細胞型によって実験条件が大きく異なることに注意してください。そのため、取り扱う細胞株と適切なトランスフェクション法に精通し、実験に使用する各製品に付属の説明書に厳密に従うことをお勧めします。

トランスフェクション効率に影響を与える要因

トランスフェクションの成功には多くの要素が影響します。トランスフェクション法の選択、細胞株の健全性と生存率、継代数、コンフルエントの達成度、使用する核酸の質と量、培地中の血清の有無、これらすべてがトランスフェクション実験の結果に関与する可能性があります。特定のトランスフェクション条件を最適化して高いトランスフェクション効率を達成することは可能ですが、使用するトランスフェクション法にかかわらず、一部の細胞死は避けられないことを留意しておくことは重要です。

細胞型 どの細胞型をトランスフェクション実験に使用するかの選択はわかりきったことのように見えますが、見落とされがちな重要な要素です。各細胞型は、任意のトランスフェクション試薬またはトランスフェクション法に対して異なる反応を示す可能性があります。そのため、最大限の結果を得るためには、適切な細胞型と適切な実験デザインを選択する必要があります。

樹立された不死化細胞株は実験室での作業が容易ですが、複数の遺伝的変化を受けているため、*in vivo* プロセスのモデリングには最適の選択肢ではない場合があります。しかし、トランスフェクション実験の目的が組み換えタンパク質の高濃度産生である場合は、適切なフォールディングと翻訳後修飾が行われた組み換えタンパク質を細胞株が十分な量発現できる限り、細胞株が *in vivo* の状態を表すことは重要ではありません。たとえば、浮遊培養に適応させた Expi293F 細胞を Expi293 Expression Medium で増殖させて、一過性トランスフェクションを行うと、目的のベクターから適切にフォールディングおよび糖鎖修飾された組み換えタンパク質を最大 1 g/L 生産できます。

一方、初代培養は自然に存在する組織をより忠実に模倣しているため、よく使用されます。しかし、初代培養は一般的に増殖能および寿命が限られており、培養を維持することがより困難です。初代培養を使用する際は、ほぼ均一に細胞集団を維持した（たとえば、ニューロン培養ではニューロンを集積させグリア細胞を抑制する必要があります）、できる限り早く細胞を使用することが重要です。

トランスフェクション効率に影響を与える要因 (続き)

また、トランスフェクション実験をデザインするときには、細胞型の生物学的特性も考慮する必要があります。たとえば、一部のプロモーターには、細胞型に応じて異なる機能を発揮するものもあります。また、一部の細胞型には、特定のトランスフェクション技術にあまり適していないものもあります。

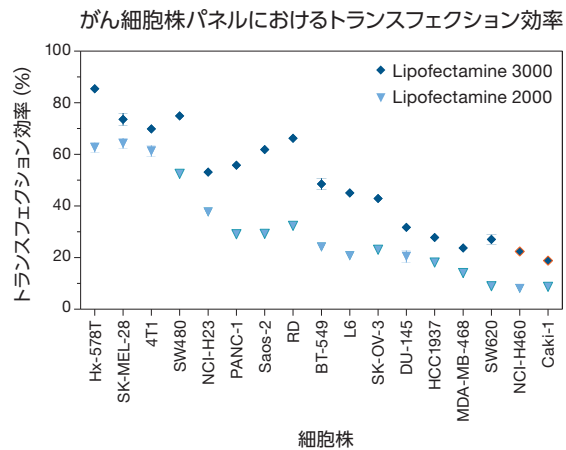


図 6.1：細胞株によるトランスフェクション効率の違い。Lipofectamine 2000 試薬および Lipofectamine 3000 試薬を用いて、24 ウェルプレートで 17 種の細胞株に GFP 発現プラスミドをトランスフェクションしました (0.5 μ g プラスミド/ウェル、各試薬の推奨プロトコルを使用)。トランスフェクションから 48 時間後に GFP 発現を解析しました。各条件を 3 回試験しました。データポイントは、平均トランスフェクション効率を示しています。

細胞の健全性および生存率

トランスフェクション前における細胞の生存率と全体的な健全性は、トランスフェクション間のばらつきの重大な原因として知られています。一般的に細胞は、トランスフェクション前の生存率が 90% 以上で、継代から回復するために十分な時間が設けられている必要があります。細胞が継代操作から回復し、トランスフェクションに最適な生理学的状態になるように、トランスフェクションの 24 時間以上前に細胞を継代することを強くお勧めします。

不死化細胞株の細胞培養物は、研究室で数カ月から数年をかけて進化するため、トランスフェクションに関する細胞の挙動が変化します。過剰な継代は、トランスフェクション効率だけでなく、細胞集団全体における導入遺伝子の全発現レベルに悪影響を及ぼす可能性があります。一般的には、ストック培養物を解凍してから継代を行った数が 30 回未満の細胞を使用することをお勧めします。トランスフェクション実験では、新しいバイアルの凍結細胞を解凍し、継代数が少ない培養物を樹立することで、トランスフェクション活性を回復させることができます。最適な再現性を得るため、継代数が少ない細胞のアリコートを凍結保存し、必要に応じて解凍することもできます。新しいバイアルの細胞を解凍した後は、3～4 回の継代が可能です。

汚染が存在するとトランスフェクションの結果が大幅に変わる可能性があるため、細胞培養物および培地に生物学的汚染（「生物学的汚染」(ページ 15) を参照) がないかを日常的に検査する必要があります。汚染された培養物および培地をトランスフェクションに使用してはなりません。細胞が汚染されていたり、細胞の健全性が多少なりとも損なわれていたりした場合は、その細胞を廃棄し、汚染されていない凍結ストックから再度播種する必要があります。

細胞密度 最適なトランスフェクション結果を得るためには、次の継代前にほぼコンフルエントに達することができる希釈率で、通常の継代手順を週に1～2回行ってください。細胞を24時間を超えてコンフルエント状態にしないでください。

トランスフェクションに最適な細胞密度は、細胞型、用途、トランスフェクション技術によって異なるため、新しい細胞株をトランスフェクションするたびに決定する必要があります。実験ごとに標準的な播種プロトコルを作成しておく、トランスフェクション時に最適なコンフルエント状態を確実に達成することができます。カチオン性脂質媒介性トランスフェクションでは通常、トランスフェクション時に、接着細胞で70～90%コンフルエント状態、浮遊細胞で細胞 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mLにおいて良好な結果が得られます。

細胞が、トランスフェクション時にコンフルエント状態や静止期になっていないことを確認してください。活発に分裂している細胞は、静止細胞と比較して、外来核酸をよく取り込むためです。細胞の密度が高すぎると接触阻害が起こり、核酸の取り込みが不十分になったり、トランスフェクションされた遺伝子の発現が低下したりする可能性があります。しかし、培養中の細胞が少なすぎると、細胞間接触がないことで、増殖が不十分になる可能性があります。このような場合は、培養中の細胞数を増加させるとトランスフェクション効率が改善されます。

同様に、活発に分裂している細胞株は、ウイルスベクターを用いることでより効率的に形質導入できます。非分裂細胞型にウイルスコンストラクトを形質導入する際は、最適な形質導入効率を達成し、組み換えタンパク質の発現レベルを増加させるために、MOI（感染多重度）を増やす必要がある場合があります。

培地 それぞれの細胞または細胞型には、培地、血清、サプリメントに関して非常に特異的な要件があります。そのため、トランスフェクション実験においては、細胞型およびトランスフェクション法にもっとも適した培地を選択することがきわめて重要となります。特定の細胞型およびトランスフェクション法に適した培地を選択するための情報については、通常は文献を参照することができます。細胞の供給者や細胞バンクから情報が得られる場合もあります。使用している細胞型に適した培地に関する情報が得られない場合は、経験的に決定する必要があります。

主要な成分や必要なサプリメントを欠く培地を使用すると、細胞の成長が阻害される可能性があるため、特に培地中のいずれかの成分が不安定である場合には、新しい培地を使用することが重要です。

細胞培養培地に関する情報については、「一般的な細胞株に推奨される培地」（ページ32）、または当社のウェブサイト (thermofisher.com/media) をご覧ください。一部の細胞株および初代細胞においては、培養プレートに接着させ最適なトランスフェクション結果を得るために、特別なコーティング物質（ポリリジン、コラーゲン、フィブロネクチンなど）が必要になる場合があります。

トランスフェクション効率に影響を与える要因 (続き)

血清 一般的に、培養培地中に血清が存在すると、DNA のトランスフェクションが促進されます。ただし、カチオン性脂質媒介性トランスフェクションを実施する際は、血清非存在下で DNA-脂質複合体を形成させることが重要です。血清タンパク質の中には、DNA-脂質複合体の形成を妨げるものがあるためです。カチオン性脂質試薬および DNA の最適量は、血清存在下で変化する可能性があることに注意してください。したがって、血清を含むトランスフェクション培地を使用する場合には、トランスフェクション条件を最適化する必要があります。

細胞に RNA をトランスフェクションする場合は、RNase の混入を防止するために、血清の非存在下でトランスフェクション手順を実施することをお勧めします。無血清培地中では、ほとんどの細胞において数時間健全性が保たれます。

血清の品質は、細胞増殖とトランスフェクションの結果に大きく影響する可能性があります。したがって、最良の結果を得るためには、血清における異なるブランド間または異なるロット間のばらつきを制御することが重要です。使用している細胞で血清を試験した後は、結果のばらつきを避けるために同じ血清を使用し続けてください。当社の製品 (血清を含む) は、汚染の有無が試験されており、品質、安全性、一貫性、ならびに規制への準拠が確保されています。

抗生物質 一般的に、一過性トランスフェクションの培地には抗生物質が存在する可能性があります。しかし、カチオン性脂質試薬によって細胞透過性が高まり、細胞に送達される抗生物質の量が増えることで、細胞毒性が生じ、トランスフェクション効率が低下する場合があります。したがって、トランスフェクション培地に抗生物質を添加することはお勧めしません。トランスフェクションにおいて、細胞を播種する際に抗生物質を使用しないことで、トランスフェクション前に細胞を洗浄する必要性も低減します。

安定トランスフェクションでは、選択培地にペニシリンおよびストレプトマイシンを使用しないでください。これらの抗生物質は、Geneticin 選択抗生物質の競合阻害剤であるためです。安定細胞株を作製する際は、選択抗生物質を添加する前に細胞で耐性遺伝子が発現されているようにするため、トランスフェクション手順後 48 ~ 72 時間待ってください。

無血清培地を使用する場合は、細胞の健全性を維持するため、血清含有培地で使用するよりも少ない量の抗生物質を使用してください。

トランスフェクションする分子のタイプ

プラスミド DNA は、トランスフェクションにもっともよく使用されるベクターです。プラスミド DNA ベクターの形態（直鎖状またはスーパーコイル状）とサイズは、トランスフェクション効率に影響します。一過性トランスフェクションでは、スーパーコイル状プラスミド DNA を使用するのがもっとも効率的です。安定トランスフェクションで直鎖状 DNA を使用すると、スーパーコイル状 DNA に比べて細胞への DNA 取り込み量が少ないですが、宿主ゲノムへの DNA 組み込みが最適となります。

オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、タンパク質など、他の高分子も細胞にトランスフェクションできますが、そのときには、プラスミド DNA が機能する条件を最適化する必要があります。

トランスフェクション法

核酸を細胞に導入するための戦略は数多く存在し、さまざまな生物学的方法、化学的方法、物理的方法が用いられます。ただし、こうした方法のすべてが、あらゆるタイプの細胞や実験用途に適用できるわけではありません。トランスフェクション効率、細胞毒性、正常な生理機能への影響、遺伝子発現レベルなどに応じて、幅広いバリエーションが存在します。理想的なアプローチは、細胞型および実験のニーズに応じて選択する必要があり、トランスフェクション効率が高く、細胞毒性が低く、正常な生理機能への影響が最小限で、使用しやすく、再現性が高い必要があります。さまざまなトランスフェクション法の概要および比較については、「遺伝子導入技術」（ページ 53）を参照してください。

トランスフェクション法の選択 (非ウイルス性)

トランスフェクション法を選択する際は、導入分子 (DNA、RNA、タンパク質) とトランスフェクションする細胞型を考慮する必要があります。以下の表を参照して、さまざまなカチオン性脂質トランスフェクション試薬と当社から入手可能な Neon Transfection System のいずれかを選択してください。各トランスフェクション法の詳細や、さまざまな細胞株のトランスフェクションに最適化されたプロトコルの詳細については、thermofisher.com/transfection をご覧ください。

不死化細胞株 不死化細胞株は無限の増殖能を有しているため、一般的に初代細胞や有限寿命細胞よりも培養が簡単です。しかし、不死化細胞は不死化するために形質転換を受けているため、培養時の挙動が *in vivo* の状況を必ずしも反映しているわけではありません。

トランスフェクション法	ペイロード	接着細胞		浮遊細胞
		トランスフェクションが容易	トランスフェクションが困難	
Lipofectamine 3000 試薬	   	••••	••••	••
Lipofectamine 2000 試薬	   	•••	••	•
Lipofectamine RNAiMAX 試薬	 	••••	••••	••
Lipofectamine CRISPRMAX 試薬		••••	•••	••
Lipofectamine MessengerMAX 試薬		••••	••••	
InvivoFectamine 3.0 試薬	 	該当せず	該当せず	<i>In vivo</i>
Neon エレクトロポレーション	   	••••	••••	••••

凡例

記号	説明	記号	説明	記号	説明
	タンパク質、shRNA、miRNA の発現に用いるプラスミド DNA		タンパク質の発現に用いる mRNA		遺伝子発現の RNAi に用いるノンコーディング RNA
	RNAi ベクターと siRNA を同時にトランスフェクションするための同時導入		タンパク質の導入に用いる CRISPR-Cas9		



初代細胞と有限寿命培養

初代細胞は、組織から直接分離し、適切な条件下で増殖させたものです。そのため、その形態と生理機能は *in vivo* の状態により似ています。ただし、一般的には、培養やトランスフェクションが不死化細胞株よりも困難です。

