

1 結果

表 1 に DCA 濃度と各プラスミド添加量条件を、図 1 にホタルルシフェラーゼアッセイの結果、図 2 に β -gal アッセイの結果、図 3 に Luc activity の結果を示す。

表 1: DCA 濃度と各プラスミド添加量条件

| Sample | DCA concentration (μ M) | Amount of each plasmids (ng) |
|--------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 500 |
| 3 | 20 | 0 |
| 4 | 20 | 500 |

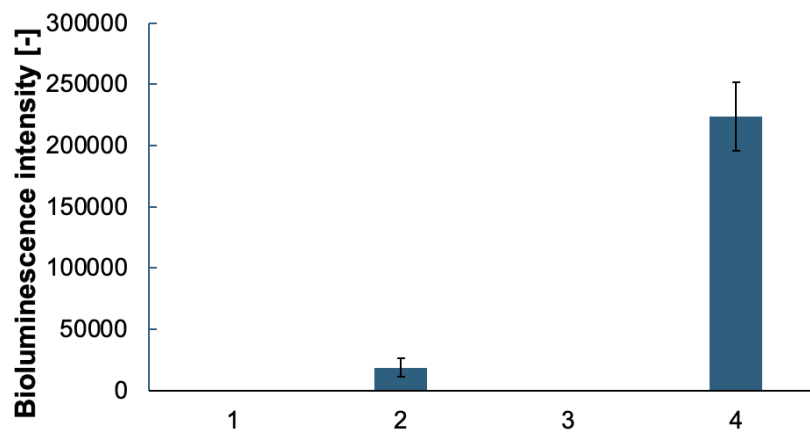


図 1: ホタルルシフェラーゼアッセイの結果

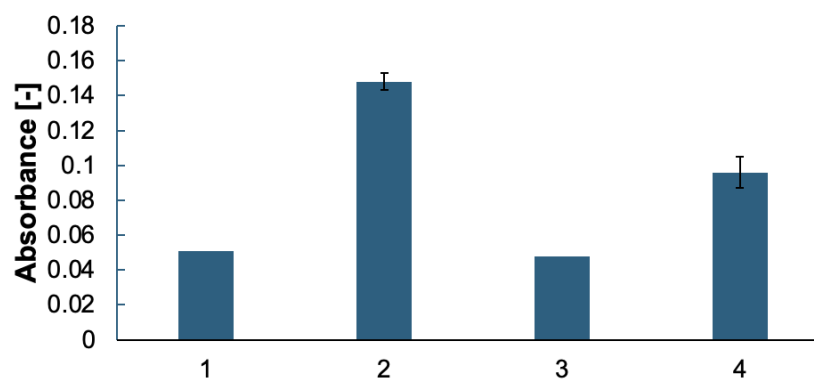


図 2: β -gal アッセイの結果

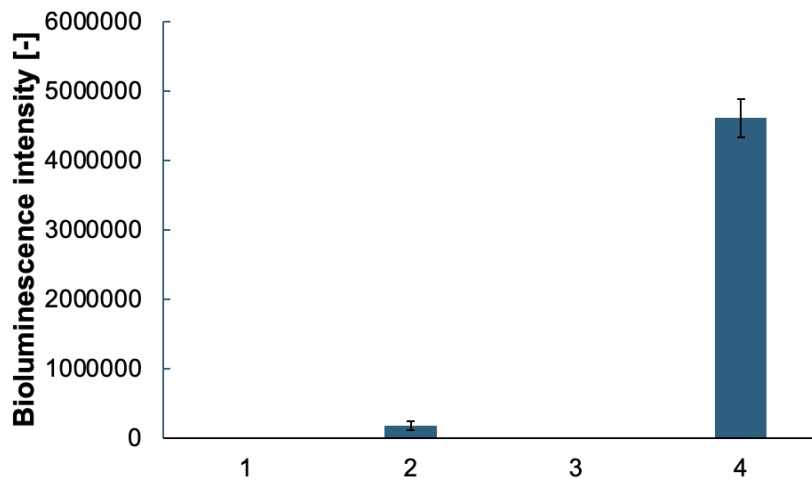


図 3: Luc activity の結果

2 考察

2.1 トランスフェクション時の細胞の剥がれ

Opti-MEM、DNA-Lipofectamine 複合液の添加をした際、一部の細胞が well から剥がれてしまった。これには以下の原因が考えられる。

(1) 継代が不十分

トランスフェクション前の継代で、 3.0×10^5 cells/well で 1 日培養をしたが、細胞数は well の 80% 程度であった。このため、細胞が well から剥がれやすくなっており、溶媒を添加したことで簡単に剥がれてしまったと考えられる。1 日で十分に細胞を増やすために、 3.5×10^5 cells/well 程度の細胞数で継代を行うとよいと考えられる。

(2) 不適切な添加操作

顕微鏡で溶媒添加後の well の状態を確認したところ、全ての well で well の右側が剥がれていた。溶媒滴下時には、well を左に傾けた状態で左側にゆっくりと溶媒を滴下した。この操作で右側の細胞が剥がれた原因として、傾けた well を戻す時に well の右側に溶媒が流れ込んで剥がれた可能性がある。傾けた well を戻す際に、ゆっくりと戻す様に注意する必要がある。

2.2 Luc activity

図 1 から、プラスミドが入っていない系では、ホタルルシフェラーゼアッセイの活性が見られなかったため、遺伝子の発現が起こっていないことが確認された。図 3 より、プラスミドが入っている系では、DCA が含まれていると Luc activity が大幅に大きくなっているため、DCA が Luc activity の増加に寄与していることが言える。これは、DCA が hTGR5 に結合することで細胞内 cAMP が増加し、CRE と結合して CREB が活性化し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写が誘導されるためと考えられる。