

## 2

## エレクトロポレーション法による細胞・組織への導入

1 培養細胞への NEPA21 を用いた  
遺伝子導入

舩廣善和, 小島裕久

## 特徴

## &lt;エレクトロポレーションの特徴&gt;

- ・浮遊細胞（血球細胞など）、接着細胞に高い生存率/導入効率で遺伝子導入可能
- ・*In vivo*（各種組織/胚）でも導入可能
- ・高価な専用試薬/バッファーは不要
- ・導入条件（パルス設定）の検討が必要

## &lt;NEPA21の特徴&gt;

- ・3ステップ式マルチパルス減衰方式が可能

培養細胞への遺伝子導入法は、大きく分けてウイルスベクター法と非ウイルスベクター法があり、ウイルスベクター法は導入効率で優れている反面、厳重な安全性確保や施設が必要である。ここでは、数ある非ウイルスベクター法の中で、安全性・簡便性・発現強度の点で優れているエレクトロポレーション法（電気穿孔法）をさらに応用した「3ステップ式マルチパルス減衰方式」のキュベット電極を使用した培養細胞への *in vitro* 遺伝子導入法を紹介する。なお、キュベット電極によるエレクトロポレーションは導入装置に強く依存し導入実績やコツも変わってくるため4章-2-1ではNEPA21を、4章-2-2ではGenePulserをそれぞれとりあげて解説している。

初代培養細胞・株化細胞問わず、低ランニングコスト・高導入効率でプラスミドDNAやsiRNAなどの遺伝子導入が可能である。

## 1 3ステップ式マルチパルス減衰方式の原理

エレクトロポレーション法は、細胞とプラスミドDNAの懸濁液に電気パルスをかけることにより、細胞膜に微細孔を一過性にあげ、プラスミドDNAを細胞の内部に送り込む方法である。図1のエレクトロポレーション法（3ステップ式マルチパルス減衰方式）は複数の電気パルスによる役割分担により低ダメージ・高導入効率を可能にした方法である。

## 1 ポアリングパルス（高電圧・短時間）

細胞膜に微細孔をあける高電圧・短時間の電気パルスである。複数回の電気パルスを少しずつ電圧を下げてかけることにより、より細胞に低ダメージで微細孔をあけることが可能な

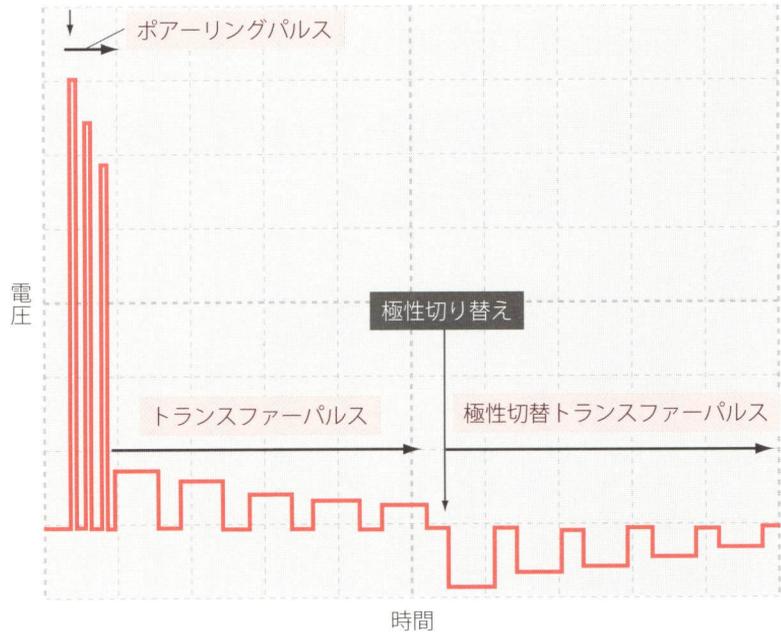


図1 3ステップ式マルチパルス減衰方式

ようである。

## 2 トランスファーパルス（低電圧・長時間）

細胞の内部に、プラスミドDNAを送り込むための低電圧・長時間の電気パルスである。導入効率の向上をめざす電気パルスなので、より細胞へのダメージが少ない低電圧を複数回出力して何度も細胞の内部にプラスミドDNAを送り込む。このときの電気パルスも少しずつ電圧を下げてかけることにより導入効率・生存率の向上が得られるようである。

