

## 哺乳類細胞の抗生物質選択のための 用量反応曲線（キルカーブ）プロトコール

抗生物質に対する哺乳類細胞の感受性は、細胞の種類によって異なります。外来遺伝子または shRNA を発現するコンストラクト等の目的のDNA配列を導入した安定した細胞株を作製するには、目的のDNA配列の導入されていない細胞を殺すために必要な抗生物質の最小濃度を決定することが重要です。抗生物質の選択は、通常、トランスフェクションまたは形質導入の 24 ~ 48 時間後に始めます。以下のプロトコールは、哺乳類細胞を選択するために必要な抗生物質の濃度を決定するための一般的なガイドラインを提供します。

### 必要な材料

- マルチウェル組織培養プレートまたは組織培養皿
- プラスミド DNA またはレンチウイルスベクター上の耐性遺伝子に特異的な抗生物質。このプロトコールで使用される例
  - ブラスタサイジンS（英：Blasticidin S、Fisher Scientific、Cat#: BP2647-25; InvivoGen、Cat#: ant-bl-1）
  - ピューロマイシン（英：Puromycin、GE Life Sciences HyClone、Cat#: SV30075.01; InvivoGen Cat#: ant-pr-1 Fisher Scientific、Cat#: BP2956-100）
- 増殖培地: 使用する細胞の維持および継代に推奨される細胞培養培地（血清またはサプリメントを含む）
- 選択培地: 細胞選択に適した濃度の抗生物質を添加した増殖培地

### 接着細胞における抗生物質選択のための用量反応曲線（キルカーブ）のプロトコール

#### 1日目

その後のトランスフェクションまたは形質導入手順で使用されるのと同じ細胞型と相対的な細胞密度を使用して、適切な条件下で細胞をプレートし、一晚培養します（例えば、5% CO<sub>2</sub> で 37°C）。

注意: 抗生物質の選択が開始される日に 25 ~ 50% コンフルエントになるように十分な数の細胞を播種します。トランスフェクションまたは形質導入（24 ~ 48 時間）の後、細胞は通常、継代する必要があります。

#### 2日目

完全な増殖培地を、さまざまな濃度の抗生物質を添加した選択培地に置き換えます。抗生物質を添加していない増殖培地で培養した細胞を、抗生物質未処理のコントロールとします。

注意: 哺乳動物細胞の一般的な抗生物質使用濃度範囲は、ピューロマイシンでは 0.5 ~ 10 µg/mL、ブラスタサイジンでは 1 ~ 20 µg/mL です（図 1）。

#### 4~15日目

- 顕微鏡を使用して毎日細胞を監視し、生存細胞のパーセンテージを観察します。使用する抗生物質に応じて、ほとんどの細胞株で 2 ~ 15 日で最適な効果が得られます。
  - ピューロマイシン: 2 ~ 7 日
  - ブラスタサイジン: 3 ~ 15 日
- 約 2 ~ 3 日ごとに、培地を、試験する抗生物質濃度の範囲を含む新しく調製した選択培地と交換します。
- 使用する抗生物質の最小濃度は、抗生物質による選択開始から 2 ~ 15 日以内に細胞を 100% 死滅させる最低濃度です。

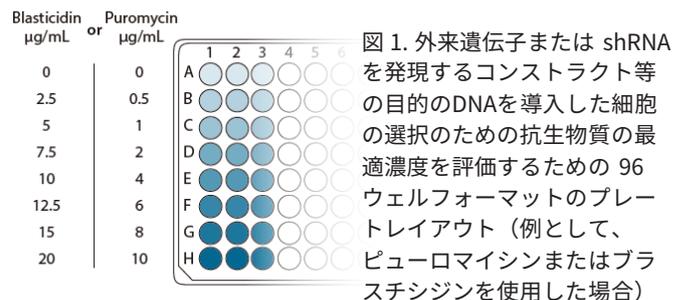


図 1. 外来遺伝子または shRNA を発現するコンストラクト等の目的のDNAを導入した細胞の選択のための抗生物質の最適濃度を評価するための 96 ウェルフォーマットのプレートレイアウト（例として、ピューロマイシンまたはブラスタサイジンを使用した場合）

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社  
[horizondiscovery.com/contact-us](http://horizondiscovery.com/contact-us)

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc.. All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコルを元にした日本語版です。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

B051-2110-v2