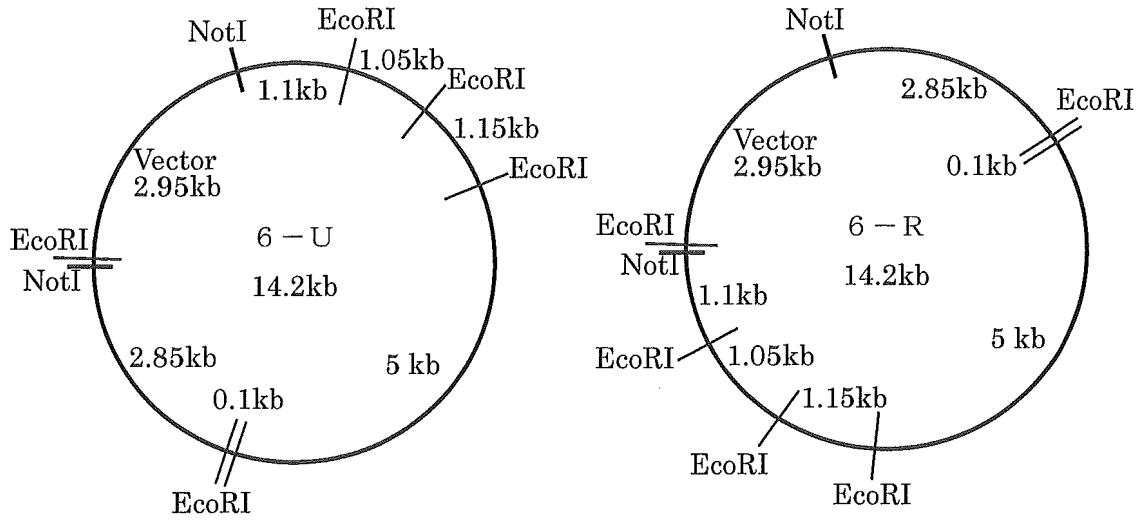


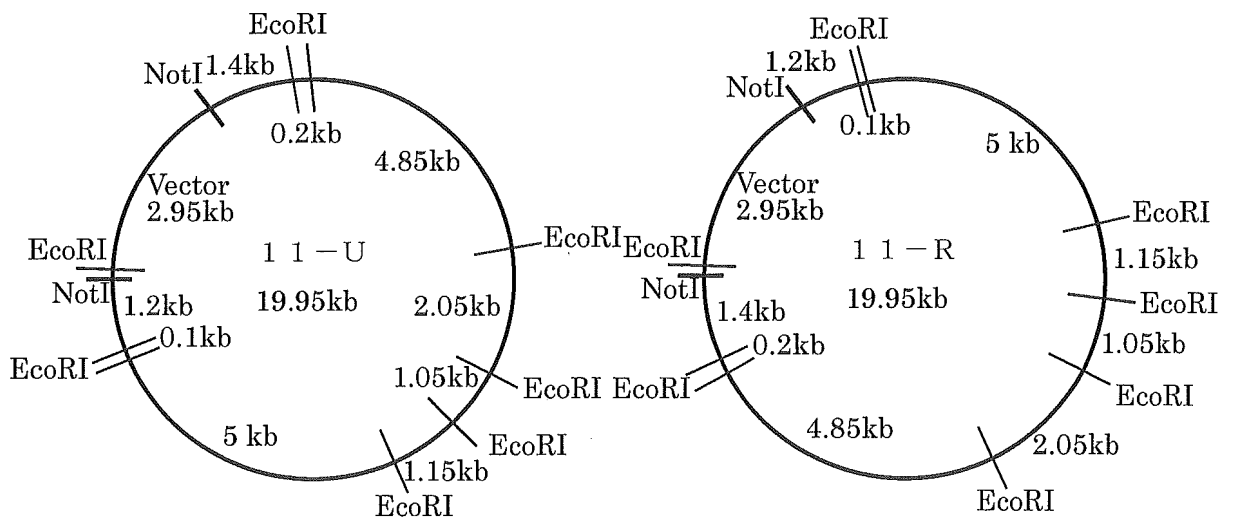
以上の結果から導き出された EcoRI によるマッピング



バンド (長い順)	Exon
5 kb	3B
4 kb	4
2.9 kb	2
1.15 kb	
1.05 kb	
0.1 kb	3A

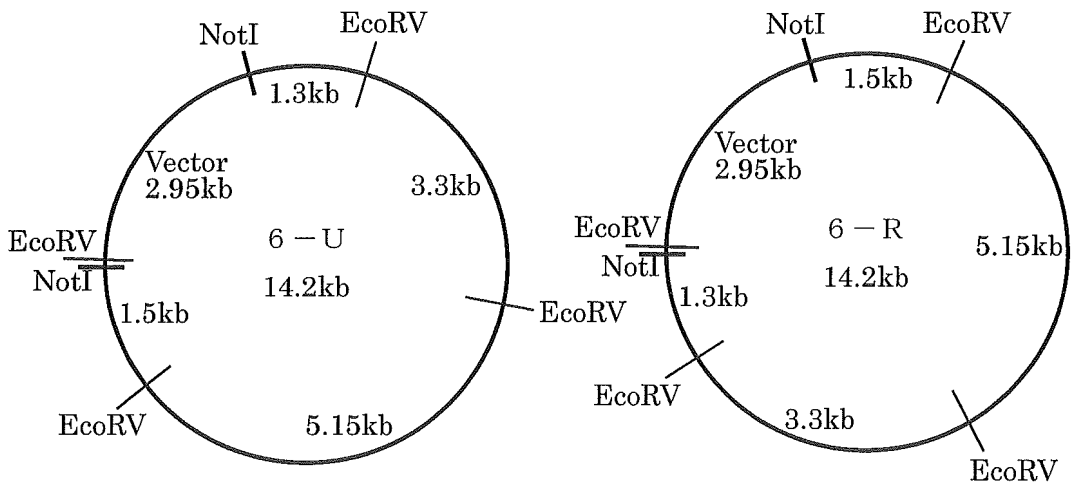
EcoRI

バンド (長い順)	Exon
5.75 kb	2
5 kb	3B
1.15 kb	4
1.15 kb	
1.05 kb	
0.1 kb	3A

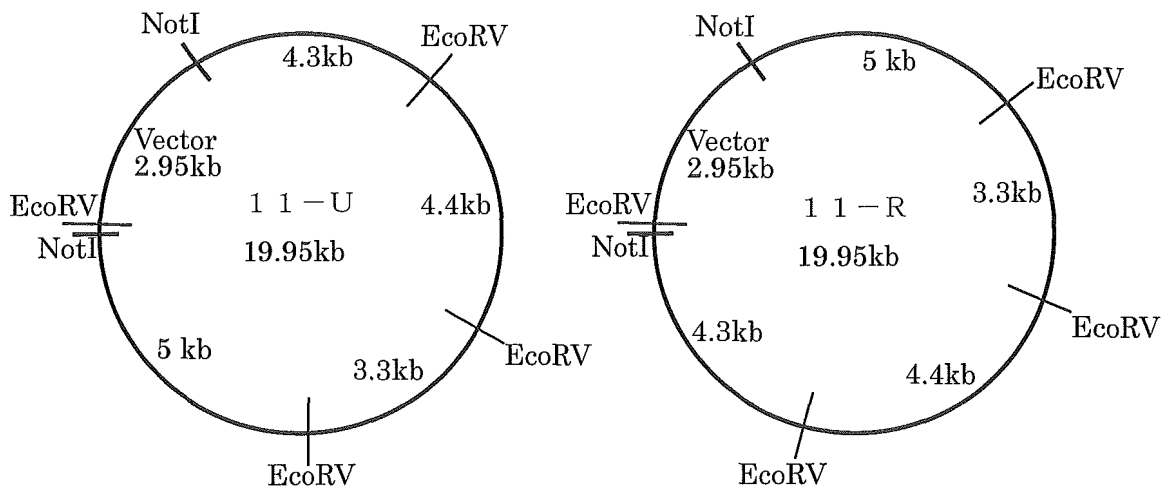


バンド (長い順)	Exon	EcoRI	バンド (長い順)	Exon
5 kb	3B		5 kb	3B
4.85 kb	5, 6		4.85 kb	5, 6
4.3 kb	7		4.1 kb	7
2.05 kb	4		2.05 kb	4
1.25 kb			1.45 kb	
1.15 kb			1.15 kb	
1.05 kb			1.05 kb	
0.2 kb			0.2 kb	
0.1 kb	3A		0.1 kb	3A

