

PA-Cre cKO/cKI細胞用プロトコル例

株式会社セツロテック

◆ 始めに

本資料は、光誘導型Cre(PA-Cre)を用いたコンディショナルノックアウト(cKO)/コンディショナルノックイン(cKI)細胞用の「プロトコル例」です。細胞条件・試験環境等により調整が必要ですので、参照の上、最適化を実施して下さい。

◆ 目次

1. 実験環境
2. 使用備品の遮光対応
3. 保存・輸送
4. 光照照射装置の準備①②
5. 光照射実験
6. 引用論文情報
7. 協力機関情報

1. 実験環境

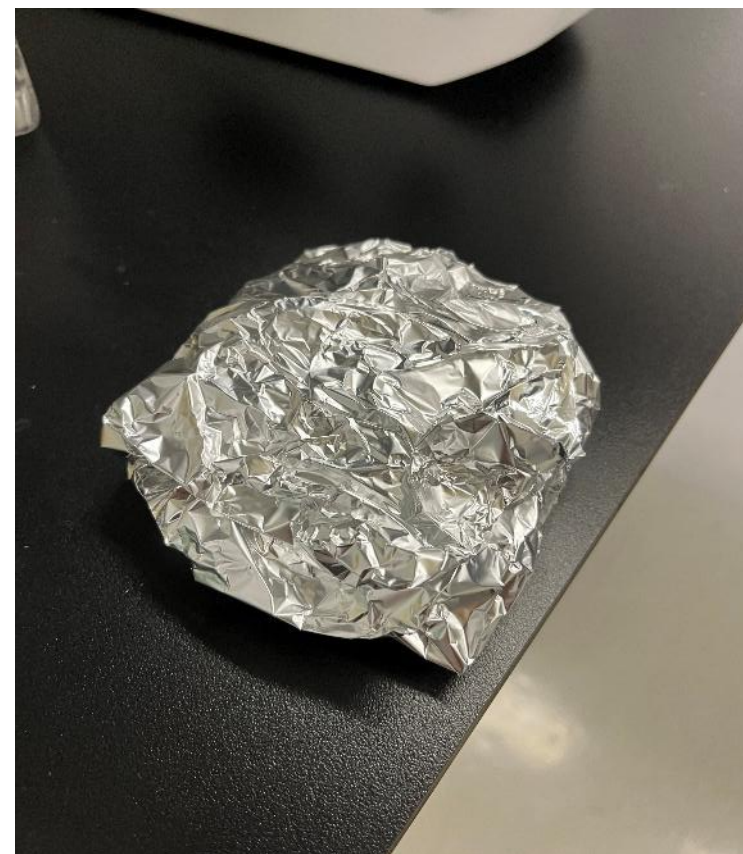
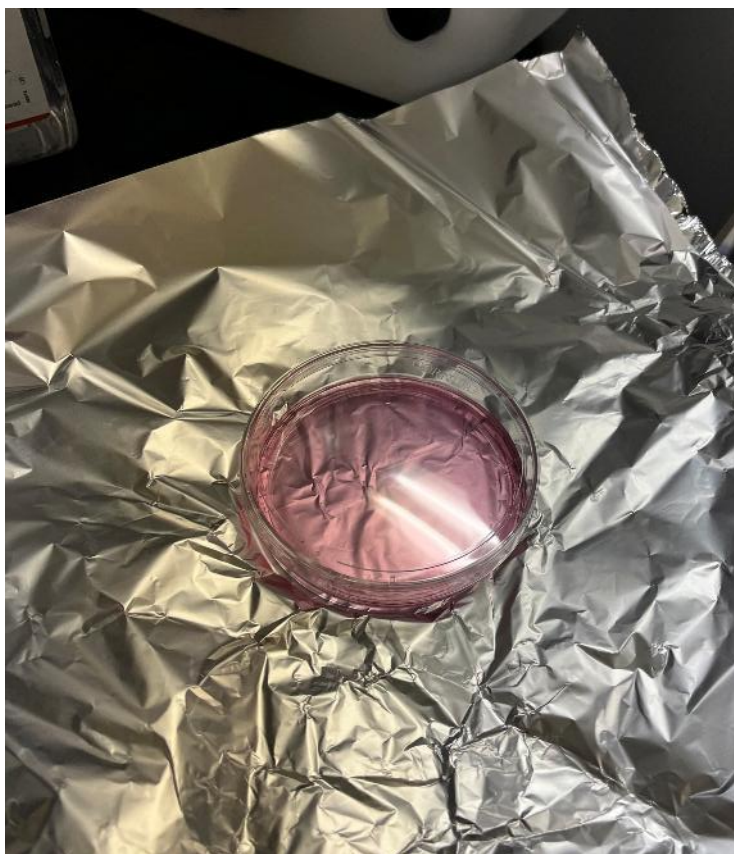
- 作業をする周辺の蛍光灯は消灯し、PA-Cre細胞に直接強い光が当たらないようにする。しかし、手元が見える状態にするために、離れた場所の蛍光灯を点灯させることは構わない。
- PA-Creは500nmより長い波長には反応しないため、オレンジ色や赤色の光はセーフライトとなる。これらの波長のLED灯下での作業が望ましい。
- オレンジ色のセーフティーライト情報
 (例) OptoCode社製
 LED590-100STND 波長590 nm
 調光ユニット:PWR-CNRL
- 安全キャビネット内も消灯の上、作業をする事。
- 不測の光照射を避けるため、PA-Creを用いた試験を実施中であることを周囲に注意喚起する。部屋の扉に「消灯中」の案内や、CO₂インキュベーターに「光照射実験中」などの案内をすることが望ましい。