最初の継代培養後、初代培養は細胞株と呼ばれるようになります。初代培養に由来する細胞株は寿命が限られています（有限寿命）。継代培養されることで、もっとも高い増殖能力を持つ細胞が優勢になり、集団内で遺伝子型および表現型の均一性がある程度得られます。そのため、この表現型は初代細胞培養と連続培養の間にあると言えます。このような細胞は、安定的にトランスフェクションされたクローンを生成するには特に、初代細胞よりも使いやすい場合があります。

トランスフェクション法	ペイロード	神経細胞	幹細胞	血球	その他
Lipofectamine 3000 試薬	
Lipofectamine 2000 試薬	
Lipofectamine RNAiMAX 試薬	
Lipofectamine CRISPRMAX		
Lipofectamine MessengerMAX 試薬	
InvivoFectamine 3.0 試薬		該当せず	該当せず	<i>in vivo</i>	
Neon エレクトロポレーション	

凡例

記号	説明	記号	説明	記号	説明
	タンパク質、shRNA、miRNA の発現に用いるプラスミド DNA		タンパク質の発現に用いる mRNA		遺伝子発現の RNAi に用いる ノンコーディング RNA
	RNAi ベクターと siRNA を同時にトランスフェクションするための同時導入		タンパク質の導入に用いる CRISPR-Cas9		

ウイルス DNA 導入システムの選択

特定のニーズに合ったウイルス導入システムを選択する際には、多くの選択肢があります。当社は、タンパク質発現や RNAi の研究用に、哺乳類細胞および昆虫細胞に核酸を導入するためのさまざまなウイルスベクターシステムを提供しています。

哺乳類細胞での発現

Invitrogen™ ViraPower™ 発現システムは、複製能のないウイルス粒子を使用して、発現コンストラクトを安全かつ高効率に導入し、哺乳類細胞型において高レベルの構成的発現または誘導的発現を実現するシステムです。ViraPower システムでは数多くのベクターを利用できるため、クローニング方法 (Invitrogen™ TOPO™ または Invitrogen™ Gateway™ クローニング、または Invitrogen™ GeneArt™ 遺伝子アセンブリ) およびプロモーターの選択 (恒常または誘導的) において、さまざまな選択肢が得られ、細胞株や動物モデルごとに実験を最適化することができます。

- Invitrogen™ ViraPower™ レンチウイルス発現キットは、分裂細胞および非分裂細胞 (幹細胞、初代神経細胞など) での安定したタンパク質発現を可能にし、長期的な遺伝子発現の解析や機能分析研究に最適です。
- Invitrogen™ ViraPower™ HiPerform™ レンチウイルス発現キットは、HIV-1 インテグラーゼ遺伝子のウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子 (WPRE) とセントラルポリプリン配列 (cPPT) をウイルスベクターに含めることで、既存のレンチウイルスキットから改善されており、発現量や宿主ゲノムへのレンチウイルス組み込み量が増加しています。キットには 2 つのバージョンがあります: 1 細胞あたりのコピー数を正確に制御できる高精度力価測定キットと、高スループットスクリーニング研究に最適な高速力価測定キットです。
- Invitrogen™ ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway™ Vector Kit は、ViraPower HiPerform および Invitrogen™ T-REx™ のレンチウイルステクノロジーと Gateway クローニング技術を組み合わせることで、分裂哺乳類細胞または非分裂哺乳類細胞の標的遺伝子におけるレンチウイルスベースの制御された高レベルの発現を促進します。このキットには、2 つの pLenti ベースの発現ベクターが含まれています。1 つは目的の遺伝子を誘導的に発現し、もう 1 つは Tet リプレッサーおよびコントロールベクターを発現します。
- Invitrogen™ ViraPower™ Adenoviral Gateway™ Expression Kit は、タンパク質生産に最適なキットです。このキットを使用することで、分裂哺乳類細胞および非分裂哺乳類細胞におけるサイトメガロウイルス (CMV) または選択した別のプロモーターからの高レベル一過性遺伝子発現が可能になります。Invitrogen™ ViraPower™ Adenoviral システムは、Gateway 技術を用いて目的の遺伝子を迅速、簡単、正確にクローニングできるシステムです。

ViraPower 発現システムの詳細や、ここで説明されていない他の発現システムの詳細については、thermofisher.com/proteinexpression をご覧ください。

ウイルスシステム	一過性発現		安定発現			
	分裂細胞	非分裂細胞	分裂細胞	神経細胞	非増殖細胞	接触阻害細胞
アデノウイルス	•	•				
レトロウイルス	•		•			
レンチウイルス	•	•	•	•	•	•

プラスミド DNA トランスフェクションのガイドライン

従来のトランスフェクション技術は、当初、プラスミド DNA を細胞に導入するために開発されました。プラスミド DNA は現在でも、トランスフェクションにもっとも一般的に使用されるベクターです。組み換え遺伝子および調節因子が含まれる DNA プラスミドを細胞に導入することにより、遺伝子の機能と調節、遺伝子産物の変異解析および生物学的特徴、遺伝子発現が細胞の健全性やライフサイクルに与える影響を調べることができるとともに、精製などのダウンストリームアプリケーションに向けたタンパク質の大量生産が可能です。

ベクターコンストラクトの形態（直鎖状またはスーパーコイル状）とサイズ、プラスミド DNA の品質、ならびにプロモーターの選択は、プラスミド DNA のトランスフェクション効率に影響を与える主要な要素です。

ベクターで考慮すべきこと

一過性トランスフェクションには、直鎖状 DNA よりも高スーパーコイル状 DNA を使用した方がより効率的です。直鎖状 DNA フラグメントはエキソヌクレアーゼによってすぐに分解されるのに対し、環状 DNA はエキソヌクレアーゼの影響を受けにくいと考えられるためです (McLenachan et al., 2007; von Groll et al., 2006)。また、原子間力顕微鏡解析では、環状 DNA と直鎖状 DNA の形態の違いによって、カチオン性脂質試薬との複合体形成パターンが非常に異なることが示されています。つまり、環状 DNA ではコンパクトな球状または円柱状の縮合物が観察されるのに対し、直鎖状プラスミドでは真珠のネックレスのような伸長した構造が観察されます。よりコンパクトなサイズの環状プラスミドにおけるカチオン性脂質媒介性トランスフェクションでは、エンドサイトーシス経路に侵入する可能性が高いですが、伸長した直鎖状 DNA 構造では、侵入経路がかなり異なり、効率が低くなる可能性があります (von Groll et al., 2006)。

直鎖状 DNA を使用する際は、宿主ゲノムへの組み込みが最適な安定トランスフェクションがより効率的です。自由端を持つ直鎖状 DNA は、より組み換えが誘導され、宿主染色体に組み込まれやすいため、細胞への取り込み効率が低くても安定な形質転換体を生じます。

カチオン性脂質媒介性トランスフェクションにおける取り込み効率が同程度であっても、サイズが大きなプラスミドの核への導入効率は小さなプラスミドよりも低下します。この現象は、質量またはモル濃度が等しく、サイズが異なるコンストラクトを用いた場合に観察されます。このことは、プラスミドの核への導入が細胞内移行速度によって制限されている可能性があり、小さなプラスミドが細胞防御を突破するのではなく、細胞質内にすばやく移行することで分解を回避していることを示唆しています (Lukacs, et al., 2000; McLenachan et al., 2007)。

プラスミド DNA の品質

プラスミド DNA の純度と品質は、トランスフェクションの成功に欠かせません。最良の結果を得るためには、フェノール、塩化ナトリウム、エンドトキシンを含まない最高純度のプラスミド DNA が必要です。汚染物質があると、細胞が死滅し、塩が脂質複合体の形成を阻害することで、トランスフェクション効率が低下します。エンドトキシン（リポ多糖としても知られています）は、プラスミド調製の溶解ステップ中に放出され、多くの場合、プラスミド DNA とともに共精製されます。エンドトキシンが存在すると、初代細胞などの感受性の高い細胞におけるトランスフェクション効率が急激に低下します。高品質の DNA トランスフェクションを実現する Invitrogen™ PureLink™ HiPure

プラスミド DNA トランスフェクションのガイドライン (続き)

Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi, Mega, Giga) を使用して、DNA を分離することをお勧めします。詳細については、thermofisher.com/nap をご覧ください。塩化セシウム密度勾配遠心法で生じたバンドを分離することによっても高純度 DNA が得られますが、このプロセスは手間と時間を費します。DNA-脂質複合体や DNA 溶液を過剰にボルテックスすると、特に大きな分子の場合は、部分的にせん断される可能性があるため、トランスフェクション効率が低下します。希釈済みの DNA における EDTA 濃度は、0.3 mM を超えてはなりません。

遺伝子産物とプロモーター

プロモーターは、宿主細胞株、発現させるタンパク質、希望する発現レベルに応じて選択します。多くの研究者は、幅広い細胞型でもっとも高い発現活性を示す強力な CMV プロモーターを用いています。哺乳類細胞でタンパク質を高発現させる他の強力なプロモーターとしては、ヒト伸長因子 1 α (EF-1 α) があります。しかし、強力すぎるプロモーターを使用すると、毒性遺伝子の発現が促進される可能性があるため、プラスミド DNA の一過性トランスフェクションにおいて問題が生じるおそれがあります。毒性遺伝子産物が発現する可能性がある場合は、弱いプロモーターの使用をお勧めします。

毒性遺伝子産物は、安定的にトランスフェクションされた細胞を選択する際にも問題となります。抗生物質耐性遺伝子を発現する細胞は、こうした遺伝子の発現がトランスフェクションされた細胞の健全性に有害である場合、増殖優位性を失います。これにより、構成的プロモーターを用いて安定的にトランスフェクションされたクローンを獲得することが不可能となります。そのような場合では、誘導性プロモーターを用いて遺伝子発現のタイミングをコントロールすることができます。これにより、安定なトランスフェクタントを選択することが可能です。通常、誘導性プロモーターが機能するためにはインデューサー分子 (金属イオン、代謝産物、ホルモンなど) の存在が必要ですが、一部の誘導性プロモーターでは、特定の分子が存在していない状態でも遺伝子発現が誘導されます。

細胞型特異的プロモーター (昆虫細胞発現のためのポリヘドリンプロモーターなど) も一般的です。細胞株や用途に最適なプロモーターを決定する際には、文献検索が最適なツールです。

コントロール

使用するトランスフェクション法にかかわらず、細胞の健全性を確認するためにコントロールトランスフェクションを実施すること、レポーターアッセイが適切に機能しているかどうかを判定すること、インサート関連の問題を明らかにすることが重要です。最適な細胞増殖条件を確認するためには、ネガティブコントロール (DNA なし、トランスフェクション試薬なし) を含めます。レポーターアッセイが適切に機能していることを確認するためには、ポジティブコントロール (確立されたトランスフェクション法での並行トランスフェクション) を含めます。インサート関連の問題があるかどうかを判断するためには、目的の遺伝子のないプラスミドでトランスフェクションします。

プラスミド DNA トランスフェクションの最適化

どのトランスフェクション手順においても不可欠な最初のステップは、トランスフェクション条件の最適化です。それぞれの細胞型およびトランスフェクション手順には、外来 DNA を最適に導入するための特殊な一連の要件があります。これらの要件は、非常に類似した細胞型間であっても大きく変動します。

トランスフェクション効率を最適化する際にもっとも重要な要素は、細胞型に適切なトランスフェクションプロトコルを選択することです。適切なトランスフェクション法を選択したら、一過性レポーターアッセイシステムにより、さまざまな条件下でレポーター遺伝子を導入し、レポーター遺伝子産物のアッセイによりトランスフェクション効率をモニタリングすることで、手順を最適化できます。

このセクションでは、リン酸カルシウム法による遺伝子導入、Neon Transfection System を用いたエレクトロポレーション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクションを最適化するための一般的なガイドラインを紹介します。

リン酸カルシウム共沈殿法で考慮すべきこと

リン酸カルシウム法によるトランスフェクションの効率に影響を及ぼす主要な要素は、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿物に含まれる DNA 量、細胞を共沈殿物とインキュベーションする時間の長さ、グリセロールショックまたは DMSO ショックの使用と処理時間の長さです。

通常、リン酸カルシウム法によるトランスフェクションで用いられる総 DNA 量は、10 cm ディッシュ 1 枚あたり、450 μ L の滅菌水と 50 μ L の 2.5 M CaCl_2 に 10 ~ 50 μ g ですが、プラスミド調製法、細胞、培地によって大きく変動します。10 ~ 15 μ g の DNA を 10 cm ディッシュに添加した場合に、過度の細胞死が生じて DNA がほとんど取り込まれない細胞株もあれば、非常に高い DNA 濃度が必要とされる細胞株もあります (特に初代細胞)。そのため、新しいプラスミド調製法や新しい細胞株をトランスフェクションに用いるたびに、最適な DNA 濃度を試験する必要があります。

細胞を共沈殿物とインキュベーションする最適な時間の長さも、細胞型によって異なります。HeLa、NIH 3T3、BALB/c 3T3 など一部の頑強な細胞型は、共沈殿物を最大 16 時間放置することで、感受性の高い細胞がさらに死滅する可能性があるため、効率的にトランスフェクションされます。

DNA 量、インキュベーション時間、グリセロールショックまたは DMSO ショックの処理時間を変化させたパイロット実験を行うことで、細胞型がリン酸カルシウム沈殿物への長時間曝露に耐性があるかどうか、グリセロールショックを使用すべきかどうかかわかります。パイロット実験の結果が得られたら、実験の変数をさらに調節することで、さらなる最適化が可能です。たとえば、下表の例のように、細胞を 10% グリセロールで 3 分間ショック処理すると、トランスフェクション効率が向上します。グリセロールショックの処理時間を変化させた実験や、10 ~ 20% DMSO ショックを用いた実験を試みることもできます。

プラスミド DNA トランスフェクションの最適化 (続き)

ディッシュ (10 cm)	レポータープラスミド (μg)	インキュベーション (時間)	グリセロールショック (分)
1	5	6	—
2	10	6	—
3	15	6	—
4	20	16	—
5	25	16	—
6	30	16	—
7	5	6	3
8	10	6	3
9	15	6	3
10	20	16	3
11	25	16	3
12	30	16	3

