

3

エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

4 分散した神経細胞への
キュベット電極を用いた遺伝子導入

楠澤さやか, 仲嶋一範

特徴

※神経細胞への導入全般については4-3-1も参照

- ・子宮内胎仔脳への導入と比べ、作業が容易であり、導入効果が高く、短時間ですむ

1 分散した神経細胞への導入の原理

神経細胞への遺伝子導入にはいくつかの方法があるが、その中でもキュベット電極を用いた *in vitro* 遺伝子導入は技術的に容易であり、条件を一定にすれば再現性が高いという利点をもっている。電場によって細胞膜に微細孔を一過性にあげて遺伝子を導入するものであり、目的とする細胞を用いて最初に条件検討を行い、最適な条件を決める必要がある。原理の詳細は4章-2-1を参照。



大脳基底核原基への導入

準備するもの

▶ 1) 器具・機械

- 細胞培養用プレート
6ウェルプレート (スミロン, コーニングなど)
- 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

▶ 2) 試薬

- Opti-MEM… Gibco
- 細胞用培地… Gibco neurobasal medium
グルタミン, B-27 (Gibco) などを添加, L-グルタミンは, 神経細胞などにおいて必要とされる必須アミノ酸で, 細胞の維持や培養に必要とされる栄養素, B-27は, 神経細胞の増殖および長期生存に必要な補助試薬。
- トリプシン… Difco #215240
- DNase I… シグマ・アルドリッチ社

▶ 3) サンプルなど

- マウス胎仔

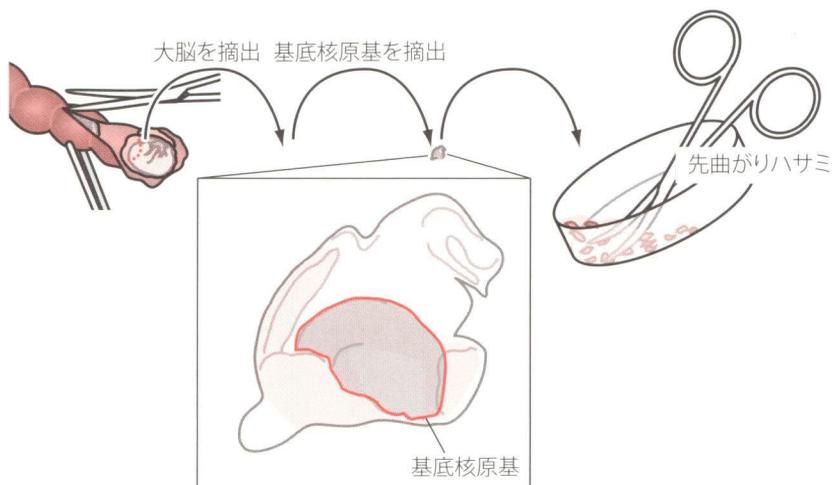
● 導入するプラスミド

1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 濃度でTEバッファーに溶解.

プロトコール

▶ 1) 細胞の調製

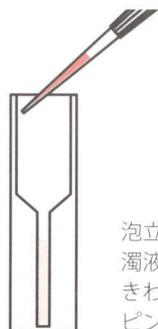
- ① マウス胎生13日目の大脳基底核原基を摘出し、小さい組織片に切り刻んだ後1.5 mLチューブに回収する



- ② 0.25%トリプシン/1% DNase Iを入れる^{a)}
③ 37°Cで7分間置く。途中で軽く攪拌する^{b)}
④ 100 μL 血清を加えて反応を止め、卓上低速遠心機にて10秒ほど遠心し、組織片を落とす
⑤ 上清を除き、500 μL のOpti-MEMを加え、15回ほどピペティングし、細胞を懸濁する
- ^{a)} 500 $\mu\text{L}/1.5\text{ mL}$ チューブ。トリプシン処理によって、接着に関与するタンパク質が分解され、細胞を分散することができる。また細胞分散中に、一部の細胞が死んでDNAを放出するので、不要な細胞の塊化を防ぐためにDnase Iを添加する。
- ^{b)} 用いる細胞によって反応時間を調整する。
・胎生期の大脳皮質や基底核原基の場合：7分
・生後の大脳皮質：15分