以上の結果から導き出された EcoRV によるマッピング



バンド (長い順)	Exon	EcoRV	バンド (長い順)	Exon
5.15 kb	3A, 3B		5.15 kb	3A, 3B
4.2 kb	4		4.4 kb	2
3.3 kb			3.3 kb	
1.55 kb	2		1.35 kb	4

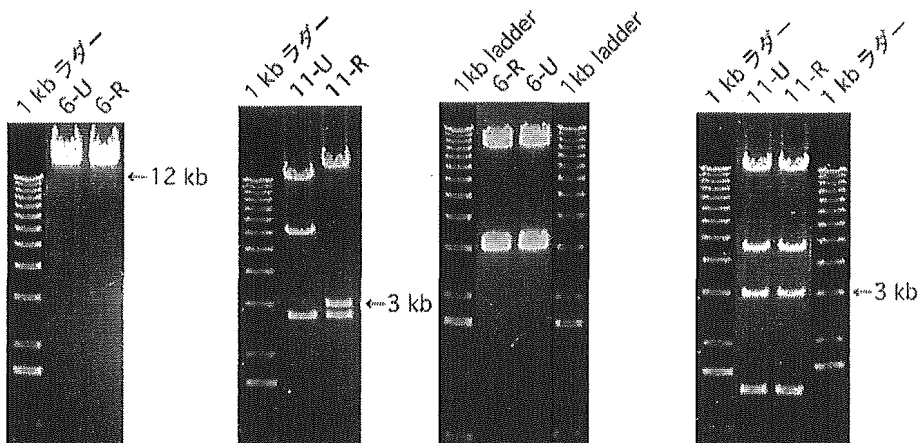


バンド (長い順)	Exon
7.1 kb	6, 7
5.05 kb	3A, 3B
4.5 kb	4, 5
3.3 kb	

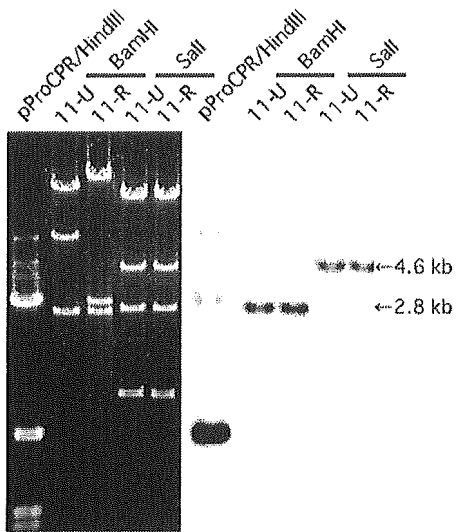
EcoRV

バンド (長い順)	Exon
7.9 kb	3A, 3B
4.5 kb	4, 5
4.3 kb	6, 7
3.3 kb	

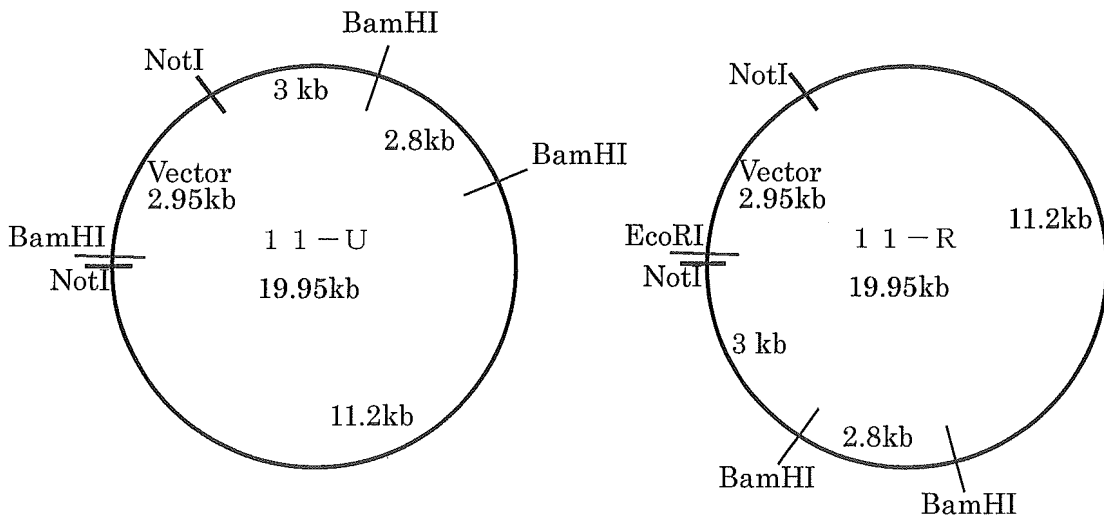
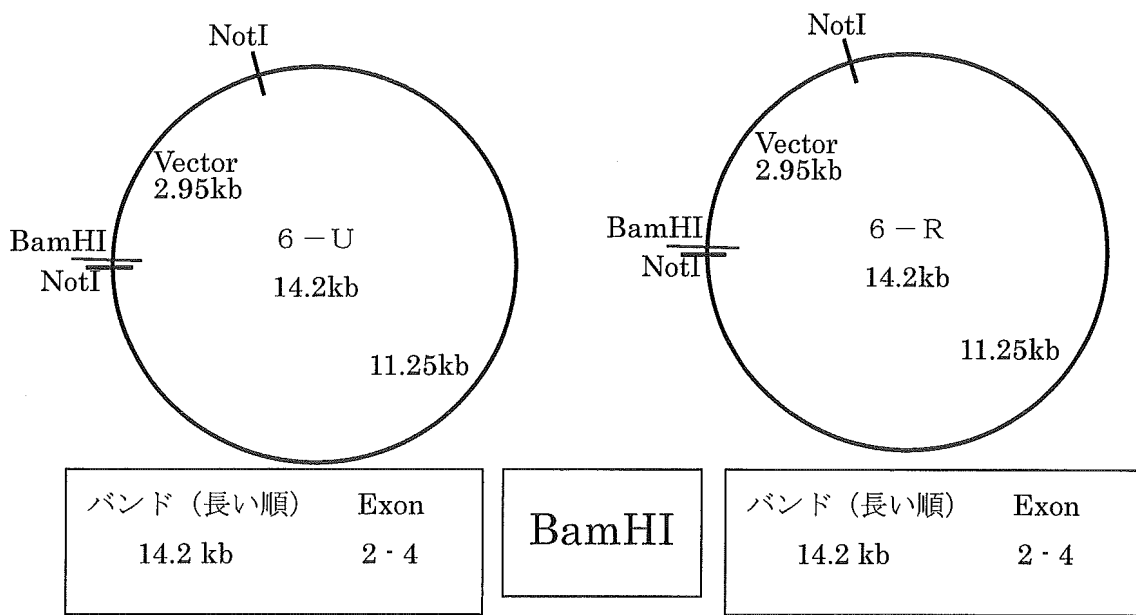
左から順にクローン 6-U とクローン 6-R を BamHI で切断した時の泳動結果、クローン 11-U と 11-R を BamHI で切断した時の泳動結果、クローン 6-U とクローン 6-R を SalI で切断した時の泳動結果、クローン 11-U と 11-R を SalI で切断した時の泳動結果