図 6.2: リン酸カルシウム共沈殿法によるトランスフェクションの最適化を目的としたパイロット実験の例

カチオン性脂質による導入で考慮すべきこと

カチオン性リポソームによる DNA トランスフェクションの成功には、DNA 量、DNA に対するトランスフェクション試薬の比率、脂質-DNA 複合体のインキュベーション時間、複合体添加時の細胞密度といった 4 つの主要なパラメーターが影響します。これらの要素は、細胞型とベクターの組み合わせごとに体系的に検討する必要があります。いったん最適化したら、それ以降のすべての実験においては、再現性のある結果が得られるように、一貫性を維持する必要があります。

最良の結果を得るには、該当する試薬のメーカーが提供する最適化プロトコルに従ってください。当社は、当社のすべてのトランスフェクション試薬について最適化プロトコルを提供しています。詳細については、thermofisher.com/transfection をご覧ください。

DNA量

DNA の最適量は、トランスフェクションされたプラスミドの特性 (プロモーター、プラスミドのサイズ、複製起点など)、トランスフェクションされる細胞の数、培養ディッシュのサイズ、使用されるターゲット細胞株によって異なります。試験を行った細胞型の多くで、比較的少量の DNA が効率的に取り込まれ、発現されています。実際、一部の細胞型では、高レベルの DNA 量が特定のカチオン性脂質調製物に対して阻害活性を示す可能性があります。また、毒性タンパク質をコードするプラスミドを使用したり、高発現率のプラスミドを過剰に使用したりした場合は、細胞毒性が生じる可能性があります。

DNAに対するトランスフェクション試薬の比率

トランスフェクション複合体の全電荷は、DNA に対するトランスフェクション試薬の比率によって決定されます。複合体を良好に形成するとともに、負に荷電している細胞膜によって DNA 上に付与された静電反発力を中和するためには、DNA 骨格中のリン酸塩由来の負電荷を、トランスフェクション試薬由来の正電荷で相殺する必要があります。

DNA に対するトランスフェクション試薬の最適な比率は、細胞型によって大きく異なります。プラスミド DNA 濃度を一定に保ちながら、開始時点におけるトランスフェクション試薬の量を変化させる必要があります（体積と質量の比 1 : 1、3 : 1、5 : 1 など）。この比率を維持して、添加するプラスミド量を増加させることによって、さらなるメリットが得られる可能性があります。

インキュベーション時間

トランスフェクション複合体を添加した細胞の最適なインキュベーション時間は、細胞株と使用したトランスフェクション試薬によって異なります。通常、脂質試薬-DNA 複合体への曝露時間に伴ってトランスフェクション効率が増加しますが、特定の脂質試薬に長時間曝露されると毒性状態が生じる可能性があり、細胞毒性の影響を最小限に抑えるため、インキュベーション時間が終了した後に、遠心分離による除去や新しい培地による希釈が必要となります。しかし、Lipofectamine 3000 試薬などの新しい穏和なトランスフェクション試薬では、トランスフェクション後に複合体を除去したり希釈したりする必要はありません（詳細については、thermofisher.com/3000 をご覧ください）。

培地の添加や置換が必要なカチオン性脂質試薬を使用する場合は、複合体添加後のインキュベーション時間を変化させて（30 分～4 時間、一晩など）、インターバルごとに細胞の形態を観察してください。特に、細胞を無血清培地で維持している場合は、こうした条件で一部の細胞株の生存能が失われるため、この操作を行ってください。

細胞密度

細胞密度も全体のトランスフェクション効率に影響します。転写および最終的にタンパク質生産を達成するためには、DNA の核内への蓄積が必要とされます。これは、有糸分裂中における核膜の分解と再形成に大きく依存しており、細胞が活発に分裂することが必要とされます。

接着細胞における最高効率は、多くの場合 80% のコンフルエント状態で得られますが、プロトコルで 40 ~ 90% のコンフルエント状態が推奨される場合があります。浮遊細胞の場合は、細胞がトランスフェクション手順に最適な生理学的状態になるように、トランスフェクションの前日に細胞を分割することをお勧めします。最適な細胞密度は、細胞型と試薬固有の毒性によって大きく異なるため、経験的に決定する必要があります。

プラスミド DNA トランスフェクションの最適化 (続き)

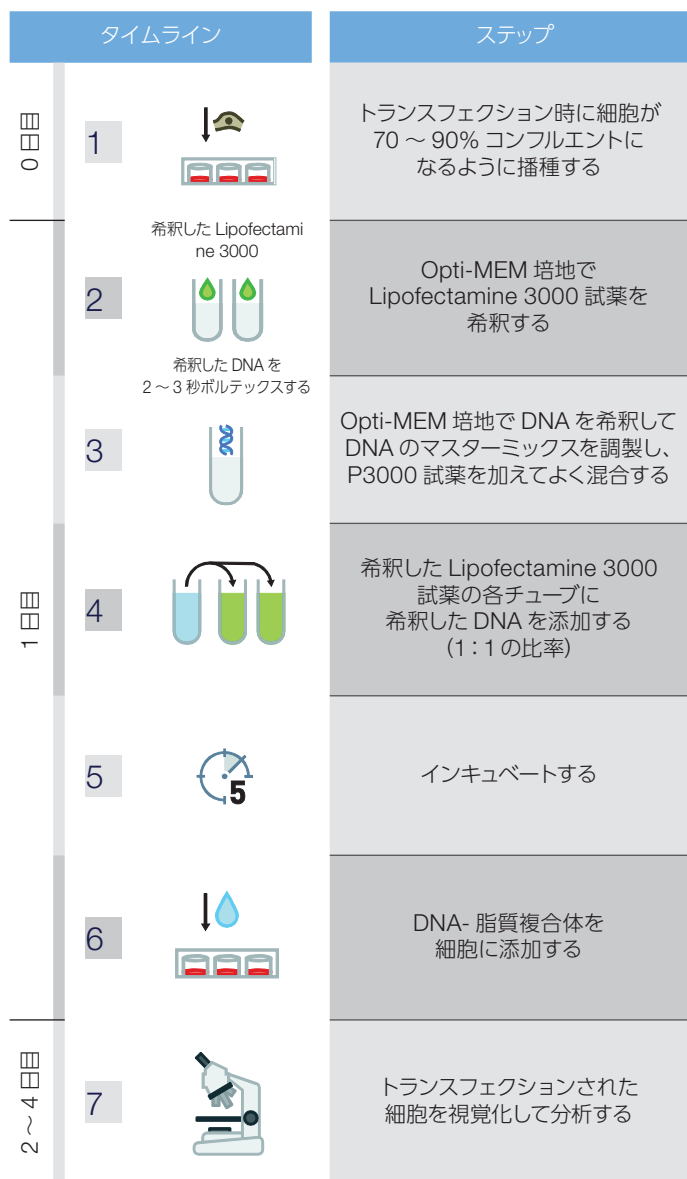


図 6.3 : Lipofectamine 3000 Transfection Reagent を用いたトランスフェクションワークフローの例

エレクトロポレーションで考慮すべきこと

エレクトロポレーションは、主にパルス電圧、パルス幅、パルス数という3種類の電気的パラメーターの組み合わせによって変化します。エレクトロポレーションは化学的なプロトコルではないためか、DNA濃度の影響をあまり受けません。しかし、リン酸カルシウム法によるトランスフェクションと比較して、ほぼ5倍の細胞とDNAが必要とされます。通常、 10^7 個の細胞あたり1～5 μg のDNAがあれば十分で、DNAの存在量と取り込まれる量との間に高い相関があります。

エレクトロポレーションのパラメーターを最適化する目的は、40～80%の細胞生存率を維持するパルスを見つけることです。パルス幅は、電源の静電容量によって決まります。また、パルスを発生する電源の電子回路に応じて、パルス幅がどの程度まで変動する可能性があるかによって決まります。過度の細胞死が生じる場合は、静電容量を低下させることでパルスの長さを短くできます。

細胞を氷上に維持することで、多くの場合（特に熱を発生する可能性がある高出力電源では）、細胞生存率が向上し、効果的なトランスフェクションが行われる頻度が高くなります (Potter et al., 1984)。しかし、一部の細胞株では、低電圧／高静電容量の条件下であっても、室温において高効率なエレクトロポレーションが行えます (Chu et al., 1991)。

Neon Transfection System は、18ウェルおよび24ウェル用に最適化されたプロトコルがあらかじめプログラムされており、数日以内に多数の接着細胞株および浮遊細胞株に対して、電気的パラメーターを迅速に最適化できます。Neon Transfection System用の細胞株別に最適化されたプロトコルも [thermofisher.com/neon](https://www.thermofisher.com/neon) からダウンロードできるため、一般的に使用される多くの細胞型においてトランスフェクション効率を最大化できます。

安定的なトランスフェクタントの選択

安定的にトランスフェクションされた細胞を選択するには、抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーを含むプラスミドによる一過性トランスフェクションの成功が不可欠です。ネガティブコントロールとしては、選択マーカーを含まないDNAを使用して細胞をトランスフェクションする必要があります。

- 準備**
- 使用している細胞株において、単離された細胞からコロニーを生成できることを確認します。一部の細胞は、成長するために互いに接触する必要があるためです。このような細胞の場合は、馴化培地（条件培地）が効果的である可能性があります。
 - 適切な選択マーカーを選択します（「真核生物のための抗生物質の選択」（ページ 71）を参照）。
 - 細胞型に適したトランスフェクション手順を選択します。
 - 用量反応曲線（死滅曲線）を確立することにより、細胞型の選択条件を決定します（Ausubel et al., 1995）。

死滅曲線 死滅曲線は、細胞型ごとに確立する必要があります。また、新しいロットの選択抗生物質を使用するたびに確立する必要があります。

1. ディッシュがコンフルエント状態の細胞を約 1:5 ~ 1:10 の割合（細胞型とトランスフェクション後の細胞密度に応じて変化させます）で、さまざまな濃度の抗生物質を含む培地に分割します。
2. 細胞を 10 日間インキュベートします。選択培地を 4 日ごとに（または必要に応じて）交換してください。
3. 目的の方法（Countess II 自動セルカウンター、トリパンブルー染色による血球計算盤など）を用いて、ディッシュの生細胞を調べます。
4. 生細胞数と抗生物質濃度をプロットして死滅曲線を確認し、トランスフェクションされていない細胞を死滅させるのに必要とされるもっとも適切な選択薬剤濃度を決定します。

選択ワークフロー

1. 目的のトランスフェクション法を用いて細胞をトランスフェクションします。選択マーカーが別のベクター上にある場合は、目的の遺伝子を含むプラスミドと選択マーカーを含むプラスミドのモル比を 5 : 1 ~ 10 : 1 にします。
 - 注：選択マーカーを含むが目的の遺伝子を含まないベクターを用いて、コントロールトランスフェクションを実施してください。コロニーが、対照プラスミドを用いてトランスフェクションされた細胞からは得られるが、目的の遺伝子を含むプラスミドを用いてトランスフェクションされた細胞からは得られない場合は、目的の遺伝子が毒性である可能性があります。トランスフェクションが失敗したり、培養物が汚染されたりした場合に備えて、複製トランスフェクションを実施することも重要です。
2. トランスフェクションの 48 時間後に、適切な選択薬剤を含む培地で細胞をいくつかの異なる希釈率 (1 : 100、1 : 500 など) で継代します。コンフルエント状態で非増殖性の細胞は抗生物質の影響に耐性があるため、効果的な選択を行うには細胞をサブコンフルエント状態にする必要があります。浮遊細胞は、単細胞クローニング用に軟寒天または 96 ウェルプレートで選択を行えます。
3. その後 2 週間、薬剤を含む培地を 3 ~ 4 日ごとに (または必要に応じて) 交換します。
 - 注：浮遊培養で細胞密度が高い場合は、培地交換を頻繁に行う必要があります。行わないと、重要な可溶性増殖因子が枯渇し、細胞の生存率とシステムの効率が低下する可能性があります。
4. 2 週目に、生存細胞で明確な「細胞塊」があるかどうかを観察します。細胞型によって異なりますが、薬剤耐性クローンが 2 ~ 5 週間で出現します。ネガティブコントロールプラスミドを用いてトランスフェクションした培養物では、3 ~ 9 日後に細胞死が発生します。
5. クローニングシリンダーまたは滅菌つまようじを使用して、大型で (500 ~ 1,000 細胞) 健全なコロニーを分離し、適切な薬剤を含む培地で培養物を維持し続けます (浮遊培養におけるクローンの分離については、Freshney, 1993 を参照)。
6. 耐性コロニーから 96 ウェルプレートのウェルに単一細胞を移動して、抗生物質耐性コロニーを生成できることを確認します。移動後、ウェルごとに 1 つの細胞のみが存在することを確認します。

RNAi 法の選択

RNAi 導入の 2 つの一般的なアプローチは、脂質を介したトランスフェクションとウイルスを介した形質導入です。どちらのアプローチを使用するかは、研究対象の細胞型と、一過性ノックダウンと安定性ノックダウンのどちらが望ましいかによって決まります。もっとも一般的な用途である Invitrogen™ *Silencer*™ Select siRNAs または Invitrogen™ *Stealth RNAi*™ siRNA Duplexes の一過性トランスフェクションでは、カチオン性脂質ベースの試薬が使用されます。これは、一般的に使用されるさまざまな細胞株に対して分子を導入するのに適しているためです（「非ベクター siRNA テクノロジー」（ページ 97）を参照）。

脂質媒介性トランスフェクションが適さない細胞型には、ウイルスベクターがよく用いられます（「ベクター媒介 RNAi」（ページ 99）を参照）。アデノウイルスベクターは、多くの細胞型で一過性導入に適しています。ただし、安定した RNAi 発現が望ましい場合、または非分裂細胞などの導入困難な細胞株の場合は、レンチウイルスベクターが最適な導入方法です。もっとも望ましい RNAi 導入条件を決定するための別のアプローチは、当社の導入最適化サービスを使用することです。これは、導入パラメーターのマトリックスを検証するためのウイルスベクターおよび非ウイルス導入試薬に関する幅広い知見と専門知識を備えた科学リソースです。

siRNA アプローチ vs ベクターアプローチ

siRNA とベクターベースの RNAi はどちらも、機能喪失の表現型を生み出すのに非常に効果的である可能性があります。一般に、ほとんどの研究者は siRNA を選択します。siRNA は迅速に開始でき、基本的な細胞培養技術以外には特別な準備が不要であるためです。しかし、研究者が siRNA とベクターベースの RNAi のいずれかを選択する理由はいくつかあります。

