

パーティクル・ボンバードメント法

BioRad の PDS-1000/He を用いる。

用意するもの	2.5 M CaCl_2 (フィルター滅菌し、分注して -20°C にストック)
	0.1 M Spermidine (フィルター滅菌し、分注して -20°C にストック。1, 2 回 解凍したら新しいものを使う)
	BioRad PDS-1000/He 用ラプチャー・ディスク
	BioRad PDS-1000/He 用金粒子
	BioRad PDS-1000/He 用ストップングスクリーン
	BioRad PDS-1000/He 用マクロキャリア
	BioRad PDS-1000/He 用マクロキャリアホルダー
	ソニケーター (チューブへのアダプターつき)

金粒子は、タマネギ表皮細胞を用いる場合は径 $1.6 \mu\text{m}$ のもの、シロイヌナズナ葉を用いる場合は $1.0 \mu\text{m}$ のものを用いる。ラプチャー・ディスクは、タマネギ表皮細胞用には 1100 psi 用、シロイヌナズナ葉用には 900 psi 用を用いる。

< 金粒子の準備 >

1. 金粒子を量る。一ショットに尽き、0.6 mg の金粒子を用いる。金粒子の洗いなどの過程で失われることを考え、+1ショットの量を調整する。後に分注する為、この時点ではコンストラクトごとに金粒子を量らなくても良い。
2. チューブに測り取った金粒子に $300 \mu\text{L}$ の 70%エタノールを加え、ボルテックス。軽く遠心し、金粒子を落とす。上清を捨てる。
3. $100 \mu\text{L}$ x ショット数の 100%エタノールを加え、ボルテックス。この時点でコンストラクト数のチューブに必要ショット量分注する。軽く遠心し、上清を捨てる。
4. 金粒子を DNA でコートする。このステップは、速度が重要である。各チューブに、**①** $2\sim 5 \mu\text{g}$ の DNA (溶液量にして 1 ショット $10 \mu\text{L}$ 以下になるように DNA を調整)、**②** $10 \mu\text{L}/\text{shot}$ の 2.5 M CaCl_2 溶液、**③** $4 \mu\text{L}/\text{shot}$ の 0.1 M Spermidine を入れるよう、予め溶液量を計算しておく。溶液量は、 $24 \mu\text{L}/\text{shot}$ 。DNA、 CaCl_2 溶液、Spermidine 溶液の必要量を、それぞれピ

ペットマンのチップに取り、すぐに添加出来る状態にしておく。ソニケーターとボルテックスミキサーを準備。

- ① 金粒子に必要量(DNA 溶液を入れて 10 μL になる量)の水を加える。
- ① 金粒子をソニケーションにより攪拌。ソニケーションは数秒でよい。
- ② DNA 溶液を加える。素早くボルテックス。以下、 CaCl_2 溶液添加→ボルテックス→Spermidine 溶液添加→ボルテックスと、素早く進める。

5. 室温で 30 分から一時間インキュベートする。

6. インキュベートが終わったら、金粒子・DNA 溶液を軽く遠心し、金粒子を落とす。上清を捨て、100 μL の 70%エタノールを加える。軽くソニケーションを行い、攪拌。また軽い遠心により金粒子を落とし、上清を捨てる。

8. 15 $\mu\text{L}/\text{shot}$ の 100%エタノールを加える。軽くソニケーションを行い、攪拌。用意しておいたマクロキャリアホルダーにマクロキャリアを埋め込んだものの真ん中に、それぞれ 15~20 μL の DNA・金粒子溶液を添加。そのまま室温で、完全に乾燥するまで待つ(大体 10 分くらい)。

< 試料の準備 >

試料としては、簡単に局在やコンストラクトの出来をチェックするだけなら、タマネギ表皮細胞が良く用いられる。これは、タマネギの表皮細胞が、細胞の形が細長い四角で比較的均一であること、葉緑体の自家蛍光が無いこと、また、ボンバードメントによる遺伝子導入効率が良いこと、などの理由によるものである。ボンバードメントを行う際は、① スーパーなどから購入して一週間以内の、新しいタマネギを用いること、② 外側から2、3層目の、柔らかい組織を用いること、の二つに注意する。

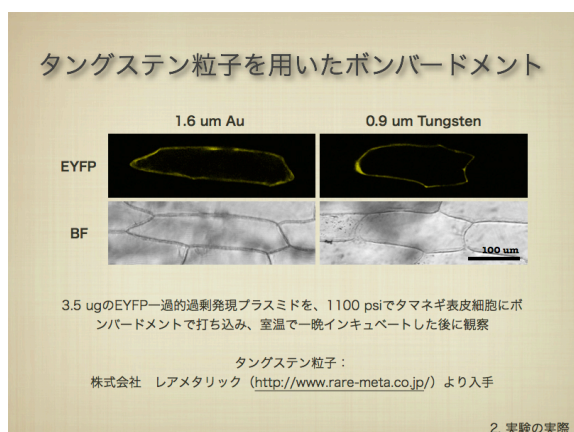


ボンバードメントする際は、表皮をピンセットなどで剥がして、MS 培地の上に接着させてからボンバードメントする方法と、タマネギ切片をそのまま濡らしたろ紙の上にのせてボンバードし、観察する直前に表皮細胞を剥がす方法(写真)と、二通りある。どちらでも導入効率には代わりない。



シロイヌナズナの葉にボンバードメントする際は、シロイヌナズナの葉を切り取り、葉柄の部分にMS培地にさして、ボンバードメントによる衝撃で葉が飛び散ることの無いようにする。葉をぬれたろ紙の上に置き、上から網戸の網などを重ねてボンバードする方法も有効である。シロイヌナズナの葉は、タマネギに比べ組織が弱いので、径 0.6 μm の金粒子を用い、900 psiの圧力で打ち込みを行う。

ボンバードメントについては、BioRad PDS-1000/He の取り扱い説明書をそれぞれ参照して欲しい。ボンバード後は、試料が乾燥しないよう、シャーレをジップロックバッグなどに入れて封をし、室温・暗所で一晩インキュベートする。蛍光自体は、数時間後でも観察出来る。



また、BioRad では発売中止となったタングステン粒子の使用も可能である。レアメタリックという会社から入手出来る。タングステン粒子は非常に安価で、なんと金粒子の 1/200 以下の値段である。金粒子が売れなくなる為、BioRad が発売を中止したことからわかるように、導入効率も金粒子と比較して遜色ない。ただ、筆者が試した感触では、同じ量の

DNA 導入で、金粒子のほうが蛍光強度が強く、シャープに見えるようであった。コンストラクトのチェックなどにはタングステン粒子を、明るい試料で綺麗なデータを取りたいときには金粒子を使うのが良いかも知れない。