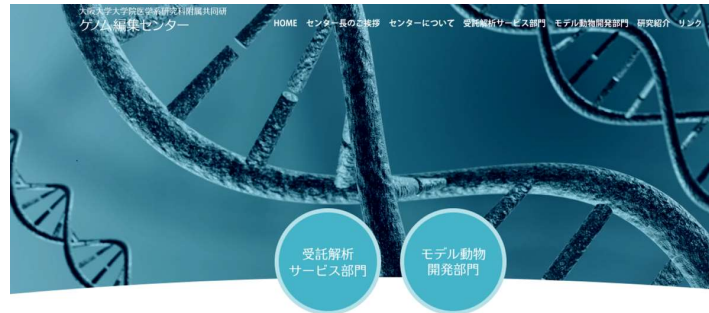


令和6年度 修士・博士課程機器セミナー

「共同研でやって欲しいこと、やってはいけないこと」

共同研究実習センター・ゲノム編集センター
吉村 康秀



◇2022年2月24日乾熱滅菌機 火災

乾熱滅菌機・TABAI ESPEC KPVH-120 (D91-06) 2013年度導入



D91-06室 排気口から白煙が立ち昇る 中庭側のベランダ ホースで水道水をかけ、消火 機板に張り付いた溶解した樹脂

17時頃利用者**がポリプロピレン製1.5mLチューブおよびポリプロピレン、低密度ポリエチレン製容器**を滅菌するため、乾熱滅菌機を利用した。その際、誤って耐熱温度以上の200°Cで滅菌を開始した（ポリプロピレンの耐熱温度100~140°C、融点168°C、発火点201°C）。17時過ぎに管理室に他の機器の利用者から煙が出ていると一報が入る。機器の電源をOFFにし、**扉を開けたときには炎が見えた**。中庭側ベランダに移動させ、ホースで水道水をかけて消火。燃焼している試料がわかっていたことと、規模が小さかったことから消火器ではなく、水で消火した。単純な注意不足や明らかに誤った使用方法であると判断される。

基礎研究棟L階・液体窒素室の凍結保存容器の破損について

令和5年7月18日午前10時に守衛室から液体窒素室の警報ブザーが前日夜から頻繁に鳴動しているとの連絡があった。確認に行くと**凍結保存容器**が写真①の状況になっていた（液体窒素の供給が頻発したため蓋の部分に霜が多量に付着している）。また容器側面に結露が生じていた（正常の場合は真空断熱により結露しない）。蓋を外して内側を確認するとネックチューブ（写真②）に硬いもので強く接触させたような凹み（写真③）が見つかったため、そこからの真空漏れがあったと推測する。真空漏れにより断熱不良が起きると容器内部の液体窒素が蒸発し続ける。容器内部の温度を凍結保存に適したマイナス140°C以下（気相の設定温度）に保つために、頻繁に液体窒素を供給していた。真空断熱不良が起こった容器は修理ができないため、この容器のサンプルのために容器を新たに購入する必要がある。



廃液とBSL

定期的に各研究棟ごとに廃液の検査が行われる。過去には、フッ素が検出された。

P1,P2で細胞培養を行う事もあると思うが、廃液も各研究室に持ち帰り、適切に処理してください。

哺乳綱、鳥綱への病原性を基準としたPhysical containment level
ヒトへの病原性を基準としたBiosafety level BSL

- ・ 遺伝子組み換えレベル（P1、P2など）は法令で規定されている。
- ・ BSLは法令で規定されていず、施設によって違う場合がある（SPFと同じ）

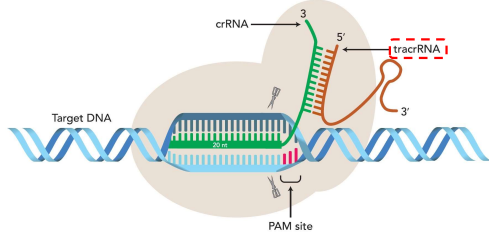
共同研にも、P1, P2, P3レベルの実験室があるが、法令の基準に適合した利用をお願いしたい。

共同研を活用した、超現実的なゲノム編集（培養細胞編）

人工型：全てのcomponentがパッケージされたプラスミドを使用する
→ 20塩基のオリゴDNAをプラスミドに導入するだけ

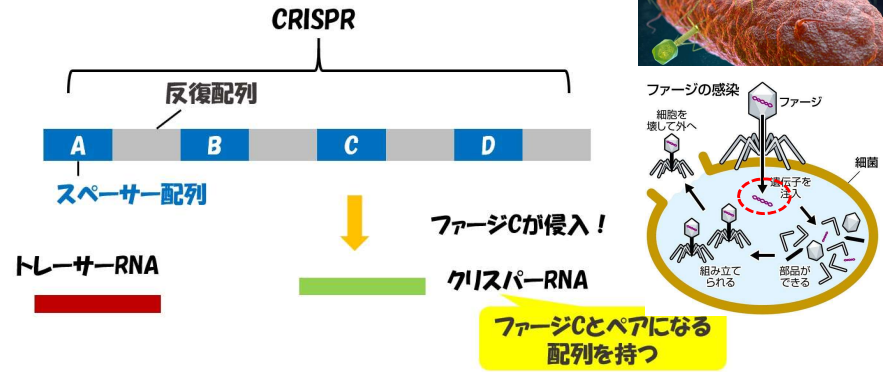
自然型：Cas9タンパク、**tracer**、guideRNAのcomponentを事前に調整する
手間がかかる。

