

conditional mutant の作製は、pTKhyg (# 1-128) :tet promoter construct = 1 : 10モル比で野生型細胞に導入して行う。1/3 ぐらいのクローンで発現があり、ウエスタン解析をするとほとんどのクローンできちんと誘導発現している。ただし、機能(放射線感受性など)を解析するとトランスジーンが発現抑制がきちんとかかっていないことが見つかる場合がある(非常に少ない発現で機能が再構成される)。致死変異導入の場合には、トランスジーンが発現抑制がきちんとかかっている heterozygous mutant (+/-) clone を数クローン選んで、homozygous (-/-) mutant clone の作成を試みる。(-/-) clone のスクリーニングはテトラサイクリン添加で死ぬという基準で行う。

+/-細胞より-/-細胞が単離できない時の対策

(1) 薬剤のダブルセレクション

Atm/neo コンストラクトでノックアウトしたヘテロ(+/-)クローンを、次に、Atm/puro コンストラクトでノックアウトする場合に、neo 単独もしくは neo/puro の両方の薬剤で選択した場合に次のような実験結果を得た。neo 単独で選択した時に 0/27 で全くホモ(-/-)ミュータントクローンが単離できなかったのに、neo/puro 選択で 16/44 の比率で-/-クローンが単離できた。puro コンストラクトを +/- クローンに導入した時に、+ アレルよりもターゲットインテグレーションした neo コンストラクトを含む- アレルに、より効率よくノックインしたようです。

(2) -/-クローンの増殖が遅いことが予想される場合

トランスフェクト後、2週間以上待つ。トランスフェクト後、2週間で培地交換し、さらに1週間ほど観察する。

(3) アレル間にポリモルフィズム

DT40 細胞は、Outbred 由来なのでアレル間にポリモルフィズムがある。このポリモルフィズムが大きい時に、特定アレルへのターゲットインテグレーション効率が著しく低下する場合が考える。対策は、+/-ミュータントより+ アレル特異的ノックアウトコンストラクトを作成する。

(4) 致死変異もしくは細胞増殖の関与する遺伝子の変異

ノックアウトする遺伝子のトランスジーンを継続発現した時にのみ、-/-ミュータントが単離できた場合には、tet のシステムを使いコンディショナルミュータントを作成する必要がある。