引用URL: https://www.optocode.co.jp/level4/FL/HTML/FL6_2.html

2. 使用備品の遮光対応

- PA-Cre細胞の入ったディッシュやプレート等は、アルミホイルで覆うことで、遮光状態を作る。
- PA-Cre細胞を播種する前から、予めディッシュやプレート等をアルミホイルで覆い、遮光できるようにしてから試験を開始する事。
- アルミホイルで密閉してしまうと、気体交換(CO_2 、 O_2)を妨げてしまう。気体が入るように軽く覆う事が望ましい。

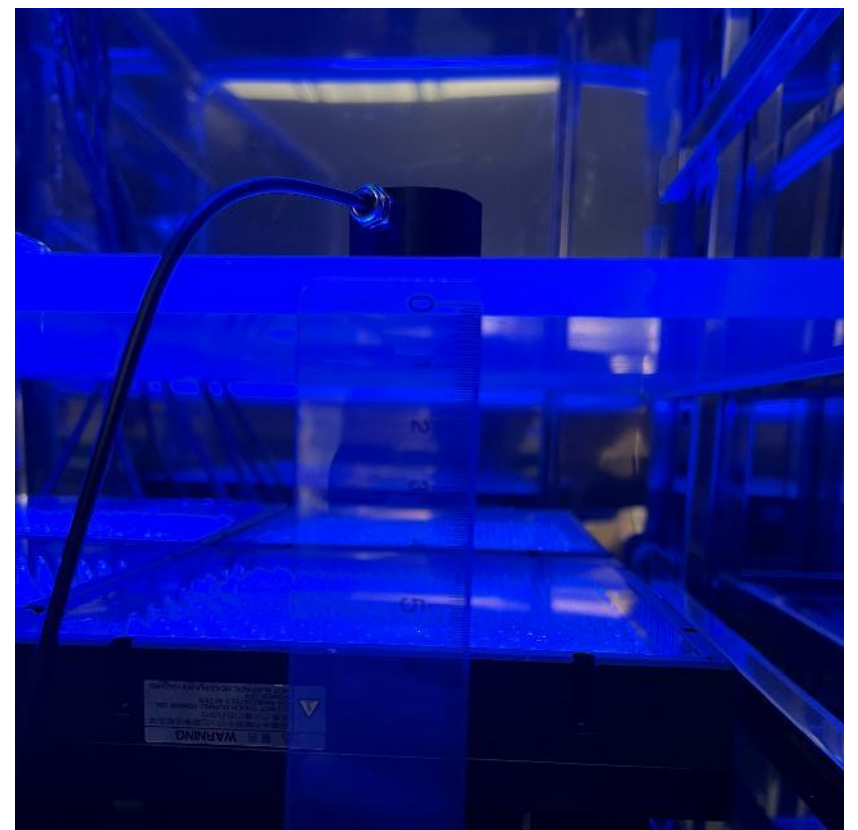
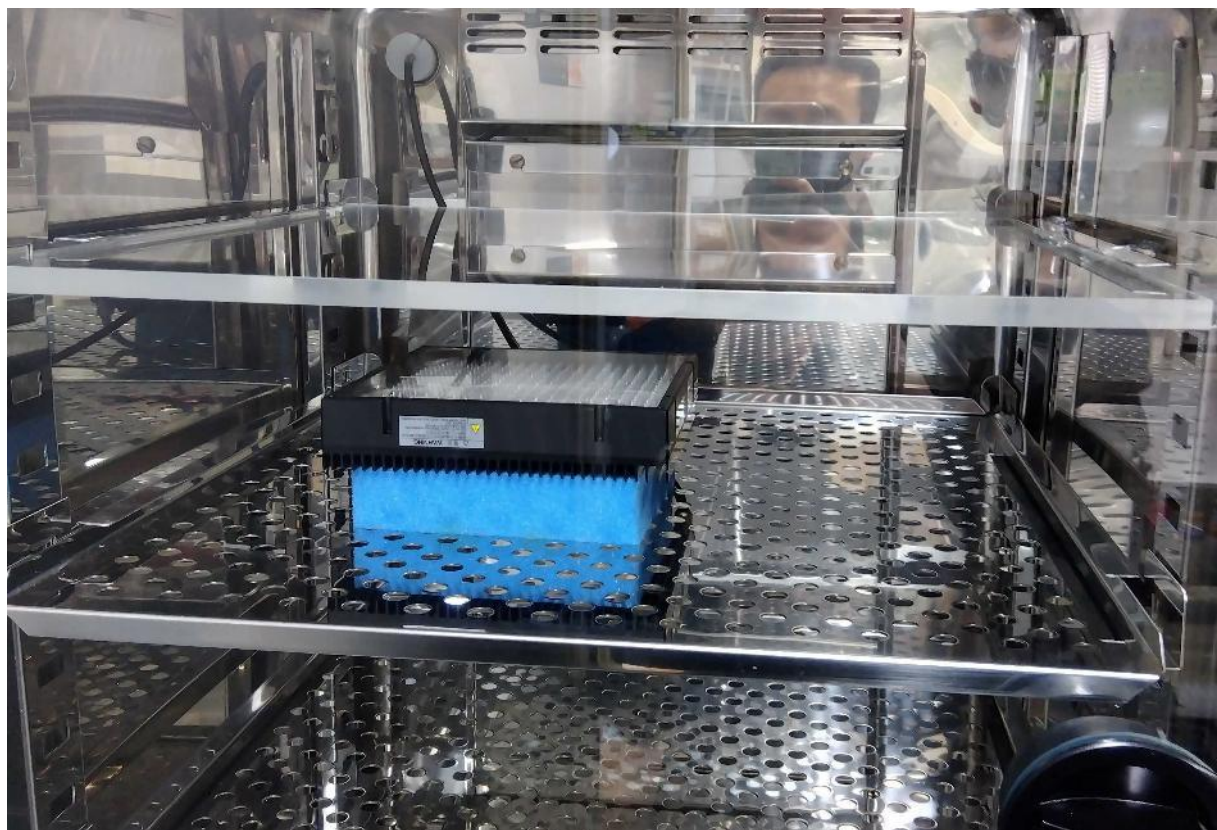