通常、研究者は可能な限り最高レベルのトランスフェクション効率を達成できるように努めています。この目的は RNAi 用途にとって特に重要です。トランスフェクションされていない細胞は、ノックダウンの標的となる遺伝子を発現し続け、バックグラウンドの発現レベルに寄与するためです。

多くの疾患モデルにおいて、もっとも望ましい細胞型は初代培養です。ただし、初代培養は、市販のカチオン性脂質媒介性トランスフェクション試薬を用いて適切にトランスフェクションできません。そこで、RNAi 配列を発現するベクターのウイルス導入が、強力な代替手段となります。このオプションは、トランスフェクションが困難な細胞、初代細胞、非分裂細胞への導入に推奨されます。ウイルス導入は、誘導性 RNAi 発現を伴う安定した細胞株を作製したり、組織特異的プロモーターを用いて RNAi 配列を発現させたりするためにも使用できます。

細胞型	一過性発現		安定発現
	(<7 日)	(>7 日)	
迅速に増殖する接着細胞 (A549、HeLa)	<i>Silencer</i> Select siRNA または <i>Stealth RNAi</i> siRNA の脂質トランスフェクション	RNAi ベクターの脂質トランスフェクションまたはアデノウイルス導入	RNAi ベクターの脂質トランスフェクションまたはレンチウイルス導入
迅速に増殖する浮遊細胞 (THP-1)	<i>Silencer</i> Select siRNA または <i>Stealth RNAi</i> siRNA の脂質トランスフェクションまたはエレクトロポレーション	RNAi ベクターの脂質トランスフェクションまたはアデノウイルス導入	RNAi ベクターの脂質トランスフェクションまたはエレクトロポレーション、またはレンチウイルス導入
初代細胞 非分裂細胞	siRNA または RNAi ベクターの脂質トランスフェクション またはエレクトロポレーション		レンチウイルス導入

非ベクター siRNA テクノロジー

一過性ノックダウン実験の場合は、RNAi 導入におけるベクターベースの方法よりも、合成非ベクターのアプローチの方が大きな利点があります。特に、非ベクターによる実験は通常、設計と実施が容易であるため、一過性ノックダウンのレベルが高くなる可能性があります。また、RNAi 設計が最近改善されたことで、少数の RNAi 分子のみを検証した後、高レベルのノックダウンを達成できる可能性が高まりました。したがって、合成的に生成された RNA 二重鎖を使用することが、RNAi 実験でもっとも一般的な方法となっています。

合成 siRNA

哺乳類細胞で遺伝子ノックダウンを行うための従来の RNAi 法では、2 つの未修飾 21-mer オリゴヌクレオチドをアニーリングして短鎖/低分子干渉 RNA (siRNA) を形成する合成 RNA 二重鎖を使用していました。Silencer Select siRNA および Stealth RNAi siRNA では、独自の化学修飾を使用することで従来の二重鎖が改善され、よりよい RNAi 結果が得られます。詳細については、thermofisher.com/sirna をご覧ください。

Silencer siRNA は、RefSeq データベース内にあるヒト、マウス、ラットのすべての遺伝子ターゲットで利用できます。この siRNA は、非常に効果的で広範囲に検証されたアルゴリズムを使用して、最大の効力と特異性が得られるように設計されています。各 siRNA は、最高レベル品質の基準で合成され、完全な配列情報を提供します。

Stealth RNAi siRNA 分子は、化学的に修飾された平滑末端の 25-mer 二本鎖であり、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) によって認識され、標的遺伝子の阻害を媒介します。独自の化学修飾により、Stealth RNAi siRNA は *in vivo* 固有の多くの障害を克服することができ、*in vivo* 用途での有効性と安定性が実現されます。

Silencer Select siRNA は、*in vitro* 研究に最適な siRNA です。準備されたコレクションやカスタムライブラリなどのさまざまな形式で利用でき、スクリーニング実験を簡素化できます。これは他の siRNA (修飾および非修飾) よりも最大 100 倍強力であり、「オンターゲット」表現型の割合を高くすることができます。

miRNA 模倣分子 (miRNA mimic) / 阻害分子

miRNA 機能の分析は、タンパク質をコードする遺伝子に使用すると同様の戦略を使用して行われます。培養細胞を miRNA 模倣分子でトランスフェクションすると、機能獲得の表現型を特定できます。Invitrogen™ miRNA 阻害剤を使用したダウンレギュレーションまたは阻害実験を実施すると、機能喪失の表現型を特定できます。アップレギュレーションとダウンレギュレーションを組み合わせることで、特定の miRNA によって制御される遺伝子および細胞プロセスを特定できます。

RNAi 法の選択 (続き)

- Invitrogen™ Pre-miR™ miRNA Precursors は、siRNA と類似しているが同一ではない、化学的に修飾された二本鎖の低分子 RNA であり、内在性の成熟 miRNA を模倣するように設計されています。
- Invitrogen™ mirVana™ miRNA Mimics は、内在性 miRNA を模倣し、miRNA 活性のアップレギュレーションによる miRNA 機能解析を可能にする、化学的に修飾された二本鎖の低分子 RNA です。これらの分子は、独自の化学修飾による star strand の不活性化により、以前の分子よりも特異性が高くなっています。mirVana miRNA Mimics は、個別に入手するか、ライブラリとして入手できます。
- Invitrogen™ Anti-miR™ miRNA Inhibitors は、内在性 miRNA に特異的に結合して阻害するように設計された、化学的に修飾された一本鎖核酸です。
- Invitrogen™ mirVana™ miRNA Inhibitors は、内在性 miRNA 分子に特異的に結合して阻害し、miRNA 活性のダウンレギュレーションによって miRNA 機能解析を可能にするように設計された、化学的に修飾された一本鎖の低分子 RNA です。これは、利用可能な miRNA 模倣分子の最低 miRNA 阻害剤濃度において最高レベルの *in vitro* 阻害効力を示します。mirVana miRNA Inhibitors は、個別に入手するか、ライブラリとして入手できます。

これらの合成分子はサイズが小さいため、ベクターよりもトランスフェクションが容易であり、siRNA に使用されるのと同じ条件で導入できます。miRNA 発現ベクターとは対照的に、用量反応研究でも使用できます。

注: Pre-miR miRNA Precursors は、ヘアピンコンストラクトではないため、pre-miRNAs と混同しないでください。

	Pre-miR Precursors	mirVana miRNA Mimics	Anti-miR Inhibitors	mirVana miRNA Inhibitors
機能	内在性 miRNA を模倣	内在性 miRNA を模倣	内在性 miRNA を阻害	内在性 miRNA を阻害
実験の目的	機能の獲得 (<i>in vivo</i> または <i>in vitro</i>)	機能の獲得 (<i>in vivo</i> または <i>in vitro</i>)	機能の喪失 (<i>in vivo</i> または <i>in vitro</i>)	機能の喪失 (<i>in vivo</i> または <i>in vitro</i>)
コンテンツデータベース	miRBase v15 ^{*1} を 100% カバー	miRBase v19 ^{*2} を 100% カバー	miRBase v15 ^{*1} を 100% カバー	miRBase v19 ^{*2} を 100% カバー
モデルシステム	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i>
対象の生物種	ヒト	ヒト、マウス、ラット (その他の生物種: カスタムツールを使用)	ヒト	ヒト、マウス、ラット (その他の生物種: カスタムツールを使用)
カスタム設計ツール	GeneAssist miRNA Workflow Builder	GeneAssist miRNA Workflow Builder	GeneAssist miRNA Workflow Builder	GeneAssist miRNA Workflow Builder
miRNA ライブラリ	事前設計済みまたは カスタムライブラリ	事前設計済みまたは カスタムライブラリ	事前設計済みまたは カスタムライブラリ	事前設計済みまたは カスタムライブラリ
メモ	オフターゲット効果を最小限 に抑える新しい設計	オフターゲット効果を最小限 に抑えるための次世代化学	有効性を高めるための 化学的修飾	有効性を最大限に高めるため の次世代化学

*1 1,090の異なるヒト遺伝子配列

*2 2,019の異なるヒト遺伝子配列

siRNA トランスフェクション

siRNA は、siRNA トランスフェクション試薬で細胞に簡単に導入できます。siRNA 分子は、哺乳類細胞へ導入された直後に、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の一部となります。siRNA が持つアンチセンス鎖に導かれ、RISC はターゲット mRNA を分解し、翻訳を阻害します。続いて RNAi 活性を検出するアッセイを行います。RNAi の結果を適切に比較できるように、通常はコントロールを設定します。

RNAi の成功は、想定される最大の反応が起こると考えられるタイミングで、適切な量の siRNA を正しく誘導できるかどうかにかかっています。そのような精度の高い操作は困難である可能性があります。siRNA によるオフターゲット効果は致命的であり、解析上の問題となることがあります。siRNA の設計と導入を行うよりよい方法が求められています。

トランスフェクション法	ペイロード	トランスフェクション効率	細胞生存率	メモ
Lipofectamine RNAiMAX 試薬	 	優れている	優れている	siRNA/miRNA 導入でもっとも効率的な試薬。効率的な遺伝子ノックダウン。
Lipofectamine 3000 試薬	   	優れている	優れている	トランスフェクションが困難な細胞を含む、さまざまな細胞型に対応するもっとも効率的で用途の広い試薬。
Lipofectamine 2000 試薬	   	高い	高い	さまざまな一般的な細胞型に対応する効率性が高く用途の広い試薬。
Neon エレクトロポレーション	   	最高レベル	良い	あらゆる細胞株で高効率のエレクトロポレーション。

凡例

記号	説明	記号	説明	記号	説明	記号	説明
	タンパク質、shRNA、miRNA の発現に用いるプラスミド DNA		タンパク質の発現に用いる mRNA		遺伝子発現の RNAi に用いるノンコーディング RNA		RNAi ベクターと siRNA を同時にトランスフェクションするための同時導入

ベクター媒介 RNAi

トランスフェクションが困難な細胞、初代細胞、非分裂細胞など、脂質媒介性トランスフェクションに適さない細胞型では、RNAi カセットを含むウイルスベクターがよく使用されます。Invitrogen 製品によるウイルス導入は、誘導性 RNAi を伴う安定した細胞株を製作したり、組織特異的プロモーターを用いて RNAi 配列を発現させたりするためにも使用できます。アデノウイルスベクターは多くの細胞型で一過性導入に適しており、レンチウイルスベクターは分裂細胞および非分裂細胞での安定した導入に最適です。

RNAi 法の選択 (続き)

Invitrogen™ BLOCK-iT™ Adenoviral RNAi Expression System は、複製能のないアデノウイルスの作製および導入を容易にし、RNAi 解析用のほとんどの分裂・非分裂哺乳類細胞型および動物モデルで shRNA を一時的に発現します。主な利点は、Gateway 組み換え技術です。これにより、アデノウイルスベクターのクローニングと生成が簡素化され、他のアデノウイルスシステムでは必要となる面倒で時間のかかる操作、スクリーニング、複数の形質導入が不要になります。

Invitrogen™ BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System は、操作された shRNA および miRNA の作製と、分裂・非分裂哺乳類細胞 (初代細胞やトランスフェクションが困難な細胞を含む) への導入を可能にします。このシステムは、一過性 RNAi 解析を選択することなく (あるいは適切な抗生物質を選択)、長期ノックダウン研究用の安定した細胞株を生成するために使用できます。

Invitrogen™ BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System は、Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi と ViraPower のレンチウイルス技術を組み合わせることで、操作された miRNA の作製と、非分裂細胞、初代細胞、トランスフェクションが困難な細胞への安定的な導入を容易にします。発現ベクターの Pol II プロモーターによって、複数の miRNA における共シストロン性発現が可能となり、単一のコンストラクトから複数ターゲットのノックダウンが可能となります。このプロセスは、複数の経路コンポーネントまたはスプライスバリエーションのノックダウン、またはノックダウンを用いた合成表現型の作製に最適です。

Invitrogen™ BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP は、上記の BLOCK-iT レンチウイルスシステムにおけるすべてのコンポーネントと利点を備えているだけでなく、共シストロン性 EmGFP を用いた発現の追跡が容易です。ViraPower HiPerform バージョンの発現ベクターには、最大 5 倍高いウイルス力価を生成できる mRNA 安定化配列 (WPRE) および核移行配列 (cPPT) が含まれています。

Invitrogen™ BLOCK-iT™ Inducible H1 Lentiviral RNAi System は、任意の細胞型における長期的な誘導性または構成的 shRNA 発現のためのシステムです。テトラサイクリンオペレーター (TetO₂) 配列を介して RNAi 応答を調節することで、経時的な変化の研究と、必須遺伝子を使用した機能喪失実験が可能になります。遺伝子機能の回復中における表現型の変化を測定する優れた制御システムです。

ウイルスシステム	用途
アデノウイルス RNAi 導入	<ul style="list-style-type: none">高レベルの一過性 shRNA 発現さまざまなヒト細胞型への効果的な導入動物モデル研究
レンチウイルス RNAi 導入	<ul style="list-style-type: none">幹細胞、リンパ球、神経細胞などの非分裂細胞でも、任意の細胞株で RNAi の安定発現誘導性/構成的 shRNA 発現または miR RNAi 発現動物モデル研究

RNA トランスフェクションのガイドライン

RNA トランスフェクションは、RNA を細胞に導入する従来のトランスフェクション技術から派生したものです。RNA トランスフェクションの目的は、プラスミドトランスフェクションの目的と似ています。mRNA を細胞に導入して、コードされたタンパク質を発現させ、遺伝子の機能と調節を研究することです。siRNA は、遺伝子ノックダウンの影響を調べる RNAi 研究に使用されます。2 つの方法における大きな違いの 1 つは、RNA は一時的にしかトランスフェクションできないということです。