▶ 2) エレクトロポレーション

- ⑥ 細胞数を数えて、 1×10^6 cells/90 μL になるようにOpti-MEMを加え、キュベット電極に移す
⑦ そこに、導入するプラスミド10 μg を加えて、最終的に100 μL に調整する



泡立えないように移し、懸濁液がキュベット電極に行きわたるように、軽くタッピングする

- ⑧ キュベット電極を電極チャンバーにセットし、パルスを加える

電気条件

	電圧	パルス幅	パルス間隔	回数	減衰率
ポアリングパルス	275 V	0.5 msec	50 msec	2回	10%
トランスファーパルス	20 V	50 msec	50 msec	5回	40% 極性切替えON

- ⑨ 1分以内^③に、ピペットを使用してキュベット溶液を吸引し、あらかじめ用意しておいた細胞用培地2 mL (6ウェルプレート) に溶液を加え、37℃で2日間培養する^④

③ 弱っている細胞を早く最適環境に戻すことによって生存率かつ遺伝子導入効率を上げるため。

④ 筆者らの実験では生存率約90%、導入効率約70%となる。

2 実験条件を最適化するコツ

ポアリングパルスの電圧・パルス幅・回数を振って最適な条件を探すとよい。用いる細胞腫によっても異なるが、マウス胎生期においては生存率、導入効率とともに70%以上になるものが、最適範囲。各設定の振り幅は、電圧(260~290 V)、パルス幅(0.3~1 msec)、回数(2~3回)であるが、電圧(275 V)を固定しパルス幅と回数を検討する方法か、パルス幅と回数(0.5 msec, 2回)を固定して電圧のみを検討する方法が効果的である。

初代培養神経細胞の場合は、基本的に導入効率も低く、また細胞の状態により、同じ電気条件下で実験を行っても、結果に差が出ることが多い。そのため、細胞の状態をいかによい状態に保つかがポイントとなる。すべての工程を胎仔摘出から約1時間以内に終わらせることや、細胞分散時にトリプシンの代わりに細胞毒性の少ないパパイン(10 unit/mL)を使用することも導入効率を上げるポイントとなる。

4 章

3 エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

神経細胞へのエレクトロポレーション法

トラブルシューティング



⚠ 導入効率が低い

- 原因**
- ① エレクトロポレーション時に血清や抗生物質などが混入し、導入効率が下がっていた
 - ② トランスファーパルスの減衰率が0%
 - ③ バッファーの抵抗値を、サンプルの量など物理的条件が変わるたびに測定していないため、電流値が一定ではない

原因の究明と対処法

- ① Opti-MEMにて1~2回遠心すると改善する。
- ② 減衰率を30~50%に必ず設定すること。
- ③ 電圧などが同じ設定条件であっても、抵抗値に違いがあると測定電流値が変化するので、バッファーの抵抗値測定を毎回行い確認すること。今回の条件下での平均測定値は次の通り。

測定抵抗値：40～55 Ω（NEPA21 表示：0.040 kΩ～0.055 kΩ）



細胞の生存率が低い

- 原因**
- ①合計測定エネルギー値が高い
 - ②エレクトロポレーション前後の環境が適切ではない可能性

原因の究明と対処法

- ①ポアリングパルスの合計測定エネルギー値は〔測定電圧（V）×測定電流値（A）×設定パルス幅（sec）〕であり、その値が細胞の生存率に直結するため、各神経細胞に応じて条件検討を行うこと、本項②を参照。
- ②キュベット電極は、水滴ができるのを防ぐために氷冷せず常温放置し、実施する。細胞攪拌時や、キュベット電極に細胞懸濁液を移す際は決して泡をたてず、エレクトロポレーション終了後は早めに細胞を培地に移して培養すること。

参考文献

- 1) Kusuzawa, S. et al. : Eur. J. Neurosci., 36: in press, 2012