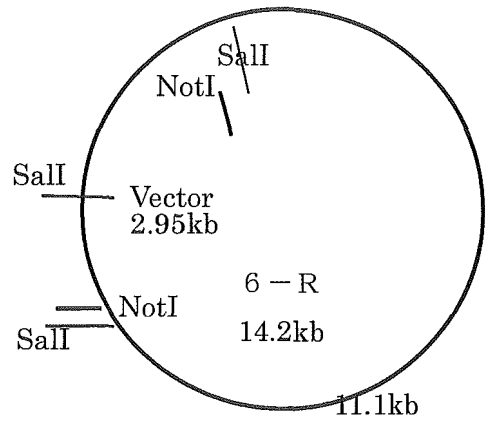
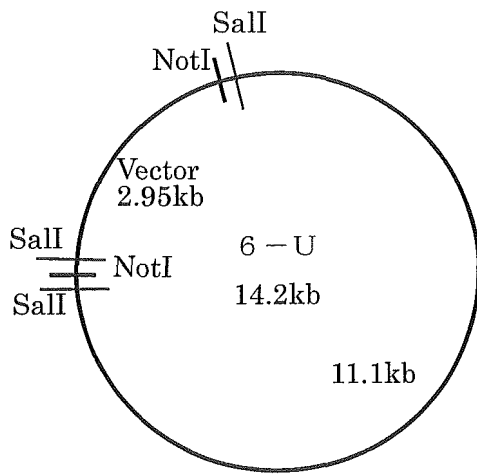


クローン 11-U と 11-R を BamHI 又は SalI 処理のサザンブロット解析結果



EtBr 染色した Exon6 のプローブ
電気泳動後ゲル によるサザン解析

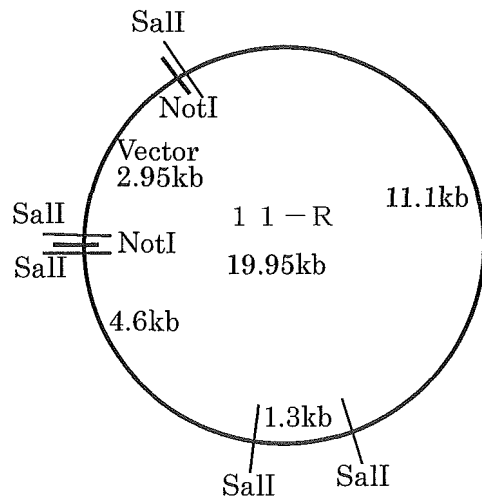
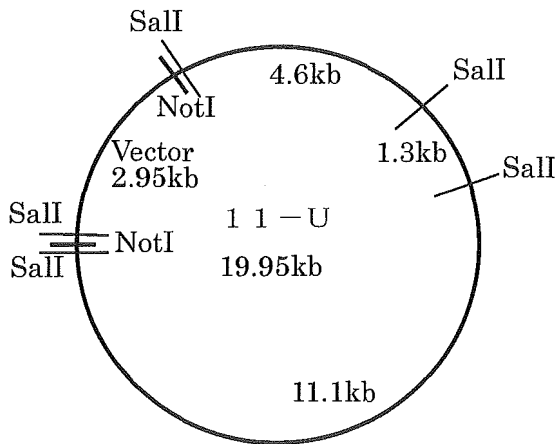




バンド (長い順)	Exon
11.1 kb	2 - 4
3.0 kb	
0.1 kb	

SalI

バンド (長い順)	Exon
11.1 kb	2 - 4
3.0 kb	
0.1 kb	



バンド (長い順)	Exon
11.1 kb	3A-4
4.6 kb	6, 7
2.95 kb	
1.3 kb	5
0.1 kb	

SalI

バンド (長い順)	Exon
11.1 kb	3A-4
4.6 kb	6, 7
2.95 kb	
1.3 kb	5
0.1 kb	

(3) ターゲティングベクター作成

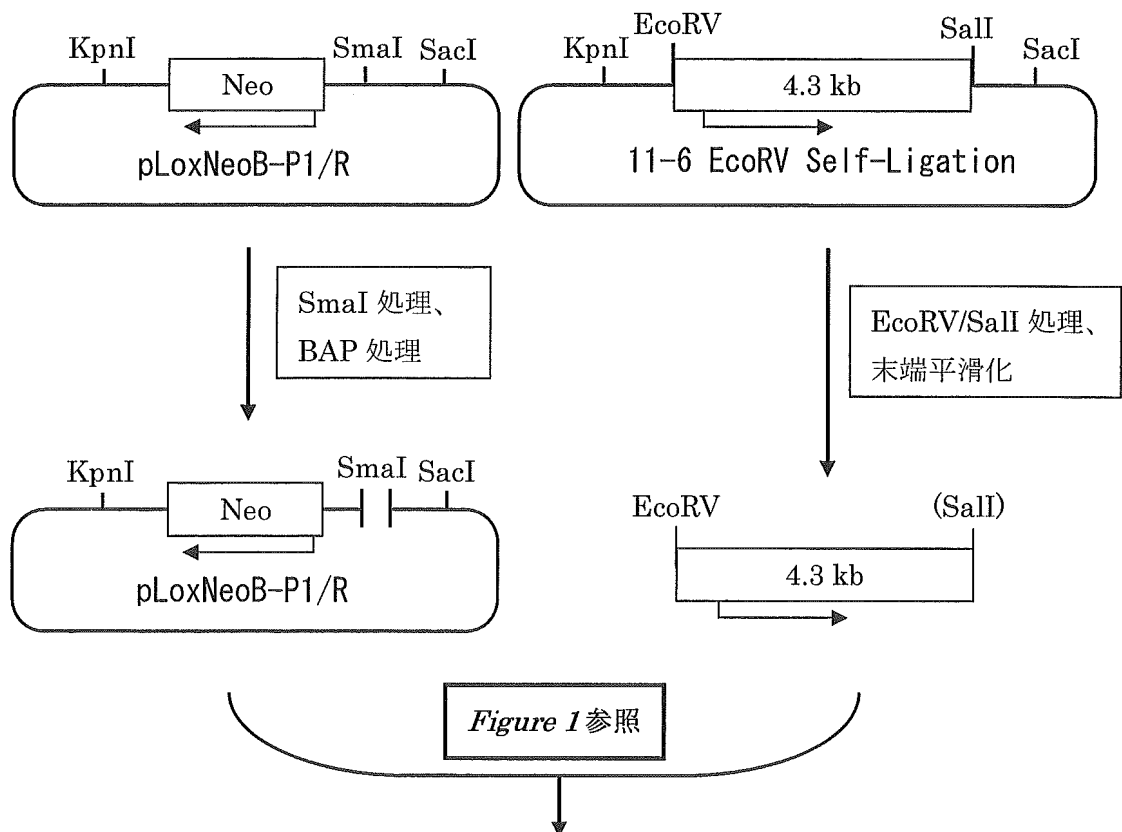
<目的>

ノックアウトマウスを作るためにはES細胞にターゲティングベクターを導入して変異ES細胞を作る必要がある。導入されたベクターがES細胞のゲノムに組み込まれるときの仕組みは遺伝子の相同組み換えを利用している。そのためネオマイシン耐性遺伝子の両側にはES細胞のゲノムと相同部分をつなげたベクターにする。このとき、一方の相同部分は1 kb 前後としてベクターが組み込まれたかどうかを確認するためのPCRで増やせるようにしておく。また相同組み換えの頻度がかなり低いので、ES細胞にベクターが正しく