RNAi ワークフロー 以下の図は、siRNA の設計・合成後の RNAi 実験ワークフローを示しています。RNAi 実験を行う際には、以下のものを用意してください：

- トランスフェクション/エレクトロポレーションの試薬とプロトコル
- ノックダウンおよび他のRNAiの影響を評価するアッセイ
- ポジティブコントロールsiRNAおよびネガティブコントロールsiRNA
- 目的の遺伝子に対する2つ以上のsiRNA

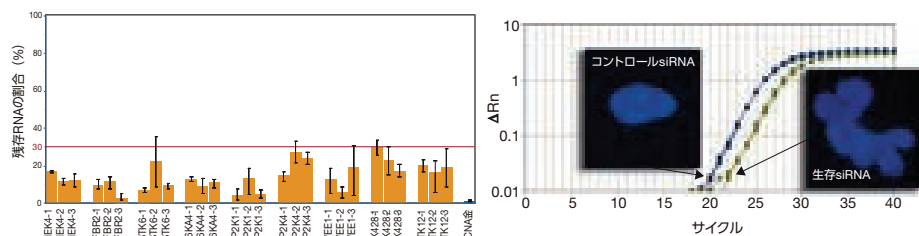
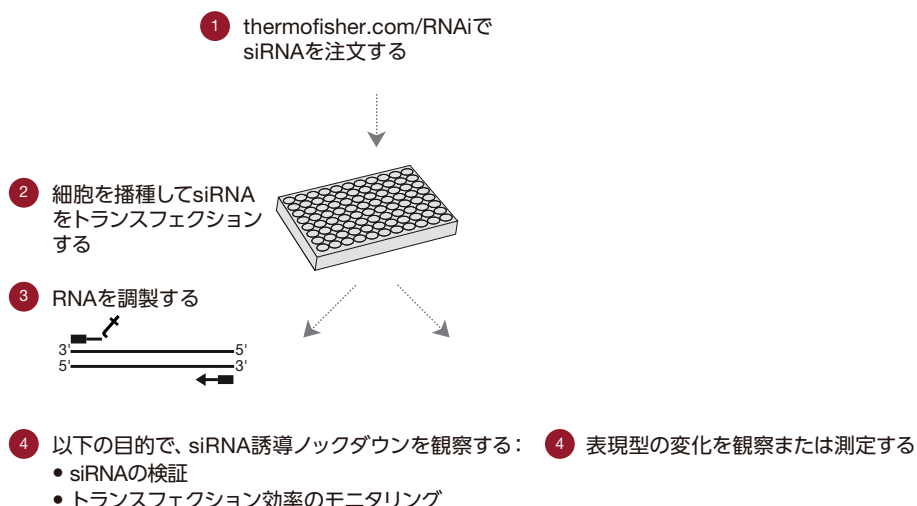


図 6.4 : siRNA の設計・合成後の RNAi ワークフロー

RNA トランスフェクションのガイドライン (続き)

RNA の取り扱い RNA オリゴヌクレオチドは、取り扱い時に導入された外来性リボヌクレアーゼによる分解を受けやすい分子です。

- RNA を取り扱う際は、手袋を着用してください。
- トランスフェクション用の RNA を調製する際には、RNase フリーの試薬、チューブ、バリアピペットチップを使用してください。
- 作業エリアを 70% エタノール、または Invitrogen™ RNaseZap™ RNase Decontamination Solution などの RNase 滅菌溶液で拭き取ってください。

トランスフェクション効率 siRNA による哺乳類細胞へのトランスフェクション効率は、使用する細胞型とトランスフェクション試薬によって変わります。そのため、トランスフェクションに使用する最適な濃度は、経験的に決定する必要があります。siRNA トランスフェクション効率に影響を与える主な変数は、以下の通りです：

- トランスフェクション試薬の種類と量
- ウェルに播種した細胞の数
- RNA または siRNA の種類
- RNA または siRNA の濃度

ポジティブコントロール 各実験にポジティブコントロールを含めることが重要です。ポジティブコントロールは、研究で使用する細胞とアッセイにおいて、再現性があり簡単に測定できる反応を引き出すものでなければなりません。最大の作用が、このコントロールであらかじめ設定した閾値レベルを上回るまたは下回る場合は、同日に行った他の実験の測定値が信頼できるものであることがわかります。アッセイおよびコントロールペアごとに、閾値を経験的に決定することが重要であることに注意してください。

特定の RNA または siRNA に対する反応の程度は、そのトランスフェクション効率に直接関係しています。トランスフェクション効率を評価するには、すべての実験に Invitrogen™ BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo を含めることをお勧めします。トランスフェクション実験で BLOCK-iT Fluorescent Oligo を使用すると、任意の蛍光顕微鏡および標準的な FITC フィルターセットにより、オリゴマーの取り込みおよびトランスフェクション効率を簡単に評価できます。細胞に少なくとも 80% の蛍光オリゴマーが取り込まれることは、高効率であることと相関します。

ネガティブコントロール ネガティブコントロールは、意味あるデータを取得する上でポジティブコントロールと同じように重要です。ターゲット RNA または siRNA で処理した細胞とコントロールで処理した細胞の作用を比較するためには、一連のトランスフェクションに等モル量のネガティブコントロールを少なくとも1つ必ず含めてください。これらのきわめて重要なコントロールから得られるデータは、実験ターゲットのノックダウンを評価するためのベースラインとなります。

非トランスフェクションまたは細胞のみのネガティブコントロールも非常に有用です。トランスフェクションされなかった培養物と、非ターゲティングネガティブコントロールをトランスフェクションされた培養物との間でハウスキーピング遺伝子の発現を比較することにより、トランスフェクションが細胞生存率に与える影響に関する重要な情報を得ることができます。

コントロールの種類	推奨された使用法	推奨製品
トランスフェクションコントロール	蛍光でトランスフェクション効率を算出およびモニタリングします。	<ul style="list-style-type: none"> BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Control BLOCK-iT Fluorescent Oligo
ネガティブコントロール	ノックダウンレベルとバックグラウンドを比較して測定するために、非特異的コントロールまたはスクランブルコントロールが使用されます。	<ul style="list-style-type: none"> Invitrogen™ <i>Silencer</i>™ Select Negative Control siRNAs Stealth RNAi siRNA Negative Control Invitrogen™ <i>Silencer</i>™ Negative Control siRNA
ポジティブコントロール	RNAi 試薬は、導入を測定し実験条件を最適化するために使用される高レベルのノックダウンを実現することが知られています。	<ul style="list-style-type: none"> Invitrogen™ <i>Silencer</i>™ Select GAPDH Positive Control siRNAs Stealth RNAi siRNA Positive Control Invitrogen™ <i>Silencer</i>™ Positive Control siRNA
非トランスフェクションコントロール	正常な遺伝子発現レベルと表現型を測定します。	
同一ターゲットに対する複数の RNAi 配列	表現型の変化を検証し、出版品質の結果を得るためにオフターゲット効果を制御します。	
RNAi の滴定	細胞の正常なプロセスを変化させないように、最低有効レベルを使用します。	
レスキュー実験	誘導性 RNAi をオフにするか、RNAi 配列が影響を与えないターゲット mRNA を発現しているプラスミドを導入します。	BLOCK-iT Pol II miR RNAi ベクターまたは BLOCK-iT shRNA ベクターと誘導性プロモーター（それぞれ CMV/TO、H1/TO）

コトランスフェクション siRNA とプラスミド（タンパク質を発現）の両方を細胞に導入したい場合は、コトランスフェクションが実施できます。このタンパク質は試験システムの一部、またほとんどの場合、レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ、GFP、β-ラクタマーゼ）です。変異タンパク質を siRNA とともに発現させて、siRNA で1つの経路を遮断し、変異タンパク質を過剰発現させる場合もあります。

脂質トランスフェクション試薬を使用する場合は、プラスミドが存在するとすべてのカーゴ（プラスミドおよび siRNA）のトランスフェクション効率が低下する可能性があるため、トランスフェクションの最適化は非常に重要になります。トランスフェクション条件が最適でない場合とは、脂質が多過ぎたり、ノックダウンやプラスミドからのタンパク質発現が少な過ぎたりすることで、望ましくない非特異的な細胞死が生じる可能性があります。

RNA トランスフェクションのガイドライン (続き)

siRNA の品質 siRNA の品質は、RNAi 実験に大きく影響する可能性があります。siRNA には、エタノール、塩類、タンパク質などの合成から持ち越された試薬が含まれてはなりません。また、30 bp より長い dsRNA 汚染物質は、非特異的インターフェロン応答を活性化し、細胞毒性を引き起こすことにより、遺伝子発現を変化させることが知られています (Stark et al., 1998)。そのため、全長の 80% を超える標準純度の siRNA を使用することをお勧めします。

siRNA の保存

siRNA は -20°C または -80°C で保存しますが、自動霜取り冷凍庫は使用しないでください。当社のデータは、最大 50 回の凍結/融解サイクルが $100\ \mu\text{M}$ の siRNA 溶液に悪影響を及ぼさないことを示しています (質量分析および分析 HPLC で評価)。しかし、RNase フリーの水またはバッファーに再懸濁させた siRNA は、汚染の可能性を避けるために少量に分注して保存することをお勧めします。

siRNA のヌクレアーゼ耐性

アニーリングされた二本鎖 siRNA は、一本鎖 RNA よりもヌクレアーゼ耐性が高くなっています。しかし、すべての RNAi 実験で厳密な RNase フリーの手法を使用する必要があります。

siRNA 分解の確認

siRNA 調製物の分解が疑われる場合は、約 $2.5\ \mu\text{g}$ の siRNA を非変性 15 ~ 20% アクリルアミドゲル上で電気泳動して siRNA の完全性を確認します。RNA をエチジウムブロマイドで染色して可視化し、予測されるサイズと強度であることを確認します。siRNA はタイトなバンドとして移動する必要があります。スメアなバンドは分解している可能性を示します。

siRNA の量 siRNA の最適とその遺伝子サイレンシング能力は、標的遺伝子産物の特性 (mRNA の局在、安定性、存在量、ならびに標的タンパク質の安定性および存在量など) に一部影響を受けます。

多くの siRNA 実験は、現在も $100\ \text{nM}$ siRNA で細胞をトランスフェクションすることで行われています。しかし、公表されている結果は、より低い siRNA 濃度でトランスフェクションすると、siRNA が示すオフターゲット効果を低減できることを示しています (Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003)。脂質媒介性リバーストランスフェクションでは、 $10\ \text{nM}$ の siRNA (範囲 1 ~ $30\ \text{nM}$) で通常は十分です。エレクトロポレーションで siRNA を導入する場合、siRNA 量の影響はそれほど顕著ではありませんが、通常 $1\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{L}$ 細胞 ($1.5\ \mu\text{M}$) の siRNA (範囲 0.5 ~ $2.5\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{L}$ 細胞または $0.75\ \sim\ 3.75\ \mu\text{M}$) で十分です。

siRNA が多過ぎるとオフターゲット効果または細胞毒性作用をもたらす可能性があります。siRNA が少な過ぎると標的遺伝子の発現を効果的に低減できない可能性があることに注意してください。非常に多くの変数が関与しているため、使用する細胞株ごとに siRNA 量を最適化することが重要です。また、非ターゲットネガティブコントロール siRNA の量は、実験用 siRNA と同量にする必要があります。

トランスフェクション試薬の量 トランスフェクション試薬の量は、少な過ぎるとトランスフェクションが制限され、多過ぎると毒性になる可能性があるため、最適化する必要のあるきわめて重要なパラメーターです。全体的なトランスフェクション効率、siRNAと複合体を形成するトランスフェクション試薬の量に影響されます。最適化するには、トランスフェクション試薬を広い希釈範囲で滴定し、良好な遺伝子ノックダウンが得られるもっとも希薄な濃度を選択します。この臨界濃度は、細胞株ごとに経験的に決定する必要があります。

細胞密度 細胞密度はあらかじめ播種する従来のトランスフェクション実験では重要ですが、リバーストランスフェクションで siRNA を導入する場合、細胞密度はそれほど重要ではなく、最適化はほとんど必要ありません。しかし、使用する細胞が多過ぎて、siRNA の量が比例して増加しない場合は、サンプル中の siRNA の濃度が低過ぎて遺伝子サイレンシングを効果的に誘発できない場合があります。細胞密度が低過ぎると、培養物が不安定になる可能性があります。培養条件 (pH、温度など) がマルチウェルプレート全体で均一ではなく、不安定な培養物に異なる影響を与える可能性があるため、不安定性はウェルごとに異なります。

トランスフェクション試薬 / siRNA 複合体への曝露 ほとんどのトランスフェクション試薬は最小限の細胞毒性を誘発するように設計されていますが、細胞を過剰量のトランスフェクション試薬に曝露したり、長時間放置したりすると、細胞培養の全体的な健全性に悪影響を及ぼす可能性があります。感受性の高い細胞は、数時間後にトランスフェクション試薬への曝露により死滅し始める可能性があります。トランスフェクションによって細胞で過剰に細胞死が生じる場合は、トランスフェクション混合物を除去し、8～24 時間後に新しい増殖培地を補充してください。

トランスフェクション中の血清の存在 トランスフェクション試薬と siRNA との複合体形成は、血清成分が反応を妨げないように、少量血清培地または無血清培地で行う必要があります。しかし、いったん複合体が形成されると、一部のトランスフェクション試薬では、血清を含有する通常の増殖培地でトランスフェクションを行うことができます (製造元の指示に従ってください)。トランスフェクション後は通常、培養培地の添加や交換は必要ありませんが、血清に適合する試薬を使用する場合でも、培地を交換すると有益な場合もあります。特定の試薬を使用する前に、必ず血清適合性を確認してください。一部のトランスフェクション試薬は、トランスフェクション中に無血清培地を必要とし、トランスフェクション複合体との最初のインキュベーション後に完全増殖培地に交換する必要があります。