## 3 極性切替したトランスファーパルス（低電圧・長時間）

さらに導入効率を向上させるための電気パルスである。

## 2 装置の特徴

ネッパジーン社のNEPA21（スーパーエレクトロポレーター）は、1台で簡単に「3ステップ式マルチパルス減衰方式」の電気パルスの出力が可能である。また、①高導入効率、②*in vivo*, *in utero*, *in ovo*, *ex vivo*の各エレクトロポレーションが可能、③付着細胞でのエレクトロポレーションも可能、という特徴をもつ。

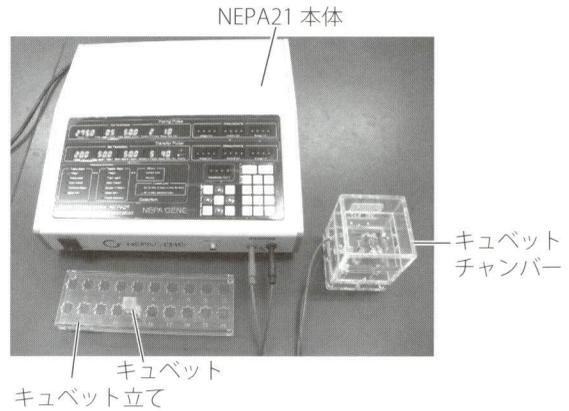


## SK-OV-3 (ヒト卵巣がん細胞) への pCMV-EGFP の導入

### 準備するもの

#### ▶ 1) 機器類

- 遺伝子導入装置…NEPA21 (ネッパジーン社)
- キュベット電極用チャンバー…CU500 (ネッパジーン社)
- キュベット電極…EC-002S (ネッパジーン社)  
2 mm gapを購入すること
- 実験系に合わせたマルチウェルプレートやディッシュ
- ゲルローディングチップ…010-R204S (Quality Scientific Plastics 社)  
G 滅菌+パイロジェン・エンドトキシンプリー



NEPA21 エレクトロポレーター

#### ▶ 2) 試薬類

- Opti-MEM…31985-070 (ライフテクノロジー社インビトロジェン製品)
- 血清入り培地
- プラスミド DNA 溶液  
プラスミド DNA は精製度が高くエンドトキシンプリーが望ましい。溶解は滅菌済みの TE バッファーを用いて  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度で調製する。

### プロトコール

本エレクトロポレーション法では細胞種によりパルス条件が大きく異なる。このため、最初にネッパジーン社推奨の 12 の設定条件で条件検討を行うことが望ましい。本プロトコールはこの 12 の条件で行う際の方法となっている。よって、実際の実験では、見つけ出した最良のパルス条件において、実験スケールやレーンの組み合わせは各自任意の設定で行うこと。

#### ▶ 1) 細胞の調製

- 1 エレクトロポレーション時、対数増殖期となるように細胞を培養する<sup>a)</sup>
- 2 付着の強い細胞はトリプシンで剥がし、すぐに血清入り培地を加え反応を止める
- 3 遠心分離後に培地を吸引して捨てる〔遠心分離：1,000 rpm (170G), 1分程度〕
- 4 十分量の Opti-MEM で細胞を洗浄する。Opti-MEM を加え攪拌後、遠心分離して培地を捨てる〔遠心分

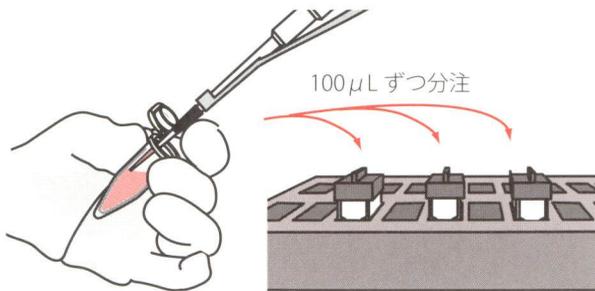
<sup>a)</sup> **重要** 十分な条件検討をするには、 $1.3 \times 10^7$  cells (12~13 条件分) くらいの細胞数が必要である。

離：1,000 rpm (170G), 1分程度]

- 5 自動セルカウンターか血球計算盤（ヘモサイトメーター）で細胞数をカウントする
- 6 その後、 $1 \times 10^6$  cells/90  $\mu$ Lの濃度になるようにOpti-MEMで調整する
- 7 Opti-MEM 1,170  $\mu$ L ( $1.3 \times 10^7$  cells) とプラスミドDNA溶液 130  $\mu$ Lを加え合計1,300  $\mu$ Lにする<sup>b)</sup>
- 8 キュベット電極用ラックにキュベット電極をナンバリングして準備する<sup>c)</sup>
- 9 Opti-MEM ( $1.3 \times 10^7$  cells) とプラスミドDNA混合溶液を攪拌して100  $\mu$ Lずつキュベット電極に分注する

b) 12条件なのに、100  $\mu$ L余分に作成するのはロス分である。

c) クリーンベンチ内で、キュベット電極のアルミ部分にナンバリングする。ナンバリングをしないと、複数のサンプルをまとめてエレクトロポレーションすると、どの条件のキュベット電極かわからなくなる可能性がある。