→ **ただし！ 共同研を通じて購入すると初回無料、その後も安価に購入できます。**



図：IDT社 HPより

CRISPR-Cas9は細菌の免疫システム



ゲノム編集センターサポート事業

以下の4種類の試薬を無償*で提供！
*ネッパジーン社「NEPA21」初回利用者の特典になります。
ご希望の方はお問い合わせください（担当：共同研・寺尾）！

- ゲノム編集を1か所実施できる**無償セット**になります
- Alt-R(r) CRISPR-Cas9 crRNA, 2 nmol
- Alt-R(r) CRISPR-Cas9 tracrRNA 5 nmol
- Alt-R(r) S.p. Cas9 Nuclease V3, 100 ug
- Alt-R(r) Cas9 Electroporation Enhancer, 2 nmol

その他の製品も初回36%OFF、2回目以降11%OFFでご購入いただけます。



共同研MyPageをご活用ください

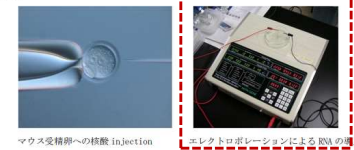
自然（偶然）にも生じる
→ ということでも食品では認可

遺伝子を正確に切り貼り

動物も研究レベルでは、（遺伝子組み換え生物扱い）

ゲノム編集動物作製事業とは、CRISPR/Cas9 systemを用いたゲノム編集動物の作製およびトランスジェニックマウス (TG) の作製から成り立ちます。CRISPR/Cas9 systemは、ES細胞を用いた従来の gene targeting 法よりも短時間で遺伝子改変動物を作製できるため、多くの実験動物においてその技術は応用されています。

生殖工学ユニットでは、早くからこの技術に着目し、医学部内の研究者にとって有益かつ重要な技術であると認識し、ゲノム編集マウスの作製を支援する体制を整えました。また、医学部外や学外からの共同研究ベースでの作製依頼も受け入れています。

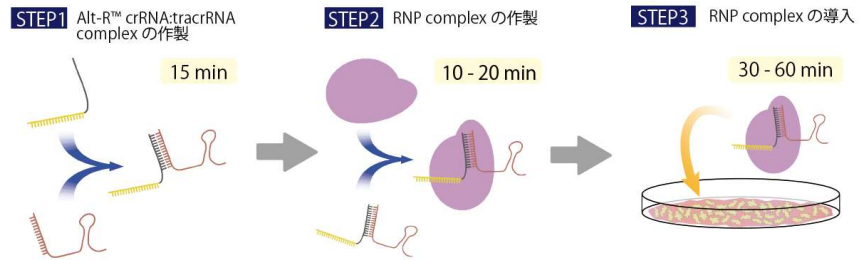


マウス受精卵への核酸 injection / ミニゲノムトランスジェニックになる胚の注入



作製したゲノム編集マウスの一例

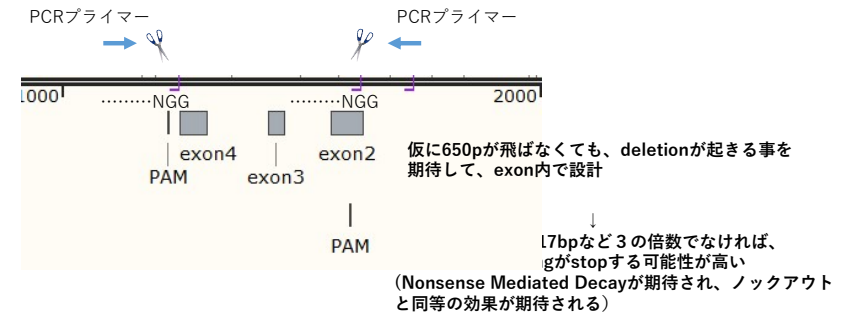
自然型でのゲノム編集手順



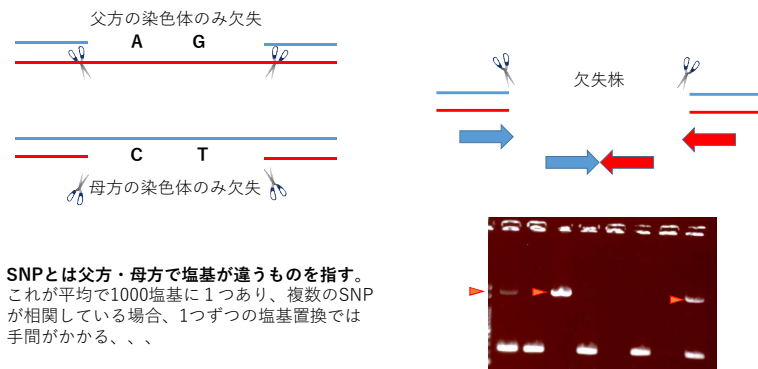
図：IDT社 HPより

siRNAやshRNAの導入でうまくいっていないという相談が多く、実際は当該細胞への導入効率のチェックから始める例が殆ど。この場合、GFPを付加したCas9タンパクを使用することもある（これは初回であっても有償）。

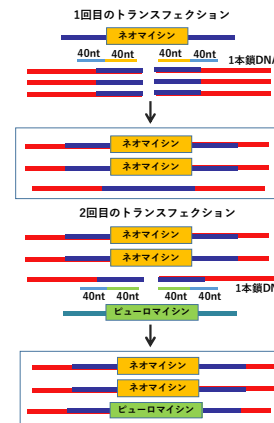
ノックアウトの実例（最近の依頼例）



GWASなどゲノム解析などで抽出されたSNP（感受性領域）の表現型解析



がん細胞には要注意！



ノックアウトの効率は10~15%とすれば、通常の2本の染色体を持つ細胞ならば、1~2%程度が、2本同時にノックアウトされることになる。

ところが、がん細胞など複数の染色体を持つ細胞が細胞株には多い。