RNA トランスフェクションのガイドライン (続き)

siRNA 実験を成功させるためのコツ

1. 遺伝子ごとに 2～4 個の siRNA 配列を設計・検証します。ご自身で siRNA をデザインする必要はありません。クラス最高レベルの設計アルゴリズムを利用して siRNA を設計するには、thermofisher.com/sirna をご覧ください。
2. RNase 汚染を回避します。微量のリボヌクレアーゼでも、siRNA 実験の障害となる可能性があります。RNase は実験室環境全体、皮膚、空気中、素手で触れたもの、環境に曝露した状態で放置されたものに存在するため、RNase 汚染を防止および排除するための措置を講じることが重要です。当社は、RNase を検出・防止するように設計された製品ラインを提供しています。
3. トランスフェクションの良好な再現性を得るために、健全な細胞培養物および厳格なプロトコルを維持します。一般に、健全な細胞は、維持管理が不十分な細胞よりも高い効率でトランスフェクションされます。継代数の少ない細胞を定期的に継代培養することで、実験間の不死化細胞株のばらつきを最小限に抑えることができます。最適化実験を行う際は、トランスフェクション効率が時間とともに低下するため、50 継代以内で細胞をトランスフェクションすることをお勧めします。
4. 抗生物質を使用しないようにします。播種中およびトランスフェクション後、最大 72 時間は、抗生物質の使用を避けてください。抗生物質は、透過処理された細胞に毒性を及ぼすレベルまで蓄積することがわかっています。また、一部の細胞およびトランスフェクション試薬では、最適な siRNA 導入のために無血清条件が必要です。そのため、通常の増殖培地と無血清培地の両方において、試験的にトランスフェクション実験を行い、トランスフェクションごとに最適条件を決定することをお勧めします。
5. 最適化された試薬を用いて siRNA を導入します。該当する細胞型に最適な siRNA トランスフェクション試薬およびプロトコルを使用します。siRNA 実験を成功させるためには、トランスフェクション試薬の選択が非常に重要です。低分子 RNA を導入するために処方されているトランスフェクション試薬を使用することが必要不可欠です (市販されているトランスフェクション試薬の大部分は、低分子 RNA 用ではなく高分子プラスミド DNA 用として設計されています)。また、特定の細胞株のトランスフェクション用に開発された試薬がある一方、幅広い特異性を持つ試薬もあります。適したトランスフェクション試薬の選択については「[siRNA トランスフェクション] (ページ 99) をご覧ください。
6. トランスフェクション条件およびアッセイ条件を最適化するために、適切なポジティブコントロールを使用します。ハウスキーピング遺伝子は、ほとんどの細胞型に適したポジティブコントロールです。条件を最適化するためには、選択したポジティブコントロールおよび実験に用いるターゲットに特異的な siRNA を、いくつかの濃度でターゲット細胞にトランスフェクションします。トランスフェクションの 48 時間後に、トランスフェクションされていない細胞と比較したコントロールタンパク質レベルまたは mRNA レベルの低下を測定します。siRNA 濃度が高過ぎると、細胞毒性や細胞死につながる可能性があります。当社では利便性を確保するため、さまざまな遺伝子ターゲットに対するポジティブコントロール siRNA を提供しています (ページ 102 を参照)。

7. 非特異的効果と区別するために、ネガティブコントロール siRNA を使用します (ページ 103 を参照)。ネガティブコントロールは、大部分の活性 siRNA のヌクレオチド配列をスクランブルすることにより設計する必要があります。ただし、必ず相同性検索を行い、ネガティブコントロール配列が研究対象の生物種のゲノムと相同性を持たないことを確認してください。
8. プロトコルの最適化に標識 siRNA を使用します。蛍光標識 siRNA を使用することにより、siRNA の安定性およびトランスフェクション効率を解析できます。標識 siRNA は、siRNA の細胞内局在性に関する研究や二重標識実験 (標識抗体) においても有用で、トランスフェクションの間に siRNA を受け取った細胞を可視化し、トランスフェクションと標的タンパク質のダウンレギュレーションを関連付けることができます。

siRNA トランスフェクションの最適化

siRNA トランスフェクション効率に影響を与える要因

細胞毒性を最小限に抑えながらトランスフェクション効率を最大限に高めることは、遺伝子サイレンシングを最適化する上で必要不可欠です。siRNA 導入とダウンストリーム表現型アッセイ条件の間にも、siRNA 誘導性ノックダウンと細胞生存率のバランスに似たバランスが存在する可能性があります。siRNA スクリーニングパスで用いられるさまざまなダウンストリームアッセイごとに、siRNA の導入条件の再最適化が必要になる場合があります。下記の要素 (重要性の高い順) を確認することにより、細胞型ごとに最高レベルのトランスフェクション効率が達成されます:

1. トランスフェクション試薬の選択
2. トランスフェクション試薬の量
3. siRNA の量
4. トランスフェクション時の細胞密度
5. 細胞のトランスフェクション試薬/siRNA 複合体への曝露時間
6. トランスフェクション法: 細胞を播種してからトランスフェクションする従来の方法、または細胞をプレートに接着させてトランスフェクションするリバーストランスフェクション法
7. 血清の有無

最適な遺伝子サイレンシング条件が決定したら、特定の細胞型を使用して実験間で条件を一定に保ってください。

付録

トラブルシューティング

以下の表は、細胞培養実験において可能性のあるいくつかの問題と実行可能な解決策のリストです。細胞培養においてもっともよく発生する問題のみが記載されており、解決策のみについてガイドラインを提供していることに注意してください。実験結果をより適切に評価するためには、ご使用の製品に添付されているマニュアルおよび製品情報シート、ならびに関連する既刊文献および書籍を参照することをお勧めします。

問題	理由	解決策
ストックを凍結融解後、生細胞が見られない	細胞が正しく保存されなかった	新しいストックを入手し、液体窒素中で保存してください。融解作業時まで、細胞を液体窒素中に維持してください。
	自家製凍結細胞ストックの細胞が生存していない	供給元が推奨する密度で細胞を凍結してください。
		継代数の少ない細胞を使用して、自家製凍結細胞ストックを作製してください。
		供給元が推奨する細胞凍結手順に正確に従ってください。このハンドブックで推奨している凍結手順は、ガイドラインとしてのみ提供されている一般的な手順であることに注意してください。
		新しいストックを入手してください。
	細胞を不適切に融解した	供給元が推奨する細胞融解手順に正確に従ってください。このハンドブックで推奨している融解手順は、ガイドラインとしてのみ提供されている一般的な手順であることに注意してください。 凍結細胞の融解はすみやかにいき、播種前にあらかじめ温めておいた増殖培地を用いてゆっくり希釈してください。
	融解に使用した培地が不適切	供給元が推奨する培地を使用してください。培地があらかじめ温められていることを確認してください。
	細胞の過剰な希釈	細胞の回復を最適化するために、融解した細胞を供給元が推奨する高密度で播種してください。
細胞の取り扱いが穏やかでない	凍結と融解の手順は、ほとんどの細胞にストレスを与えます。ボルテックスしたり、細胞を取り除くためにフラスコをたたいたり（昆虫細胞の培養を除く）、細胞を高速で遠心分離したりしないでください。	
凍結培地に使用するグリセロールを明所で保存した（該当する場合）	明所で保存すると、グリセロールが細胞毒性を有するアクロレインに変換されます。新しいストックを入手してください。	
細胞の増殖が遅い	増殖培地が不適切	供給元が推奨する、あらかじめ温めておいた増殖培地を使用してください。
	増殖培地中の血清の品質が低い	異なるロットの血清を使用してください。
	細胞の継代数が多過ぎる	健全で、継代数の少ない細胞を使用してください。
	細胞がコンフルエントを超えて増殖していた	哺乳類細胞は、コンフルエントに達する前の対数増殖期に継代してください。
	培養物がマイコプラズマで汚染された	細胞、培地、試薬を廃棄してください。新しい細胞ストックを入手し、新しい培地および試薬とともに使用してください。

細胞培養およびトランスフェクションに関する製品

当社は細胞培養実験用に、さまざまな初代培養細胞や樹立した細胞株、試薬、培地、血清、成長因子を提供しています。以下の表には、当社から入手可能な、より一般的に使用されている細胞株およびその他の細胞培養製品が記載されています。当社の製品の詳細については、thermofisher.com/cellculture をご覧ください。

細胞株 当社は、以下に掲載されている哺乳動物細胞株および昆虫細胞株に加えて、初代哺乳動物細胞や細胞培養システム（ケラチノサイト、線維芽細胞、メラノサイト、肝細胞、角膜上皮細胞および乳腺上皮細胞、大血管内皮細胞および微小血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞の培養システムを含む）を提供しています。細胞、技術リソース、関連技術の包括的なリストについては、thermofisher.com/primarycells をご覧ください。

製品	数量	カタログ番号
哺乳類細胞株		
Expi293F細胞	1バイアル	A14527
Expi293F細胞(cGMPバンク化)	1バイアル	100044202
ExpiCHO-S細胞	1バイアル	A29127
ExpiCHO-S細胞(cGMPバンク化)	1バイアル	A37785
Expi293F GnTI-細胞	1バイアル	A39240
Expi293F Inducible細胞	1バイアル	A39241
Expi293F Inducible GnTI-細胞	1バイアル	A39242
FreeStyle 293-F細胞	1 mL	R79007
293-F細胞、SFM馴化(7.5×10 ⁶ 細胞)	1.5 mL	11625-019
293-H細胞、SFM馴化(7.5×10 ⁶ 細胞)	1.5 mL	11631-017
293FT細胞株	3×10 ⁶ 細胞	R700-07
293A細胞株	3×10 ⁶ 細胞	R705-07
GripTite 293 MSR細胞株	1キット	R795-07
CHO DG44細胞(cGMPバンク化)および培地キット	1キット	A11000-01
昆虫細胞株		
ExpiSf9細胞	1バイアル	A35243
Sf9細胞(SFM馴化)(1.5×10 ⁷ 細胞)	1.5 mL	11496-015
Sf21細胞(SFM馴化)(1.5×10 ⁷ 細胞)	1.5 mL	11497-013
Mimic Sf9昆虫細胞(1×10 ⁷ 細胞)	1 mL	12552-014
Sf-900 III SFMIに馴化したSf9細胞(1.5×10 ⁷ 細胞)	1バイアル	12659-017
Sf-900 III SFMIに馴化したSf21細胞(1.5×10 ⁷ 細胞)	1バイアル	12682-019
Sf9凍結細胞(グレース培地)(1×10 ⁷ 細胞)	1 mL	B825-01
Sf21凍結細胞(グレース培地)(1×10 ⁷ 細胞)	1 mL	B821-01
High Five細胞、Express Five SFMIに馴化(3×10 ⁶ 細胞)	1 mL	B855-02

細胞培養およびトランスフェクションに関する製品 (続き)

哺乳類細胞用培地 Gibco™細胞培養培地は、さまざまな哺乳類細胞株の増殖に対応しています。当社から入手可能なすべての細胞培養培地製品は、汚染について試験され、品質、安全性、一貫性、規制への準拠が保証されています。以下の培地に加え、当社は初代細胞、樹立細胞株、幹細胞、ウイルス産生、タンパク質発現、幹細胞分化、細胞遺伝学のための無血清培地および特殊培地を幅広く取り揃えています。細胞培養培地の詳細およびリストについては、thermofisher.com/media をご覧ください。

製品※1	数量※2	カタログ番号
BenchStable DMEM	500 mL	A4192101
BenchStable DMEM/F-12	500 mL	A4192001
BenchStable MEM	500 mL	A4192201
BenchStable RPMI 1640	500 mL	A4192301
DMEM (1 ×)、液体 (グルタミン不含有、高グルコース)	10 × 500 mL	35053-036
DMEM (1 ×)、液体 (グルタミン不含有、低グルコース)	500 mL	11054-020
DMEM (1 ×)、液体 (GlutaMAX-I 含有、高グルコース)	10 × 500 mL	10564-029
DMEM (1 ×)、液体 (GlutaMAX-I 含有、低グルコース)	10 × 500 mL	10567-022
Advanced DMEM (1 ×)、液体 (グルタミン不含有、高グルコース)	10 × 500 mL	12491-023
DMEM/F-12、液体、1:1 (GlutaMAX-I 含有)	10 × 500 mL	10565-042
DMEM/F-12、液体、1:1 (L-グルタミン含有)	10 × 500 mL	11320-082
Advanced DMEM/F-12、液体、1:1 (グルタミン不含有)	10 × 500 mL	12634-028
Minimum Essential Medium (MEM) (1 ×)、液体 (グルタミン不含有)	10 × 500 mL	11090-099
Minimum Essential Medium (MEM) (1 ×)、液体 (GlutaMAX-I 含有)	10 × 500 mL	41090-101
Advanced MEM (Minimum Essential Medium) (1 ×)、液体 (グルタミン不含有)	10 × 500 mL	12492-021
RPMI Medium 1640 (1 ×)、液体 (グルタミン不含有)	1,000 mL	21870-084
RPMI Medium 1640 (1 ×)、液体 (GlutaMAX-I 含有)	10 × 500 mL	61870-127
Advanced RPMI Medium 1640 (1 ×)、液体 (グルタミン不含有)	10 × 500 mL	12633-020
Hybridoma-SFM	1 L	12045076
Expi293 Expression Medium	1 L	A1435101
293 SFM II、液体	1,000 mL	11686-029
CD 293 Medium、液体	1,000 mL	11913-019
FreeStyle 293 Expression Medium	1,000 mL	12338-018
ExpiCHO Expression Medium	1 L	A2910001
CD CHO Medium (1 ×)、液体	1,000 mL	10743-029
CHO-S-SFM II	1,000 mL	12052-098
Freestyle CHO Expression Medium	1,000 mL	12651-014
CD OptiCHO Medium (1 ×)、液体	1,000 mL	12681-011
Recovery Cell Culture Freezing Medium、液体	50 mL	12648-010
Synth-a-Freeze Cryopreservation Medium	50 mL	R-005-50

※1 この表に記載されているほとんどの培地は、Gibco™ L-グルタミン含有、Gibco™ GlutaMAX™-Iサプリメント含有、またはグルタミン不含有、フェノールレッド含有または不含有、粉末製剤または液体製剤で入手できます。