## ▶ 2) エレクトロポレーション

- 10 あらかじめエレクトロポレーション後に細胞を播く血清入り培地を12条件分マルチウェルプレートやディッシュに用意して、インキュベーター内に入れておく<sup>d)</sup>
- 11 キュベット電極を軽くタッピングして混ぜてから、キュベット電極用チャンバーにセットする



タッピングで細胞とプラスミドを混ぜる

- 12 抵抗値を測定して確認後、メモをして記録に残しておく<sup>e)</sup>。通常は約0.030～0.050 k $\Omega$ の範囲になる
- 13 エレクトロポレーションをして電気パルスを出力させる
- 14 エレクトロポレーション後、できるだけ早めにキュベット電極からスポイト（電極に付属のもの）かフィルター付きのゲルローディングチップを使用して細胞を回収し、あらかじめ用意したマルチウェルプレートやディッシュの培地に播く<sup>f)</sup>

d) エレクトロポレーション後、電気ショックでストレスを受けている細胞をできるだけ早く通常の血清入り培地に播くため。

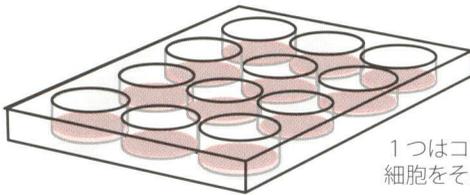
e) 同じ電気条件でも抵抗値が違えば電流値が変化する（オームの法則： $E [V] = I [A] \times R [\Omega]$ ）ので、そのときの抵抗値を記録に残すことをおすすめする。

f) 通常のチップでは、キュベットの電極の底まで届かないので、付属のスポイトかゲルローディングチップを使用して回収する。また、細胞を播くプレートやディッシュは細胞の状態やタンパク質発現に大きく影響するので要検討のこと。



付属スポイトで細胞を回収

- ⑮その後、ポアーリングパルスとトランスファーパルスの測定値（電圧・電流・合計測定エネルギー）をメモして記録に残しておく<sup>⑨</sup>
- ⑯上記の⑪～⑮工程を11条件繰り返す。残りの1条件は、細胞の状態を把握するため、エレクトロポレーションをせずにコントロールとしてそのままマルチウェルプレートやディッシュの培地に播く



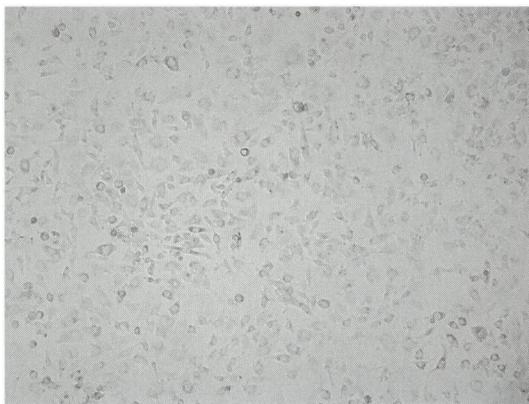
1つはコントロールとして細胞をそのまま播く

- ⑰マルチウェルプレートやディッシュをインキュベーター内に入れて培養する
- ⑱エレクトロポレーションの24時間後、細胞の生存率と導入効率を調べる<sup>⑨</sup>。フローサイトメトリー（FACS）を使用して調べるか、生存率はトリパンブルー染色後に光学顕微鏡で検鏡、導入効率はGFPをレーザー顕微鏡で調べるとよい<sup>⑩</sup>

⑨特にポアーリングパルスの合計測定エネルギー（測定電圧値 [V] × 測定電流値 [A] × 設定パルス幅 [msec] の各パルスの合計）は導入効率・生存率に直結する重要な測定値なので記録に残すことを勧める。

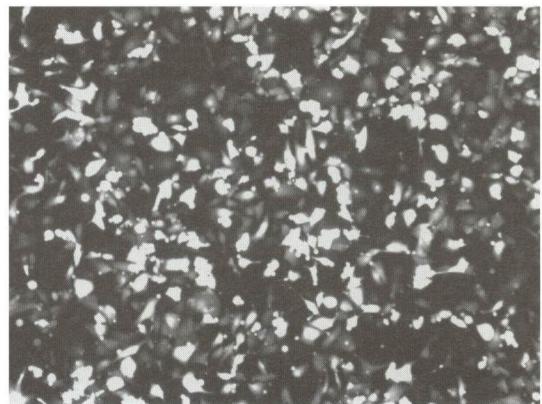
⑨ GFP のピークは24時間後ではないが細胞が分裂して増えることを考慮すると、24時間後が一番バランスが取れている。

