

GM-CSF生産量(HEK-293細胞)

遺伝子導入試薬量とプラスミドDNA量の検討

トランスフェクション時の遺伝子導入試薬量の比較検討を(表1)に、トランスフェクション時の遺伝子量の比較検討を(表2)にそれぞれ合わせて示します。

	条件1	条件2	条件3	条件4	条件5	条件6
細胞数	3x10 ⁷ 個(生存率94%)					
培地量	30ml					
容器	125ml三角フラスコ					
プラスミドDNA	37.5 μg GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)					
遺伝子導入試薬	市販品 37.5 μl	NeoFection 12 μl	NeoFection 18 μl	NeoFection 24 μl	NeoFection 30 μl	NeoFection 36 μl
振とう速度	135rpm					
培養日数	5日間					
GM-CSF生産量	12.9 μg/ml	16.3 μg/ml	18.9 μg/ml	18.3 μg/ml	9.3 μg/ml	5.17 μg/ml

(表1)トランスフェクション条件とGM-CSF生産量①

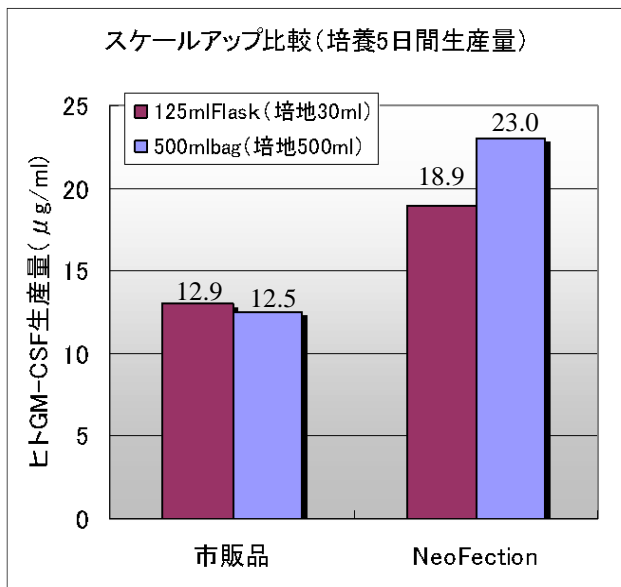
	条件1	条件2	条件3	条件4	条件5
細胞数	3x10 ⁷ 個(生存率94%)				
培地量	30ml				
容器	125ml三角フラスコ				
プラスミドDNA (GM-CSF)	12 μg	18 μg	24 μg	30 μg	36 μg
遺伝子導入試薬	18 μl NeoFection				
振とう速度	135rpm				
培養日数	5日間				
GM-CSF生産量	10.4 μg/ml	14.2 μg/ml	21.0 μg/ml	22.3 μg/ml	18.8 μg/ml

(表2)トランスフェクション条件とGM-CSF生産量②

NeoFectionを用いることで、市販の遺伝子導入試薬よりもGM-CSFの生産量が1.5倍高く、使用量は半分になるため、コスト削減につながります。また、使用するプラスミドDNA量も、NeoFection(μl):プラスミドDNA(μg)=1:1.5程度と通常の市販の遺伝子導入試薬に比べて、少なくすみませす。また、NeoFection18μl、プラスミドDNA30μgでさらに生産性が高くなることがわかりました。

GM-CSF生産量(HEK-293細胞)

3Lバッグを用いた遺伝子導入試薬の検討

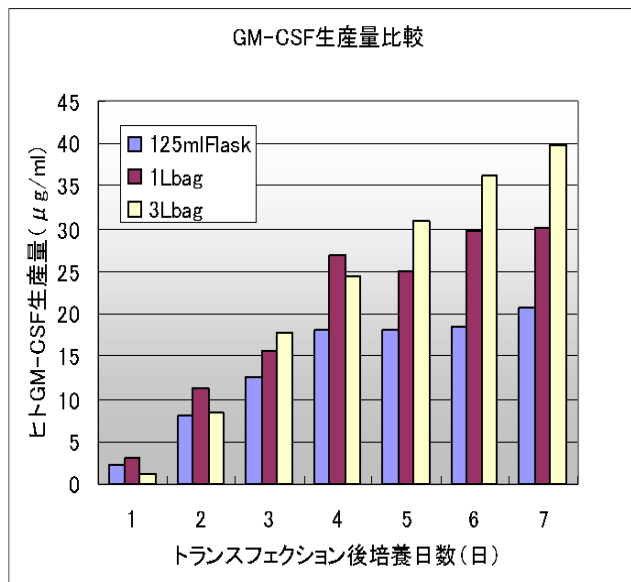


(図1) GM-CSF生産量(500ml vs 125ml Flask)

細胞数	5x10 ⁸ cells (1x10 ⁶ cells/ml)
バッグ容量	500ml
培地量	500ml
導入遺伝子	Human GM-CSF
遺伝子導入試薬量	NeoFection 300 µl 市販品625 µl
振とう	40rpm