組み込まれたときにだけ生き残るようにベクターにはポジティブセレクションのためのネオマイシン耐性遺伝子とネガティブセレクションのためのチミジンキナーゼ遺伝子を入れてある。ネガティブセレクションの意味は、もし相同組み換えではなく非特異的な部位にベクターが挿入された場合はチミジンキナーゼ遺伝子も同時に挿入されチミジンキナーゼが発現する。ガンシクロビル添加選択培地の中ではこの発現したチミジンキナーゼがガンシクロビルを活性化(リン酸化)し、DNA合成を妨げ死滅してしまうという原理を利用している。

<方法>

ターゲティングベクターを作成したときの手順を以下に示す。



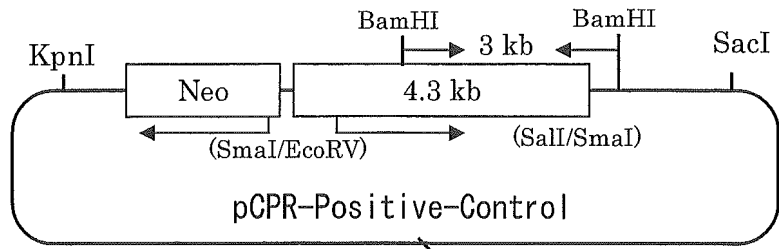


Figure 2 参照
BamHI 处理、
Self-Ligation

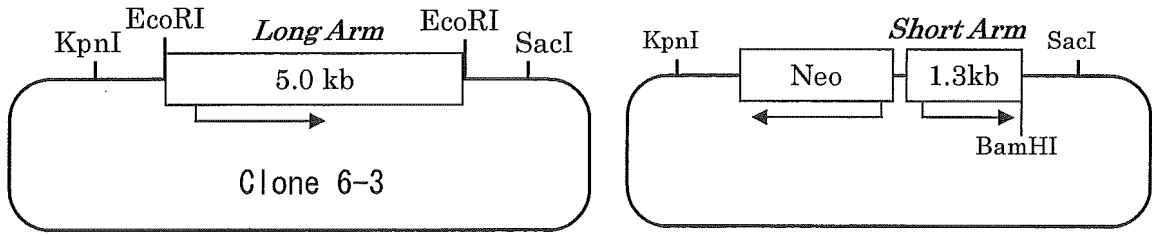
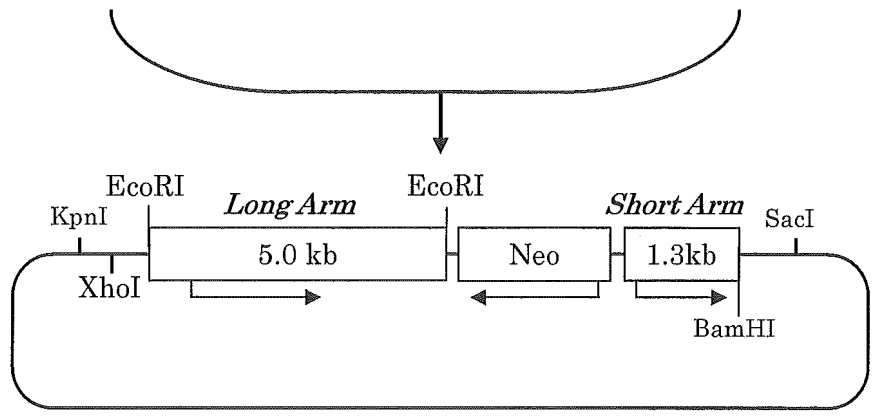
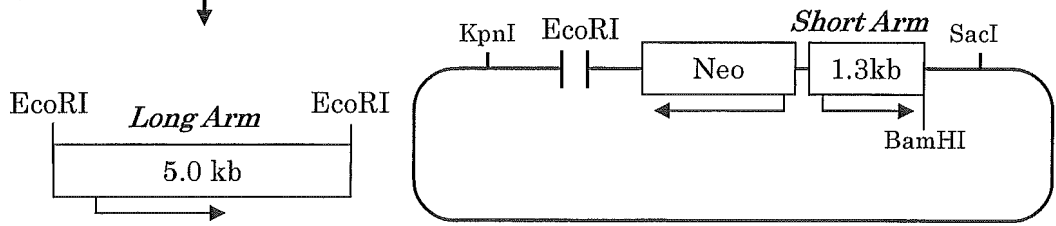