3. 保存・輸送

- 凍結状態ではPA-Creは働かない可能性が高いが、遮光状態での細胞保存が望ましい。
- 輸送も遮光条件での輸送とする事(遮光用のチューブを用いる、アルミホイルで軽く覆うなど)。

4. 光照射装置の準備－①

- インキュベーターの内寸に合わせて、厚さ10mm程度の塩化ビニール板ないしアクリル板を設置する。光照射装置と5cm以上離して設置する事が望ましい。
- インキュベーター内に青色波長の光照射装置を設置する。
(推奨) CCS社製
LEDパネル制御電源: IS-mini 専用制御電源
LEDパネル: IS-mini:LED パネル
(ISL-150X150-HBB)



インキュベーターの1段目に透明板設置(5cm程度)

※ LEDパネルは多少熱を発生する。そのため、PA-Cre細胞の培養ディッシュやプレート等を直接LEDパネル上に置くことは避けること。

4. 光照射装置の準備－②

- サンプル設置場所の光強度を照度計を用いて条件設定する。

(例) 照度計 デジタル照度計 LX-3000

※本資料では、このデジタル照度計の値での最適化事例を記載する。

光強度: 30~40 lx(ルクス)

換算値: 100mW/cm²



メモリはかなり小さい値となります



部屋の明るさで変わります(32~35lx 程度)

- 光強度測定時に周囲の光源の影響を受けるため、部屋を出来るだけ遮光した条件で測定する事が望ましい。
- 光強度を上記条件に設定すると、サンプル設置場所では、インキュベーター設定温度から変化はしない可能性が高い。
しかし、温度感受性細胞を取り扱う場合は、念の為に事前に温度変化を測定しておく事が望ましい。

5. 光照射試験

- 光照射時間は、連続1時間30分以上の照射が望ましい。
- 実験に用いる細胞により照射時間の最適条件が異なる事が想定されるため、プレ試験で照射時間を決定する事が望ましい。

6. 引用論文情報

A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering. Nature Chemical Biology, 12, 1059-1064 (2016)

7. 協力機関情報

- 株式会社ミーバイオ
- 神奈川県立産業技術総合研究所
佐藤「光スイッチ医療創出」プロジェクト
- 大阪大学大学院 歯学研究科 予防歯科学講座
- 関東化学株式会社