(表1) 500mlバッグ遺伝子導入条件

フラスコを用いた30mlスケールの条件をもとに500mlのスケールアップを行ないました。NeoFection(1.2倍)市販品(0.96倍)ともにスケールアップに成功しており、生産量は、NeoFectionが2倍程度高い値でありました。



(図2) GM-CSF生産量(125ml Flask vs 1L bag vs 3L bag)

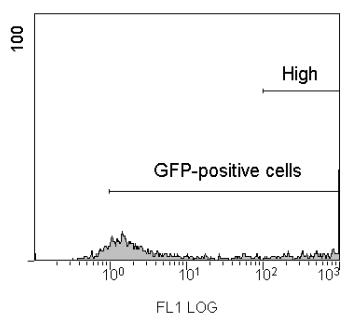
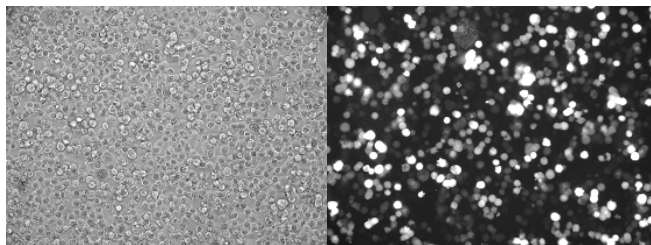
細胞数	1x10 ⁶ cells/ml	
バッグ容量	1L	3L
培地量	1L	3L
導入遺伝子	Human GM-CSF	
遺伝子導入試薬量	NeoFection 600 µl	NeoFection 1800 µl
振とう	40rpm	

(表2) 1000mlバッグ遺伝子導入条件

3Lバッグへのスケールアップも500mlバッグ同様にスケールアップできていました。バッグを用いることで閉鎖系でかつ小スペースで培養が可能であり、数L~十数Lレベルの一過性の発現系には、最適です。

HEK-293細胞を用いたトランスフェクション

GFP発現率とEPO生産量

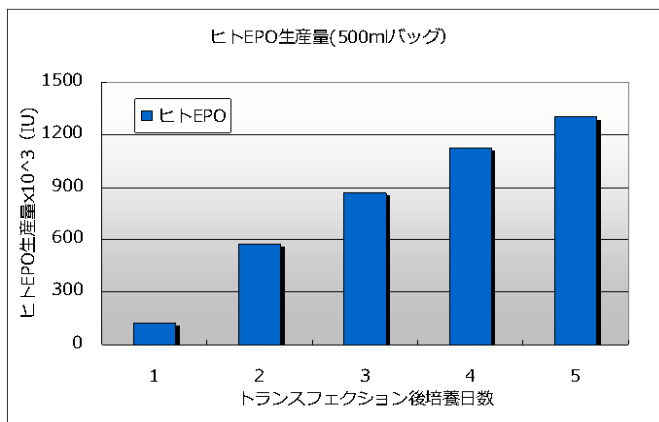


(図1) GFP発現率 (500mlバッグ)

細胞数	5x10 ⁸ cells (1x10 ⁶ cells/ml)
バッグ容量	500ml
培量	500ml
導入遺伝子	GFP
遺伝子導入試薬量	NeoFection 300 μl
振とう	40rpm

(表1) 500mlバッグ遺伝子導入条件

トランスフェクション後4日目のGFP発現率を確認すると、発現率は88.9%、さらに高発現率は43.8%と高い数値を示しています。生存率も77.4%と高い数値であることよりNeoFectionとバッグ用いたトランスフェクションシステム、一過性発現に適していることがわかります。