Figure 4 参照
EcoRI 处理
Figure 3 参照
EcoRI 处理、
BAP 处理



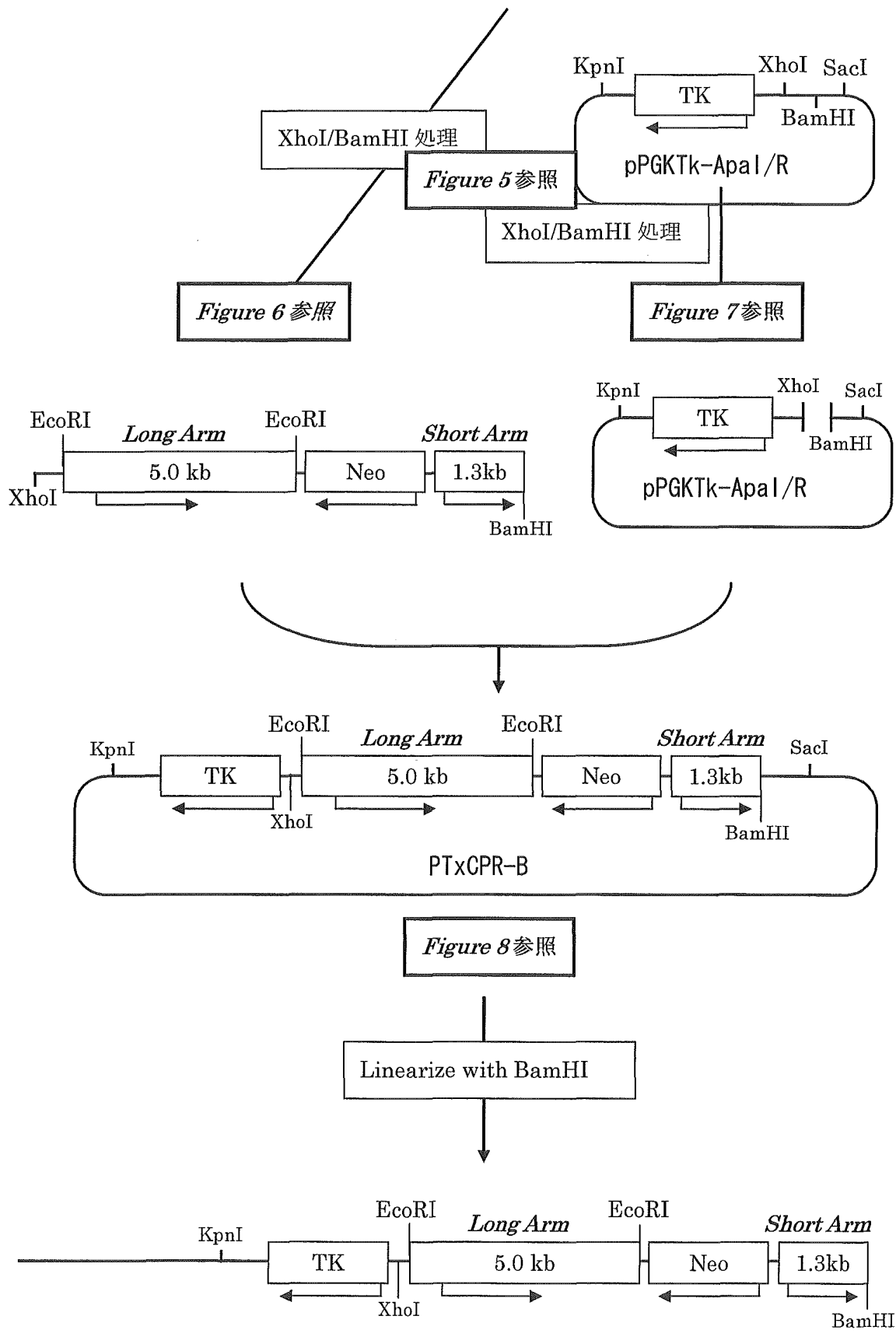


Figure 9 参照



Transfection into ES cells

<結果> 上記のフローチャートで示した各 DNA 断片の電気泳動した結果を以下に示す。

Figure 1

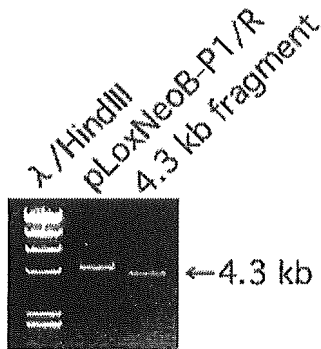


Figure 2

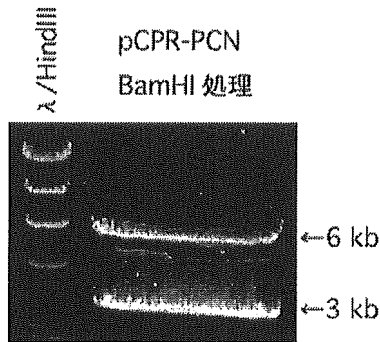


Figure 3

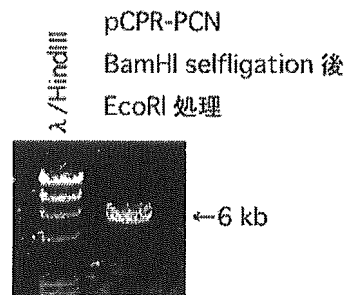


Figure 4

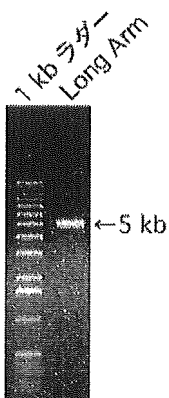


Figure 5

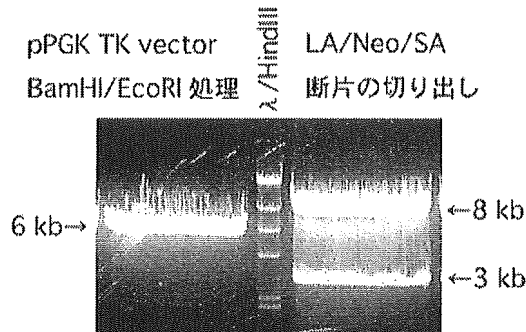


Figure 6

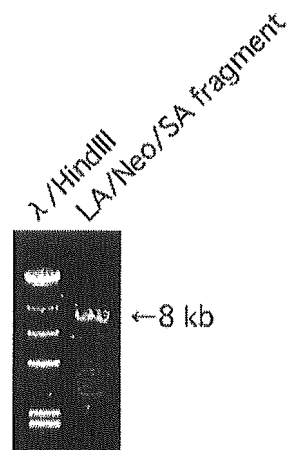


Figure 7

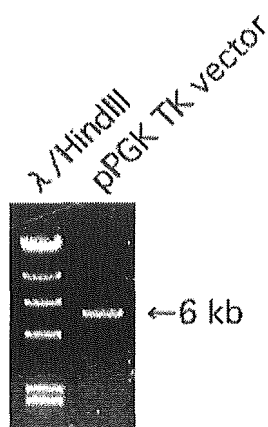


Figure 8

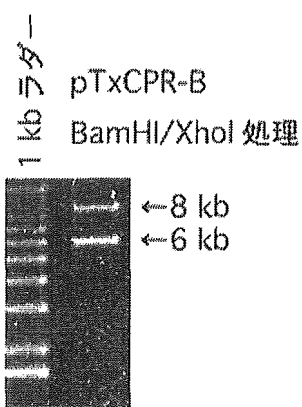
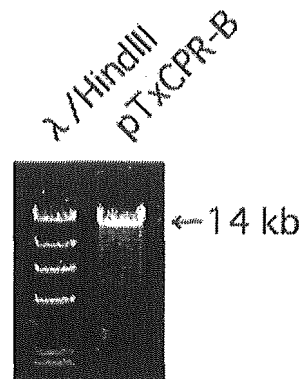
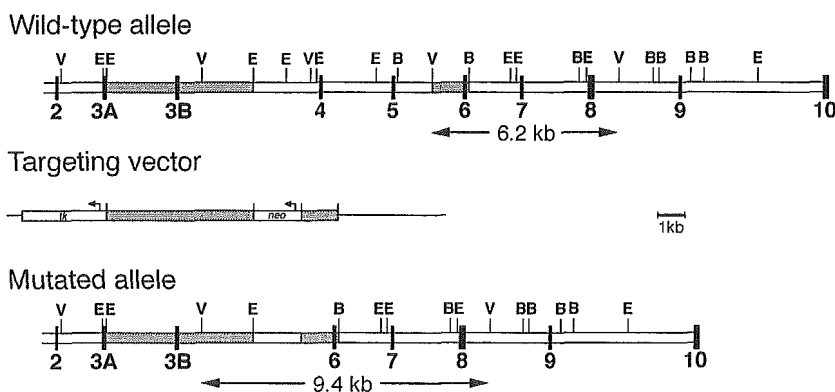


Figure 9



ProCPR 遺伝子野生型アレル、ターゲティングベクターおよび変異アレルを並べて図示すると以下のようなになった。下の図に示した 6.2kb, 9.4kb の長さの表した意味は Wild-type allele と Mutated allele

を区別することができる EcoRV で切断される DNA 断片でこの中に含まれるプローブを使ったサザンブロット解析で変異体を証明することができる。



(4) ES 細胞の培養

<概要>

ES (embryonic stem) 細胞つまり胚性幹細胞はさまざまな組織に分化する能力を秘めている未分化な細胞である。ES 細胞を培養する際、通常の細胞培養とはいくつか異なる点があります。まず第 1 点として ES 細胞は増殖を止めたフィーダー細胞

上で培養します。もう 1 点はこの細胞の特徴である未分化な状態を保持するために LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を培地中に加えて分化を抑制します。