⑩ **重要** GFP 導入24時間後に、生存率はトリパンブルー染色後に光学顕微鏡で検鏡のうえで細胞数をカウント、導入効率はGFP発現をレーザー顕微鏡で明視野画像と比較して細胞数をカウントして算出した。結果は、高い生存率（90%）と高い導入効率（90%）が確認された（図2）。



明視野

生存率：90%



GFP 画像

導入効率：90%

図2 SK-OV-3（ヒト卵巣がん細胞）への遺伝子導入結果

## 3 実験条件を最適化するコツ

### 1 条件の最適化

12条件で実験をして、そのときに一番実験結果がよかった条件を中心に再度、実験をする  
とさらによい実験結果が得られやすい。最初の12条件は、細胞種ごとにかなり実験条件が  
違うので、ネッパジーン社に問い合わせるのが一番の近道。また、ネッパジーン社のウェ  
ブサイトに細胞種別の生存率・導入効率が記載されているので、参考にするとよい<sup>1)</sup>。

### 2 細胞数とプラスミドDNA量

細胞数やプラスミドDNA量を減らして実験したいときは、キューベット電極2 mm gapと  
液量100  $\mu$  Lはそのままの状態、細胞数とプラスミドDNAを同じ比率で減らす（キューベッ  
ト電極のギャップと液量は変えると抵抗値が大幅に変化するので固定のまま）。

### 3 siRNAの導入

まず初めにGFPを使用して、その細胞の最適条件を探す。そのときの条件が他のプラスミ  
ドDNAやsiRNAを導入するときにも最適条件になる。siRNAなどのオリゴヌクレオチドを  
遺伝子導入する際は、プラスミドDNAの1/5量にする。つまりプラスミドDNA：10  $\mu$  gを  
siRNA：2  $\mu$  g（約150 pmol）に変えて同じプロトコールと電気条件で実験する。

細胞への電圧ポレーション法

## トラブルシューティング



### 導入効率が低い

- 原因**
- ① プラスミドDNAの精製不良
  - ② 細胞数・プラスミドDNA量が不適切
  - ③ 液量が不適切
  - ④ 細胞がオーバーグロース状態

#### 原因の究明と対処法

- ① プラスミドDNAの純度は、著しく導入結果に影響する。十分な精製度を得るために、筆者らは  
キアゲン社のPlasmid Maxi Kitを汎用している。
- ② 細胞数とプラスミドDNA量に問題がないか確認する。細胞数に合ったプラスミドDNA量でな  
いと発現強度が下がったり導入効率が下がったりする。
- ③ 液量を変えていないかチェックする。細胞数とプラスミドDNA量を変えた場合も液量は100  $\mu$  L  
で実験する。
- ④ オーバーグロース状態の細胞を使った場合、対数増殖期にある細胞を使った結果とは大きく異  
なる。再現よい結果を得るためにも、細胞の成長には十分な注意を払う必要がある。



## 生存率が低い

**原因** 細胞の状態が悪い

### 原因の究明と対処法

12条件での実験時に必ずコントロールの条件を設定して、細胞の状態の確認をする。



## 「OPEN」やkΩ単位の抵抗値が表示された

**原因** ケーブルの断線

### 原因の究明と対処法

キュベット電極をセット後、抵抗測定をして通常通り0.030～0.050 kΩの抵抗値が表示されれば通電しており、「OPEN」やkΩ単位の抵抗値が表示されれば断線しているので修理を依頼する。



## エラー表示がでた

**原因** ①モード選択が限界になっていた  
②安全のためのリミッターが作動した

### 原因の究明と対処法

- ①「Current LimitがOn」(In Vivoモード)になっていないかを確認する。本実験系のキュベットでは最大1キュベット当たり $4 \times 10^6$  cells/400μLの系でも行うことはできるが、細胞とプラスミドの混合液の体積が大きい場合(例えば150μL以上)、高電圧(例えば275 mV以上)の条件ではエラーがでやすくなる。
- ②安全のため、In Vivoモード時は2 Aを超える電流値を測定するとパルスが自動停止する。その際は、「Current LimitがOff」(In Vitroモード)に変更する。

参考URL

1) ネッパジーン株式会社 <http://www.nepagene.jp/index.htm>