※2 さまざまな数量とパッケージサイズをご用意しています。

昆虫細胞用培地 異種タンパク質発現では、昆虫細胞培養が一般的に用いられます。昆虫細胞は、大量生産や基礎研究において、複雑な翻訳後修飾を伴う大量のタンパク質を発現することができます。当社の Gibco™ 昆虫細胞培地は、増殖とタンパク質収量が最大限に上がるように処方されています。詳細については、thermofisher.com/insectcellculture をご覧ください。

製品 ^{※1}	数量 ^{※2}	カタログ番号
ExpiSf CD Medium	1 L	A3767802
グレース昆虫細胞培地、無添加 (1 ×)、液体	500 mL	11595-030
グレース昆虫細胞培地、添加済み (1 ×)、液体	500 mL	11605-094
Sf-900 II SFM (1 ×)、液体	500 mL	10902-096
Sf-900 III SFM (1 ×)、液体	500 mL	12658-019
シュナイダーショウジョウバエ培地 (1 ×)、液体	10 × 500 mL	11720-067
IPL-41 昆虫培地 (1 ×)、液体	1,000 mL	11405-081
Express Five SFM (1 ×)、液体	1,000 mL	10486-025

※1 この表に記載されている培地のほとんどは、粉末製剤または液体製剤で入手できます。

※2 さまざまな数量とパッケージサイズをご用意しています。

細胞培養用血清 当社は、細胞培養用途向けに、ウシ由来および非ウシ由来の幅広い Gibco™ 動物血清を供給しています。もっとも広く使用されているのは、ウシ胎児血清 (FBS) です。以下の表は、当社から入手可能な血清の一部を示しています。血清の使用、供給源、トレーサビリティ、収集、ボトリングに関するリストと詳細については、thermofisher.com/fbs をご覧ください。

製品 ^{※1}		数量 ^{※2}	カタログ番号
Premium Plus FBS	ウシ胎児血清、Premium Plus	500 mL	A4766801
Premium FBS	ウシ胎児血清、認定済み、One Shot 形式、米国	10 × 50 mL	A3160402
	ウシ胎児血清、認定済み、米国	500 mL	16000044
Specialty FBS	活性炭処理済 FBS	500 mL	12676029
	超低 FBS	500 mL	16250078
	透析 FBS	500 mL	26400044
	ES 細胞認定済み FBS	500 mL	16141079
	MSC 認定済み FBS	500 mL	12662029
	エクソソーム欠失 FBS	500 mL	A2720801
Value Plus FBS	Tet システム仕様 FBS	500 mL	A4736401
	ウシ胎児血清、認定済み、One Shot 形式、米国	10 × 50 mL	A3160502
Value FBS	ウシ胎児血清、認定済み、米国	500 mL	26140079
	ウシ胎児血清、認定済み、One Shot 形式、USDA 承認国	10 × 50 mL	A3160602
	ウシ胎児血清、認定済み、USDA 承認国	500 mL	10437028
	ウシ胎児血清、認定済み、One Shot 形式、カナダ	10 × 50 mL	A3160702
	ウシ胎児血清、認定済み、カナダ	500 mL	12483020

※1 当社は供給を確保するために、米国、ニュージーランド、オーストラリアなど、USDA の輸入要件を満たす国から FBS を調達しています。米国から供給されるウサギ血清を除いて、他の血清製品はすべてニュージーランドから供給されます。

※2 さまざまな数量とパッケージサイズに加えて、熱不活化 FBS や特殊用途 FBS も利用できます。

細胞培養およびトランスフェクションに関する製品 (続き)

細胞培養用プラスチック Thermo Scientific™ Nunc™細胞培養製品は、60年以上にわたって世界中の研究者に使用されてきました。当社は、お客様が研究で再現性と信頼性の非常に高い結果を得られるように、一貫して高品質の製品を提供することに誇りを持っています。当社の製品は、USP クラス VI に準拠した高品質の原材料のみを使用して製造されています。当社の細胞培養製品のほとんどは、信頼できる Gibco™培地で検証され、複数の細胞株で最適な細胞増殖が得られることが確認されています。表面処理の種類とポートフォリオ全体の概要については、thermofisher.com/cellcultureplastics をご覧ください。

製品*	数量	カタログ番号
Nunc EasYDish ディッシュ (直径 35 mm × 高さ 13 mm)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	500	150460
Nunc EasYDish ディッシュ (直径 60 mm × 高さ 16 mm)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	280	150462
Nunc EasYDish ディッシュ (直径 100 mm × 高さ 17 mm)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	150	150464
Nunc EasYDish ディッシュ (直径 100 mm × 高さ 21 mm)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	240	150466
Nunc EasYDish ディッシュ (直径 150 mm × 高さ 21 mm)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	80	150468
Nunc EasYFlask (培養面積 25 cm ²)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	200	156367
Nunc EasYFlask (培養面積 75 cm ²)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	100	156499
Nunc EasYFlask (培養面積 175 cm ²)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	30	159910
Nunc EasYFlask (培養面積 225 cm ²)、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	30	159934
Nunc 6 ウェル細胞培養用マルチディッシュ、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	75	140675
Nunc 24 ウェル細胞培養用マルチディッシュ、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	75	142475
Nunc 96 ウェル細胞培養用マルチディッシュ、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	50	167008
Nunc Edge 96 ウェル細胞培養用マイクロプレート、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理	50	167425
Nunc Nunclon Sphera 96 ウェル U 底 3D 培養用 低接着処理済み マイクロプレート	8	174925
Nunc 96 ウェルマイクロプレート、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理黒色	50	137101
Nunc 96 ウェルマイクロプレート、Nunclon Delta 接着細胞用表面処理白色	50	136101
1 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	1000	170353N
2 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	500	170354N
5 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	200	170355N
10 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	200	170356N
25 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	200	170357N
50 mL、個別包装、紙/プラスチック製のピールパック	100	170358N
Nunc 15 mL コニカル遠心チューブ、バルクパック	500	339650
Nunc 15 mL コニカル遠心チューブ、ラック付	500	339651
Nunc 50 mL コニカル遠心チューブ、バルクパック	500	339652
Nunc 50 mL コニカル遠心チューブ、ラック付	300	339653
Nunc Lab-Tek チェンバースライド、4 ウェル	16	177399
Nunc Lab-Tek チェンバースライド、8 ウェル	16	177402
Nunc Lab-Tek カバーグラスチェンバー、4 ウェル	16	155383
Nunc Lab-Tek カバーグラスチェンバー、8 ウェル	16	155411
Nunc Lab-Tek II チェンバースライド、4 ウェル	16	154526
Nunc Lab-Tek II チェンバースライド、8 ウェル	16	154534
Nunc Lab-Tek II カバーグラスチェンバー、4 ウェル	16	155382
Nunc Lab-Tek II カバーグラスチェンバー、8 ウェル	16	155409

細胞培養用実験試薬 以下の表は、当社から入手可能な、細胞培養用実験試薬の一部を示しています。詳細およびリストについては、thermofisher.com/culturereagents をご覧ください。

製品	数量 ^{※1}	カタログ番号
平衡塩類溶液：D-PBS ^{※2} 、EBSS、HBSS [†] 、PBS		
Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) (1 ×)、液体	1,000 mL	14040-117
Earle 平衡塩類溶液 (EBSS) (1 ×)、液体	500 mL	14155-063
Hank 平衡塩類溶液 (HBSS) (1 ×)、液体	1,000 mL	14025-076
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 (1 ×)、液体	500 mL	10010-023
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.2 (1 ×)、液体	500 mL	70013-032
緩衝液および化学物質		
HEPES 緩衝液 (1 M)	20 × 100 mL	15630-130
重炭酸ナトリウム溶液、7.5% (w/v)	100 mL	25080-094
細胞解離試薬		
フェノールレッド含有 TrypLE Express 解離試薬	500 mL	12605-028
フェノールレッド不含有 TrypLE Express 解離試薬	100 mL	12604-013
TrypLE Select 解離試薬	500 mL	12563-029
トリプシン、0.5% (10 ×)、液体、EDTA 含有、フェノールレッド不含有	100 mL	15400-054
トリプシン、0.25% (10 ×)、液体、EDTA 不含有、フェノールレッド含有	500 mL	15050-057
コラゲナーゼタイプ I	1 g	17100-017
コラゲナーゼタイプ II	1 g	17101-015
ディスパーゼ	5 g	17105-041
大豆トリプシン阻害剤	1 g	17075-029
サプリメント		
L-グルタミン ^{※2} 、200 mM (100 ×)、液体	100 mL	25030-081
GlutaMAX-I サプリメント	100 mL	35050-061
D-グルコース (デキストロース)	1 kg	15023-021
Pluronic F-68、10% (100 ×)	100 mL	24040-032
MEM アミノ酸溶液 (50 ×)、液体	100 mL	11130-051
MEM 非必須アミノ酸溶液、10 mM (100 ×)、液体	100 mL	11140-050
MEM ピルビン酸ナトリウム溶液、10 mM (100 ×)、液体	100 mL	11360-070
MEM ビタミン溶液 (100 ×)、液体	100 mL	11120-052
2-メルカプトエタノール (1,000 ×)、液体	50 mL	21985-023
CHO CD EfficientFeed Kit	1 キット	A10241-01
FoamAway Irradiated AOF 消泡剤・脱泡剤	500 mL	A1036902

※1 製品はさまざまな数量とパッケージサイズでご用意しています。

※2 製品は液体または粉末の形で入手できます。

† HBSSは、マグネシウムおよびカルシウムの有無や、フェノールレッドの有無にかかわらず利用できます。

細胞培養およびトランスフェクションに関する製品 (続き)

抗生物質および抗真菌剤 抗生物質は、細胞培養の完全性を保護するためだけでなく、細胞株の選択や樹立のためにも使用されます。当社は、抗生物質、抗真菌剤、検出キットを幅広く取り揃えています。詳細については、thermofisher.com/antibiotics をご覧ください。

製品	数量*	カタログ番号
抗生物質および抗真菌剤		
抗生物質 - 抗真菌剤 (100 ×)、液体	100 mL	15240-062
ファンギゾン抗真菌剤、液体	20 mL	15290-018
ゲンタマイシン試薬溶液 (10 mg/mL)、液体	10 mL	15710-064
ゲンタマイシン試薬溶液 (50 mg/mL)、液体	10 mL	15750-060
ゲンタマイシン/アムホテリシン溶液	10 × 1 mL	R-015-10
ネオマイシン硫酸塩、粉末	100 g	21810-031
ペニシリン - ストレプトマイシン、液体	100 mL	15140-122
ペニシリン - ストレプトマイシン - ネオマイシン (PSN) 抗生物質混合物	100 mL	15640-055
選択抗生物質		
Geneticin 選択抗生物質、液体	20 mL	10131-027
Geneticin 選択抗生物質、粉末	1 g	11811-023
ハイグロマイシン B	20 mL	10687-010
ピューロマイシン二塩酸塩選択抗生物質、液体	10 × 1 mL	A11138-03
ブラストサイジン S HCl 選択抗生物質、液体	20 mL	A11139-02
ブラストサイジン S HCl、粉末	50 mg	R210-01
ゼオシン選択試薬、粉末	1 g	R250-01
汚染検出キット		
細胞培養汚染検出キット—200 アッセイ	1 キット	C7028
Mycofluor マイコプラズマ検出キット	1 キット	M7006

*製品はさまざまな数量とパッケージサイズをご用意しています。

成長因子および精製タンパク質

当社は、非常に強力で純度の高い成長因子、ケモカイン、サイトカイン、その他のタンパク質、および細胞培養での使用が検証されているタンパク質阻害剤を多数提供しています。これらの製品は、Gibco™ 培地を使用した生細胞バイオアッセイで検証されています。詳細およびリストについては、thermofisher.com/recombinantproteins をご覧ください。

製品	発現システム	数量*	カタログ番号
熱安定性 bFGF ヒト組み換えタンパク質	大腸菌	100 µg	PHG0369
TPO (トロンボポエチン)、ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9511
BMP4 ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9531
BMP7 ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	1 mg	PHC9543
アクチビンA ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9561
VEGF ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9391
EPO ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	500 IU	PHC2054
RSPO1 ヒト組み換えタンパク質	安定 CHO 細胞	50 µg	A42586
FGF-10 ヒト組み換えタンパク質	大腸菌	50 µg	A42547
IL-7 ヒト組み換えタンパク質	大腸菌	100 µg	PHC0071
IL-23 ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9321
IL-2 ヒト組み換えタンパク質	大腸菌	100 µg	PHC0021
TGFB1 ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	10 µg	PHG9214
M-CSF ヒト組み換えタンパク質	哺乳動物	100 µg	PHC9501
HGF ヒト組み換えタンパク質	バキュロウイルス	100 µg	PHG0321
EGF ヒト組み換えタンパク質	大腸菌	100 µg	PHG0311
SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 (S-RBD) (aa 319-541)、His タグ組み換えタンパク質	HEK293	100 µg	RP-87678
SARS-CoV-2 ノックアウトタンパク質 (aa 1-419)、His タグ組み換えタンパク質	HEK293	200 µg	RP-87689
ヒト ACE2 (aa 1-615)、hFC タグ組み換えタンパク質	HEK293	200 µg	RP-87692

細胞培養およびトランスフェクションに関する製品 (続き)

セルカウンター 当社は、ラボのニーズを満たすように設計された 2 つの高性能自動セルカウンターを提供しています。Invitrogen™ Countess™ 3 FL 自動セルカウンターおよび Countess 3 自動セルカウンターには、高度なオートフォーカスアルゴリズムおよびカウントアルゴリズムが搭載されており、ユーザーによってカウントの変動が起きないようにしながら、細胞を迅速かつ正確にカウントできます。詳細については、thermofisher.com/countess をご覧ください。

製品	数量*	カタログ番号
Countess 3 FL 自動セルカウンター	1 ユニット	AMQAF2000
Countess 3 自動セルカウンター	1 ユニット	AMQAX2000
Countess 細胞カウンティングチャンバースライド	50 スライド	C10228
Countess 再使用可能スライド	1 ユニット	A25750
Countess 3 & 3 FL 再使用可能スライドホルダー	1 ユニット	A48208