<Medium の作成>

1. cPEF Medium
基本的な 10% Serum 入り DMEM である。勿

論 PEF 以外の細胞に使うことも可能、

1 リットル中の組成

859ml DMEM (high glucose) <Gibco BRL>

100ml heat-inactivated FCS¹ <Gibco BRL>

10ml L-Glutamine <Gibco BRL>

10ml Sodium Pyruvate <Gibco BRL>

10ml Non-essential Amino Acids <Gibco BRL>

10ml Penicillin-Streptomycin <Gibco BRL>

1ml 50mM 2-mercaptoethanol²

→0.2 μ m filter をかけて 4℃保存。

2. cES Medium

15%serum 入り DMEM で、ES cell 専用の Medium である。

1 リットル中の組成

809ml DMEM (high glucose) <Gibco BRL>

150ml heat-inactivated ES cell qualified FBS¹ <Gibco BRL>

10ml L-Glutamine <Gibco BRL>

10ml Sodium Pyruvate <Gibco BRL>

10ml Non-essential Amino Acids <Gibco BRL>

10ml Penicillin-Streptomycin <Gibco BRL>

1ml 50mM 2-mercaptoethanol²

→0.2 μ m filter をかけて 4℃保存。

3. Selection Medium

cES Medium に以下のものを加える。

1) G418 <Gibco BRL> 3ml/1000ml cES Medium (Final 0.3mg/ml)

PBS(-) で 100mg/ml 溶液を作

成し³、3ml ずつに分注して、-20℃保存。

繰り返しの freeze-thaw はなるべく避ける。

2) GANC 0.1ml/1000ml cES Medium (Final 2 μ M)

DDW で 20mM 溶液を作成し、0.2ml ずつに分注して-20℃保存。

繰り返しの freeze-thaw はなるべく避ける。

3) LIF <Gibco BRL> 1 μ l/10ml cES Medium (Final 1000U/ml)

1 vial (1ml, 約 10万円) をクリーンベンチ内で無菌的かつ慎重に開け、5本の cryogenic vial に 0.2ml ずつ分注して 4℃保存。使用直前に必要量だけ Medium に混ぜて使用する。

4. Freezing Medium (2X)

等量の cell suspension と混合して使用する。

20ml の組成

11ml cES Medium

5ml heat-inactivated ES qualified FBS <Gibco BRL>

4ml DMSO

→0.2 μ m filter をかけて 4℃保存。

5. 0.1% Gelatin

ES cell 用の PEF を蒔く前に plastic をコーティングするために用いる (30分以上)。

500ml の組成

500ml DDW (1000ml の bottle
に入れる)

0.5g Gelatin

→オートクレーブで溶かしてから
室温にし、0.2 μ m filter をかけて室温
保存。

¹ 56 $^{\circ}$ C、30分 (但し4 $^{\circ}$ Cから56 $^{\circ}$ Cに
なるまでに約15分必要)

² 原液 (14.4M) 50 μ l に DMEM 14.35ml を加
えて4 $^{\circ}$ C遮光保存。

³ 純度が低いので実効重量に換算してか
ら作成する。

<PEF 細胞を起こす>

cPEF 培地 90ml (50ml のチューブ 2 本に分
けておく) を 37 $^{\circ}$ C Waterbath で暖める。

↓

15ml チューブに 10ml だけ別に cPEF 培地
を用意しておく。

↓

-80 $^{\circ}$ Cより取り出した PEF 細胞ストックを
37 $^{\circ}$ C Waterbath ですばやく溶かす。

↓

あらかじめ用意した 10ml の cPEF 培地に
溶けた細胞懸濁液をすべて移す。

↓

4 $^{\circ}$ C、1200rpm、5分間遠心。

↓

遠心中に 150cm² Dish を 3 枚用意しておく。

↓

遠心後、培地を吸引してタッピングして
細胞を懸濁する。あらかじめ暖めておい
た 90ml の培地のうち、各チューブから 5
ml ずつ培地をとって、その培地を使って

ピペティングで細胞をさらに懸濁する。

↓

細胞懸濁液を残りの培地の入った 50ml チ
ューブに均等に分けて入れ、さらにピペ
ティングでよく混ぜる。

↓

30ml ずつ Dish に入れていく。入れ終わっ
たら CO₂ インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、CO₂ 6%)
へ静置。

<Mitomycin C Treatment & Harvest>

(目的)

ES 細胞の培養は常に MMC 処理されたフィ
ーダー細胞が敷かれた状態の上で培養な
されなければならない。このプロトコ
ールでは PEF 細胞を起こしたときにまかれ
た 150cm² Dish 3 枚から MMC 処理後に 75cm²
Flask 4 つ、10cm dish 4 枚に分けて
まかれる場合を想定してある。

(手順)

cPEF Medium を 50cc チューブ 2 本各 30ml
(150cm² dish 1 枚当たり 20ml) 入れて、
暖めておく。

↓

MiliQ 水をフィルター滅菌し、そのうち
2.5ml の注射器で 2ml を吸い、マイトマイ
シン C 1vial 中へ加えて溶かす。このと
きクリーンベンチの明かりは消してなる
べく遮光にする。

↓

溶かした MMC をすべて注射器で吸って
15ml チューブに入れる。周りをアルミ箔
で覆い遮光にする。

↓

暖めた Medium をクリーンベンチに入れて、1 ml ピペットでそれぞれ 100 分の 1 量 (0.3ml) ずつ MMC を加える。25ml ディスポピペットでピペッティングして混ぜておく。

↓

0.2 ml ディスポピペットの綿栓をピンセットで取り除いて、吸引チューブにつける。

↓

1 枚の dish を吸引して、20ml の MMC 入り Medium を加える。同様にして残り 2 枚行う。

↓ 2 時間、CO₂ インキュベーターでインキュベート

2 時間たつ 15 分前ぐらいに Harvest してまき直すための Medium を暖め始める。今回は 75cm² Flask 4 つ、10cm dish 4 枚なので、すべて 10ml なので、計 80ml、50cc チューブ 2 本各 40ml を用意した。

↓

0.1% Gelatin (4 度保存) と 75cm² Flask 4 つ、10cm dish 4 枚用意。

↓

0.1% Gelatin を各 Flask & dish に底がすべてつか分だけ入れていく。1 つにつき 8cc ぐらい入れていた。

注：時間をチェック。30 分以上置いておく必要有り。CO₂ インキュベーターに入れずにそのままクリーンベンチ内において置いても O.K.