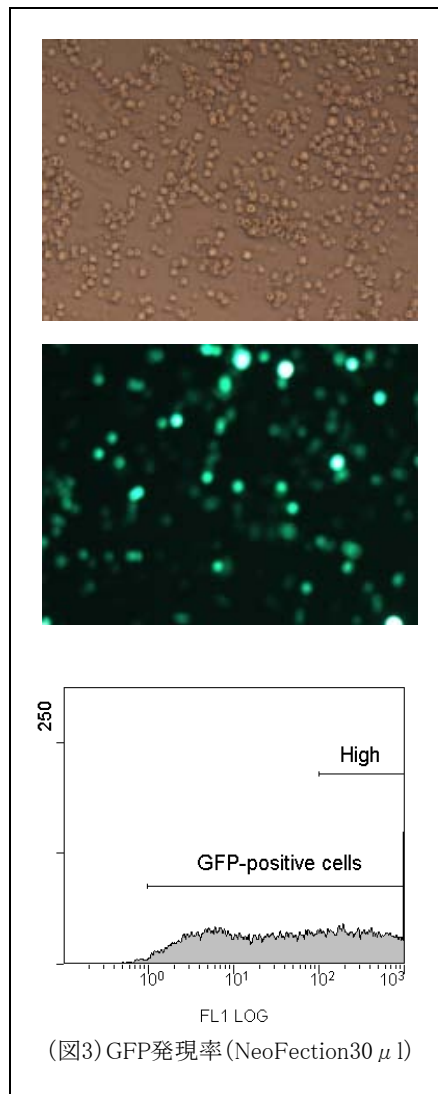
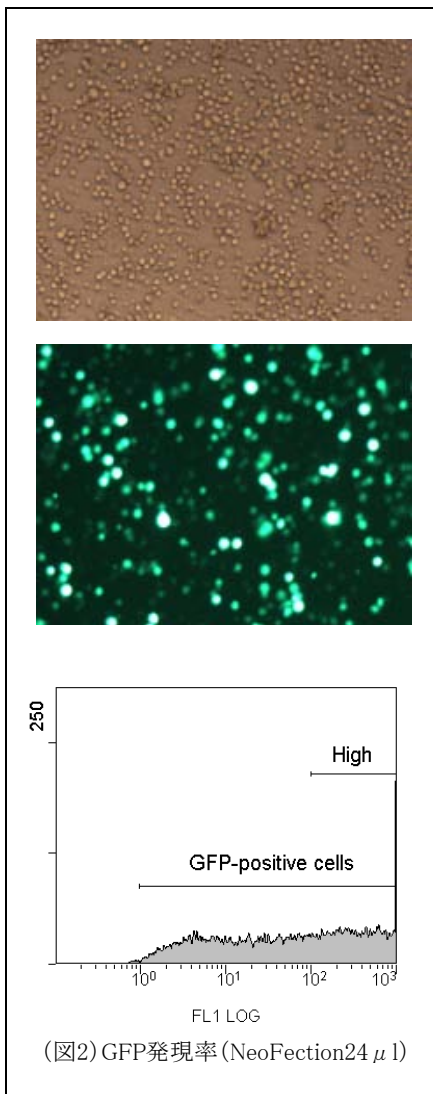
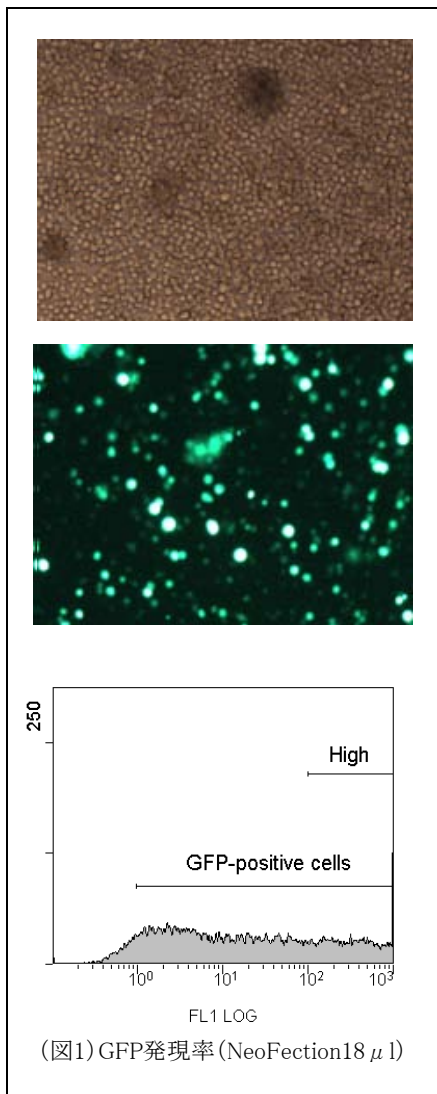
(図2) EPO生産量 (500mlバッグ)

細胞数	1x10 ⁶ cells/ml
バッグ容量	500ml
培地量	500ml
導入遺伝子	Human EPO
遺伝子導入試薬量	NeoFection 300 μl
振とう	40rpm

(表2) 500mlバッグ遺伝子導入条件

500mlバッグを用いてトランスフェクション後に5日間培養を行いました。その結果培養5日間順調に生産できていることがわかりました。

GFP発現率



細胞数	3x10 ⁷ cells (1x10 ⁶ cells/ml)		
容器	125ml 三角フラスコ		
培量	30ml		
導入遺伝子	GFP		
NeoFection使用量	18 μ l	24 μ l	30 μ l
振とう	135pm		

(表1) 遺伝子導入条件

トランスフェクション3日後のGFP発現率を確認は、

- NeoFection 18 μ l で 92.5 % (高発現率 35.4 %)
- NeoFection 24 μ l で 98.8 % (高発現率 53.2 %)
- NeoFection 30 μ l で 98.2 % (高発現率 45.2 %)

と高い発現率であることがわかりました。この結果より、NeoFectionを用いることで、CHO細胞 (dhfr-)を用いた一過性発現にも適していることがわかります。