※表に記載されている製品の中には、さまざまな数量とパッケージサイズをご用意しているものもあります。

トランスフェクション試薬 当社は、DNA、siRNA、オリゴヌクレオチド、RNA の導入に使用できる、卓越した性能を備えたカチオン性脂質ベーストランスフェクション試薬の包括的なコレクションを提供しています。以下の表は、当社から入手可能な、カチオン性脂質トランスフェクション試薬の一部を示しています。詳細およびリストは、thermofisher.com/transfection をご覧ください。

製品	数量*	カタログ番号
Lipofectamine 3000 トランスフェクション試薬	1.5 mL	L3000015
Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬	1.5 mL	11668019
Lipofectamine 2000 CD (既知組成) トランスフェクション試薬	1 mL	12566014
Lipofectamine RNAiMAX トランスフェクション試薬	1.5 mL	13778150
Lipofectamine CRISPRMAX 試薬	1.5 mL	CMAX00001
Lipofectamine MessengerMAX トランスフェクション試薬	1.5 mL	LMRNA015
InvivoFectamine 3.0 試薬	1 mL	IVF3001
ExpiFectamine 293 トランスフェクションキット	1 × 1 L 培養物	A14524
ExpiFectamine CHO トランスフェクションキット	1 × 1 L 培養物	A29129
ExpiFectamine Sf トランスフェクション試薬	1 mL	A38915
FreeStyle MAX 試薬	1 mL	16447100
Cellfectin II 試薬	1 mL	10362100

※製品はさまざまな数量とパッケージサイズをご用意しています。

Neon Transfection System Neon Transfection System を使用すると、核酸、タンパク質、siRNA を初代造血細胞や不死化造血細胞、幹細胞、初代細胞を含むすべての哺乳類細胞型に効率よく導入することができ、高い細胞生存率が得られます。Neon Transfection System および一般的に使用される多くの細胞型に最適化された Neon トランスフェクションプロトコルの詳細については、thermofisher.com/neon をご覧ください。

製品	数量	カタログ番号
Neon Transfection System Starter Pack	1 パック	MPK5000S
Neon Transfection System	各 1	MPK5000
Neon Transfection System 100 µL Kit	192 反応	MPK10096
Neon Transfection System 10 µL Kit	192 反応	MPK1096
Neon Transfection System Pipette	各 1	MPP100
Neon Transfection System Pipette Station	各 1	MPS100
Neon Transfection Tube	1 パック	MPT100

RNA 干渉 RNAi は、ほぼすべての真核生物において、機能喪失を研究する上で明確で、強力かつ非常に効果的な方法です。当社は、RNAi で機能する 2 種類の低分子 RNA である、低分子干渉 RNA (siRNA) 分子と microRNA (miRNA) 分子を開発し、高スループット用途のライブラリを含め、*in vitro* および *in vivo* での RNAi 分析に用いるさまざまな製品を提供しています。ツールの選択は、モデルシステム、ノックダウンが必要な時間の長さ、その他の実験パラメーターによって異なります。

当社はさらに、shRNA や miR RNAi のベクター、siRNA、Stealth RNAi siRNA、Dicer で生成された siRNAi プールなどの合成分子など、さまざまな RNAi 試薬の導入に使用できる優れた性能を備えたカチオン性脂質ベーストランスフェクション試薬の包括的なコレクションを提供しています。また、多くの一般的な細胞株においては、これらのトランスフェクション試薬を使用して、細胞特異的 RNAi トランスフェクションプロトコルが作成されています。

当社から入手可能な RNAi 製品の詳細およびリストについては、thermofisher.com/rnai をご覧ください。

3D 細胞培養

オルガノイド、スフェロイド、3D 細胞培養 オルガノイド、スフェロイド、3D 細胞培養モデル研究は、疾患モデリングや再生医療など、多くの用途で大きな可能性を示しています。オルガノイドやスフェロイドなどの 3D 細胞モデルを使用することで、2D モデルでは確立されていなかった生理学的に関連するコンテキストにおいて、複雑な生物学をよりよく理解することができます。検証済みのプロトコルとワークフロー製品ソリューションによって、オルガノイドとスフェロイドを確実に培養および解析することができます。

製品	数量*	カタログ番号
Advanced DMEM/F-12	500 mL	12634010
Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	1 mL	A1413201
AlgiMatrix 3D 培養システム、96 ウェルプレート	5 × 96 ウェルプレート	12684031
Human Spheroid-Qualified Hepatocytes	1 バイアル	HMCP5Q
カスタム iPSC 細胞株	カスタム	thermofisher.com/cellbioservices
Nunclon Sphera、96 ウェルプレート、U 底	8 / ケース	174925
Nunc セルカルチャーインサート（ポリカーボネート製）とマルチウェルプレート	48 / ケース	140620
CytoVista 3D Cell Culture Clearing/Staining Kit	1 キット	V11325
PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent	25 mL	P50200
CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay	10 マイクロプレート	C35011
Countess 3 FL 自動セルカウンター	1	AMQAF2000
EVOS M5000 Cell Imaging System	1	AMF5000
Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダー	1	VLBLATD0

*表に記載されている製品の中には、さまざまな数量とパッケージサイズをご用意しているものもあります。

細胞培養用実験装置

CO₂ インキュベーター CO₂ インキュベーターは、前世紀以来大きく進歩してきました。最先端のモデルには、HEPA システムがインキュベーター全体の空気をろ過し、ISO クラス 5 クリーンルームと同等の空気環境にまで到達させることができる、空気循環と汚染管理の機能が備わっています。使用している培養細胞に適した培養条件になるように、インキュベーションチャンバー内にすべてのセンサーとプローブが配置されるモデルを選択してください。

Thermo Scientific™ CO₂ インキュベーターは、米国とドイツで 60 年以上にわたって設計、開発、製造されてきました。Thermo Scientific™ Cell Locker™ システムは、幹細胞、初代細胞、神経細胞、ウイルスクローンなどの感受性の高い細胞型においてインキュベーターを 6 つの個別のチャンバーに分割することにより、高い安定性、保護、柔軟性が得られます。当社から入手可能な細胞培養インキュベーターの詳細およびプロフィールについては、thermofisher.com/co2 をご覧ください。

生物学的安全キャビネット 日々の実験を行う上で、細胞および自分自身を継続的に保護する必要があります。Thermo Scientific™ 生物学的安全キャビネット (BSC) は、認定された性能と保護を一貫して提供する、他に類を見ないキャビネットです。その特長は以下の通りです：

- Thermo Scientific™ SmartFlow™ 技術では、デュアル DC モーターによりキャビネットの吸気速度と下降気流速度のバランスがリアルタイムで自動的に調整されます
- デジタルエアフロー検証 (DAVe) アラームにより、仕様から外れた状態が通知され、さらに安心を担保します

培養細胞を保護するだけでなく、作業者の安全を確保するための当社の最先端テクノロジーに関する詳細については、thermofisher.com/bsc をご覧ください。

遠心分離機 遠心分離は、細胞培養ワークフローにおいて不可欠なステップです。そのため、遠心分離における適切な速度と重力の選択から、最新の傾向の調査まで、用途に合った遠心分離機の要件と技術仕様を考慮することが重要です。当社は、さまざまな処理ニーズに対応した幅広い Thermo Scientific™ 遠心分離機と革新的なローターを取り揃えています。こうした製品はすべて、マイクロプレートやマイクロチューブから大容量ボトルまで、さまざまな実験器具に対応しており、遠心分離ごとに非常に高い性能が得られるように設計されています。

さまざまな用途に対応した遠心分離機の製品群や、遠心分離を安全に行うための当社独自の機能に関する詳細については、thermofisher.com/centrifuge をご覧ください。

その他の参考資料

Gibco 教育コンテンツ 無料のインタラクティブなラボです。包括的な Gibco™細胞培養トレーニングが受けられ、*in vitro* 研究を最適化するためのコツや、細胞を取り扱う際のベストプラクティスを確認できます。また、クイズに答えて理解度をチェックしたり、バッジを受け取って知識を確認したりすることができます。詳細については、thermofisher.com/gibcoeducation をご覧ください。

Gibco がんの基礎 がん細胞の培養に関する概論です。がんの生物学的特性、細胞株の培養、がんスフェロイドおよびがんオルガノイドの培養といったトピックが記載されています。詳細については、thermofisher.com/cancercellculturebasics をご覧ください。

哺乳類細胞培養および昆虫細胞培養 哺乳類細胞培養および昆虫細胞培養、細胞型固有のプロトコル、その他の細胞培養製品に関する詳細については、当社のウェブサイト thermofisher.com/insectcellculture または thermofisher.com/mammaliancellculture の「哺乳類細胞培養」および「昆虫細胞培養」のポータルをご覧ください。

細胞と組織の分析 細胞と組織の構造的および機能的な関係を理解することは、分子生物学、遺伝学、生殖機能、免疫学、がん、神経生物学などの主要な研究分野が進展する上で非常に重要です。細胞と組織の分析で重要な要素は、細胞の生存と増殖、細胞シグナル伝達経路、細胞周期分析、細胞構造です。当社は、Invitrogen™蛍光製品とテクノロジー、細胞の分離と増殖に関する Invitrogen™ Dynal™ビーズベースソリューションなど、細胞と組織の分析に関する幅広い試薬やキットをご用意しています。抗体から Countess II 自動セルカウンターや Invitrogen™ Qubit™ 4.0 蛍光光度計などのベンチトップ機器まで、細胞解析研究に不可欠なツールがあります。詳細については、thermofisher.com/cellanalysis をご覧ください。

- 細胞生物学サービス** ゲノム編集、カスタム培地、細胞株エンジニアリングから、カスタム抗体生産、ウイルスベクターサービスまで、当社はプロジェクトを前進させるための専門知識を備えています。当社専任のプロジェクト管理チームにご連絡ください。命を救うための研究で、よりよい解決策を生み出すお手伝いができれば幸いです。詳細については、thermofisher.com/cellbioservices をご覧ください。
- 安全性データシート** 安全性データシート (SDS) は、thermofisher.com/sds から入手可能です。
- 分析証明書** 分析証明書 (CoA) には、各製品の品質管理および製品適格性確認に関する詳細な情報が記載されています。CoA は、当社のウェブサイトから入手可能です。thermofisher.com/cofa から、ボックスに印刷されている製品ロット番号で CoA を検索してください。
- テクニカルサポート** 詳細または技術サポートについては、thermofisher.com/support からご連絡ください。
- 限定製品保証** サーマフィッシャーサイエンティフィックとその子会社は、thermofisher.com/termsandconditions にあるサーモフィッシャーサイエンティフィックの販売に関する条件の定めに従って製品を保証します。

- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.
- Anson DS (2004) The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2:9.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, and Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320–1323.
- Burkholder JK, Decker J, and Yang NS (1993) Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J Immunol Methods* 165:149–156.
- Capecchi MR (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22: 479–488.
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288–1292.
- Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters* 579:5923–5931.
- Chesnoy S and Huang L (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:27–47.
- Chu G and Gunderson K (1991) Separation of large DNA by a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus. *Anal Biochem* 194:439–446.
- Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, and Kost TA (1999) Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:127–132.
- Elbashir S, Lendeckel W, and Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200.
- Fraley R, Subramani S, Berg P, and Papahadjopoulos D (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem.* 255:10431–10435.
- Freshney RI (2016) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, New York.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Glover DJ, Lipps HJ., and Jans DA (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet.* 6:299–310.
- Graham FL and van der Eb AJ (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54:536–539.
- Hirata RK and Russell DW (2000) Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* 74: 4612–4620.
- Hirko A, Tang F, and Hughes JA (2003) Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr Med Chem* 10:1185–1193.
- Hutvagner G and Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056–2060.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635–637.
- Kim TK and Eberwine JH (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397: 3173–3178.
- Klein RM, Wolf ED, Wu R, and Sanford JC. (1992) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* 24:384–386.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, and Bartel DP (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299:1540.
- Liu D, Ren T, and Gao X (2003) Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 10:1307–1315.
- Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, and Verkman AS (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 275:1625–1629.

- Mack GS (2007) MicroRNA gets down to business. *Nature Biotech* 25:631–638.
- McLenachan S, Sarsero JP, and Ioannou PA (2007) Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics* 89:708–720.
- Nayak S and Herzog RW (2009) Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 17:295–304.
- Pfeifer A and Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177–211.
- Potter H, Weir L, and Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7161–7165.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, and Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513–520.
- Sarver N, Gruss P, Law MF, Khoury G, and Howley PM (1981) Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eucaryotic cloning vector. *Mol Cell Biol* 1:486–496.
- Schneckenburger H, Hendinger A, Sailer R, Strauss WS, and Schmitt M (2002) Laser-assisted optoporation of single cells. *J Biomed Opt* 7:410–416.
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, and Fesik SW (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6347–6352.
- Shigekawa K and Dower WJ (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6:742–751.
- Shirahata Y, Ohkohchi N, Itagak H, and Satomi S (2001) *J Investig Med* 49:184–190.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem* 67:227–264.
- Telenius H, Szeles A, Keresö J, Csonka E, Praznovszky T, Imreh S, Maxwell A, Perez CF, Drayer JI, and Hadlaczky G. (1999) Stability of a functional murine satellite DNA-based artificial chromosome across mammalian species. *Chromosome Res* 7:3–7.
- von Groll A, Levin Y, Barbosa MC, and Ravazzolo AP (2006) Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog* 22:1220–1224.
- Vaheri A and Pagano JS (1965) Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* 27:434–436.
- Vorburger SA and Hunt KK (2002) Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7:46–59.
- Ye GN, Daniell H, and Sanford JC (1990) Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* 15:809–819.

サポートについては、[thermofisher.com/support](https://www.thermofisher.com/support) をご覧いただくか、
cellculturesupport@thermofisher.com までお問い合わせください。

その他の教育リソースについてはこちらをご覧ください
[thermofisher.com/cellculturebasics](https://www.thermofisher.com/cellculturebasics)

研究用にもみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
CylはGE Healthcare UK Limitedの登録商標です。HoechstはHoechst GmbHの商標です。
PluronicはBASF Corporationの商標です。ZeocinはInvivoGenの商標です。Plan NeofluarはCarl Zeiss AGの商標です。
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://www.thermofisher.com/jp-tc) **GIB107-A21100B**

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

 [facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)  [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)

ThermoFisher
SCIENTIFIC