↓

PBS (4 度保存) を出してきて、また 0.2 ml ディスポピペットの綿栓をピンセットで取り除いて、吸引チューブにつける。

↓

2 時間たったら、インキュベーターより出してきて、吸引、PBS を 12ml ずつ入れる。すべて底面を覆い洗うように円を描くように回す。同様にして残り 2 枚。それを計 4 回行う。

↓

吸引して、0.25% Trypsin/EDTA を 4 ml 入れる。残りの 2 枚も同様にして、CO₂ インキュベーターで 5 分インキュベート。

↓

冷えたままの cPEF Medium を 6 ml ずつ入れて、細胞をはがす。1 本の 50cc チューブに集める。Dish は立てておくと、下に細胞液が集まり、すべてを回収出来る。

↓

4 度、1200rpm、5min centrifuge。

↓

Medium を吸引、タッピングして懸濁。片方から 10ml、もう片方から 5ml Medium とって、懸濁した細胞液の入ったチューブに入れて、ピペッティングでよく混ぜる。

↓

元のチューブに元の量戻して、ピペッティングする。

↓

Gelatin 入れてから 30 分以上たっていたら、Gelatin を吸引して、10ml 吸って戻したチューブから 10ml ずつ 75cm² Flask へ入れていく。5ml 吸って戻したチューブからは 5ml ずつ 10cm dish へ入れていく。均等になるようにする。

↓

CO₂ インキュベーターに戻す。

<ES 細胞を起こす>

6well plate の 1 well 分に相当する 6 ml の cES Medium を温め始める

↓

温まったら、冷えた cES Medium を 10 ml ぐらいを 15 ml tube にいれて、スポイトを用意。

↓

ES 細胞クライオチューブ 1 本を液体窒素から取り出し、すぐに 37°C 恒温槽で振って溶かす。

↓

溶けたらエタノールを吹き付けクリーンベンチに入れて、スポイトであらかじめ 10ml 入れた Medium 中に移す。もう一度、クライオチューブを Medium で洗って入れる。

↓

1200rpm, 5min, 4°C で遠心。

↓

遠心中に温めておいた medium に LIF を 1 ml 入れてピペティングして混ぜておく。

↓

遠心後、medium を吸引、タッピングでよく懸濁してから LIF を入れた Medium をいれ、ES 細胞がバラバラになるようにしっかりとピペティング。

↓

パストツールピペットにチップ（ピペットマンのもの）をつけて用意してあった MMC 処理後の 6 well plate にまいた PEF のプレートを取り出し、1 well 分の medium を吸引。そこに ES 細胞の懸濁液を加えてインキュベーターへ入れる。

<ES 細胞の継代>

顕微鏡で ES 細胞の発育の具合を見る。

顕微鏡の設定：フィルター Ph1；対物レンズ 10 倍

注：細胞が均等にある方がよく、もし不均一ならば一番、密度の濃い所に合わせて継代しなければならなくなる。見えるコロニーはいくつもの ES 細胞が固まっている、表面がごつごつしているものはよくない。小さいコロニーがいくつもあるほうがよい。

↓

PEF の状態を見る。マイトマイシン C で増殖とめて用意しておく。

顕微鏡の設定：フィルター PhL；対物レンズ 4 倍

↓

ES 用 Medium が 6 well プレートの 1 well 当たり 6 ml 必要。75cm² フラスコでは 20ml（細胞多いときは 40ml）必要。継代するために必要な量の ES 用 Medium を 50cc チューブに入れて 37 度 Waterbath で暖め始める。

↓

Trypsin/EDTA と吸引用のパストツール、Trypsin/EDTA を加えるためのディスプレイットを用意する。

↓

継代する ES 細胞の Medium を吸引。6 well プレートの 1well 当たり 1 ml の Trypsin/EDTA を加える。75cm² フラスコでは 4 ml 必要。

↓

37 度 CO₂ インキュベーターで 5 分インキュベート。

↓

暖めている Medium にピペットマンを使っ

て1万分の1量のLIFを加える。10mlピ
ペットでよくピペッティング。

↓

PEFが入ったwellにLIF入れたES用
Mediumを半分ほど入れておく。

↓

50mlチューブ、ディスポピペット用意。
冷えたES用Mediumを出してきて、5分
たってはがれたES細胞の1well(6well
plate)に2ml加える。75cm²フラスコに
は6ml必要。よくピペッティングして混
ぜる。3mlすべてを50mlチューブへ入れ
る。さらにピペッティング。

注：よくピペッティングして、ES細胞を
バラバラにすることが肝心。

↓

4度、1200rpm、5min centrifuge

↓

遠心後、吸引して十分にタッピング。残
りのES用Mediumを加えて、十分にピペ
ッティング。

↓

well全体に懸濁したES細胞をまく。必ず
均一にES細胞が生えるようにする。

↓

CO₂ インキュベーターへ戻す。

(5) トランスフェクション～Positive and Negative Selection

<Transfection of CPR-PCN DNA into ES
cells by electroporation>

Passageの2時間前にMedium changeを行
っておく。

ES用Mediumを暖め始める(1サンプル
10cm dish 2枚、1枚10ml必要)

↓

Leave cuvetts on ice(1サンプルにつ
き1つ)

↓

Suck medium completely and add 4 ml
Trypsin/EDTA solution per a 75 cm²
flask.

↓ Incubate for 5 min in the CO₂
incubator

Add 6 ml cold cES medium and mix well.

↓

Collect ES cell suspension into one 50
ml-tube and mix well.

↓

Centrifuge at 12000 rpm for 5 min at 4
° C.

↓

Resuspend in 10 ml plain DMEM.

↓

Take 40 μl cell suspension and add 360
μl trypan blue solution in a 1.5
ml-tube.

Mix well and count cell number.

9マスのうちの1マスを2回数えた。

例：(125+99)/2=112 112*10⁴*10
cells/ml=1.12*10⁷ cells/ml 全細胞数
1.12*10⁸ cells

5*10⁷ cells/mlに合わせるので、1.12*10⁸
/ 5*10⁷ =2.24 mlとする。

↓

Centrifuge at 12000 rpm for 5 min at 4
° C.

↓

Suck medium, tapping and add 1ml plain

DMEM. 2ml ピペットで吸ってみると、1.5 ml だったので、さらに 0.7 ml plain DMEM を加えた。Mix well.

↓

Put 0.4 ml (2×10^7 cells) cell suspension and $10 \mu\text{g}$ linearized control DNA into one cuvette. (1 サンプルにつき 1 つ)

注：キュベットは金属の部分は電極なので、触れないように上の方だけを持つ。サンプルを入れるときには壁につかないように下の方までピペットの先を入れるようにする。

↓

ディスポのスポイトでよく混ぜる。

↓

Leave cuvettes on ice for 10 minutes.

↓

もう一度、ディスポのスポイトでよく混ぜる。

↓

左から 0.3kV, $0.125 \mu\text{F}$, TIME CONSTANT 赤くなっているのを確認。High cap MAX まで、キュベットを向きを正しくしてセット。2つの赤いボタンを同時に押して、音がなったら止める。これをもう一回。

↓

Leave cuvettes on ice for 10 minutes.

↓

この間に、LIF を暖めていた Medium に混ぜておく。MMC 処理した PEF の dish を取り出し、サンプルが分かるようにラベルして、吸引、LIF 入れた Medium を各 9.5 ml ずつ入れておく。

↓

10 分後、各キュベットに残りの LIF 入り Medium を入れて、スポイトですべて吸っ

て、各サンプル 2 枚の dish に全体的にまく。

<Positive and Negative Selection>

Transfection の 24 時間後、G418 と Ganciclovir を含んだ Selection Medium に交換する。コロニーをピックアップするまで培地は G418 と Ganciclovir を両方含んだ Selection Medium を使用する。その後は G418 だけ入った Medium を使えばよい。培地交換は一日一回行う。

(6) 変異体 ES 細胞クローンの単離

<コロニーをピックアップする>

(目的)

トランスフェクション後の Positive and Negative Selection でも生き残ってきたコロニーをピックアップして 96 well plate にまきなおす。

(手順)

このプロトコールは Positive Control 用のコロニーを 24 クローン取る条件で記載されている。

G418 cES Medium を 20ml 37°C waterbath で 温めはじめる (1 コロニー当たり 200ul 必要で 24 コロニー分 * 3 サンプル = 14.4ml だが多めにして)。

↓

CO_2 インキュベーターより selection かけた ES 細胞の Dish 1 枚を取り出して、トランスイルミネーターの上でコロニーと思われる小さな白い点のある部分を Dish の下から黒ペンで丸をつける。24 コロニー以上、丸をつける。

Dish がふたと一致している事を示す 1 本線をペンで書いておく。

↓

顕微鏡上で先ほど印をつけたコロニーで、ちゃんと見えそうなコロニー（死にかけていなくて、分化もしてないもの）に相当する蓋の部分にも丸を書いて、さらにそのコロニーの下の丸には線を引いてマークしておく。

暖めていた G418 cES Medium に LIF を 2 μ l 加えて、ピペッティングで混ぜる。

そのうちの 15ml を使って、150 μ l に合わせた 8 連ピペットで MMC 処理した MEF の 96 well plate の端 3 列分を cPEF から LIF 入り G418 cES Medium に置換。同様に残り 2 枚も。残った Medium はまた使うので 37 $^{\circ}$ C Waterbath に入れて暖めておく。

↓

底の浅い 2 つの発泡スチロールの箱を用意。しっかりと氷を敷き詰めて、アルミ箔をかけて、1 つはプラッテに、もう 1 つはクリーンベンチへ入れる。実体顕微鏡をクリーンベンチ内に入れる。丸底の 96 well plate を 2 枚用意。

Trypsin/EDTA をクライオチューブに 2ml とって (1 well 25ul * 72 well 分)、氷箱にさしておく。

連続分注できるピペットマンで底の丸い 96 well plate 1 列に 25ul ずつ Trypsin/EDTA を分注。もう一枚、同じようにして、一枚をプラッテの氷箱上に、もう一枚はクリーンベンチ内の氷箱上に置く。

PBS を出してきて、丸印をつけた Dish を 1 枚出してパスツールピペットで吸引。10ml PBS を入れ洗浄。また吸引して今度

は 20ml PBS を入れて実体顕微鏡の上に乗せる。ちょうどよく見えるように顕微鏡をセット (接眼レンズ 5 倍)。

↓

1 人が P20 を 10ul に合わせて、チップをつけてチェックのついた丸のコロニーを見ながら、周りの MEF をはがしてコロニーを吸い上げる。このとき、少し PBS を吸っておかないとチップの先が顕微鏡下では見えないので注意。吸ったらクリーンベンチ内の氷箱上においてある 96 well plate の Trypsin/EDTA の入った 1 列の上から順にピペッティングして入れていく。必ず入れたら、ペンで well にマークをつける。チップはコロニーごとに変えること。

8 つのコロニーを取り終わったら、その plate を CO₂ インキュベーターに入れて 5 分置く。

同様にしてもう一枚の Trypsin/EDTA の入った plate にも 8 つのコロニーをとっていく。

↓

もう一人がコロニーをとって CO₂ インキュベーター内で 5 分たった plate と PEF の入った 96 well plate を出して、コロニーが入った 8 つの well に 50 ul ずつ、暖めていた LIF 入り G418 cES Medium を入れる。8 連ピペットマンを 60ul に合わせて、よくピペッティングで細胞をバラバラにする。そのすべてを LIF 入り G418 cES Medium に置き換えられた PEF の well に加える。このとき、列を間違えて入れないこと。

加え終わってなくなった底の丸い plate の 1 列には縦に黒ペンで線を引いてもう

移し終わったことが分かるようにする。

次のための Trypsin/EDTA を終わった列から間に 1 列おいて、また 25 μ l ずつ連続分注ピペットマン使って、Trypsin/EDTA を 25 μ l ずつ入れていく。入れたら氷箱上に置く。

↓

2 人で上記のようにすべて取ったコロニーが MEF 上にまきおわるまで繰り返す。

<ピックアップ後のクローンを 24well plate と 96well plate にまきなおす>

(目的)

96 well plate は変異体のクローンを調べるための PCR 用に、一方、24 well plate は 96 well plate にまいた ES 細胞が PCR でチェックを受けて、どのクローンが変異体であるか分かった後に一部を凍結ストックに、残りは passage に使用する。

(手順)

ピックアップしたコロニーの入った 96 well plate を鏡検。コロニーが大きく、passage が必要な well にペンで印をつける。

↓

G418 cES medium を必要な量だけ温め始める。必要量は (96 well plate 中の passage の必要な well 数) \times (24well plate に必要な 2 ml + 96 well plate の trypsin 反応をとめるための 150 μ l + 培地交換用 150 μ l) + α となる。

↓

あらかじめ用意してある MMC 処理後の PEF がまいてある 24 well plate と 96 well plate に番号をつけておく。

↓

温めていた G418 cES medium に LIF を 1 万分の 1 量加える。

↓

PEF がまいてある 24 well plate と 96 well plate の Medium を吸引して、LIF 入り G418 cES medium に置換。24 well plate には 2 ml ずつ、96 well plate には 150 μ l ずつ入れる。

↓

Passage する well の Medium を吸引して Trypsin/EDTA を 30 μ l ずつ加える。

↓

37°C、5 min インキュベート

↓

Trypsin を入れた well に LIF 入り G418 cES medium を 150 μ l ずつ加える。

↓

P200 のピペットマンを 120 μ l に合わせて well をよくピペッティング。このまま 120 μ l を用意した 96 well に番号を間違えずに入れる。残りを用意した 24 well plate に入れる。

↓

インキュベーターに戻す。

<PCR の条件決定>

(目的)

今回は PCR の Positive Control となるように PCN-CPR を transfection した ES 細胞を使って PCR がうまく動いてターゲットベクターが導入された ES 細胞を捕らえられるように条件を決定する。

(手順)

96well plate で培養してある ES 細胞で 50%以上コンフルエントな well に印をつ

ける。

↓

Lysis buffer に proteinase K を 60 µg/ml になるように加え、吸引した well に 100 µl ずつ加える。

↓

2～3分、室温でインキュベート

↓

各 well からピペット p200 を使って底から細胞をはがすように混ぜながら 4～5 回ピペッティングして攪拌する。

↓

あらかじめ番号をつけた PCR チューブに移す。

↓

サーマルサイクラーを以下のようにセットして、PCR チューブを入れて実行。
55°C、70min→100°C、10min→4°C

↓

今回は条件を決めることが目的なので、すべて 1 本にまとめてよく混ぜてから、100 µl ずつ分注して使用するまで-30°C 保存。

今回使用するプライマーは NEO/4.3 368+ と NEO/4.3 1775- という組み合わせ。振ってみる条件としては MgCl₂ 濃度を 6 条件、アニーリング温度を 2 条件で行う。

PCR Premix---必要な本数分+1 を用意する

	1 本分
10XPCR Buffer (Mg free)	5 µl
dNTP mixture	5 µl
DDW	10 µl
Total	20 µl

MgCl ₂ 濃度	0.75	1	1.5	1.75	2	2.5
PCR premix	各 20 µl					
25mM MgCl ₂	1.5 µl	2 µl	3 µl	3.5 µl	4 µl	5 µl
H ₂ O	3.5 µl	3 µl	2 µl	1.5 µl	1 µl	0 µl
NEO/4.3 368+	各 2.5 µl					
NEO/4.3 1775-	各 2.5 µl					
Lysate	各 8 µl					
Total	各 38 µl					

Taq solution	1 本分
rTaq	0.25 µl
DDW	11.75 µl
Total	12 µl

94°Cになったところで 12 µl の Taq solution を加える。

94°C、5 min

↓

94°C、1 min

60°C or 62°C、1 min 30sec

} X 30 cycles