

HAP1 細胞株製品 FAQ

ご確認になりたい質問をクリックしてください。各 Q&A に移動します。

- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株はどのように作製されますか？
- Q：研究に HAP1 細胞株を使用できますか？
- Q：HAP1 細胞とはどんな種類の細胞ですか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株はどのように検証されていますか？
- Q：HAP1 細胞をどのように培養しますか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株を注文すると何を受け取れますか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株は抗生物質耐性カセットを含んでいますか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株に標的以外の変異が含まれていないことをどのように確認していますか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株における標的以外の変異に関するデータはありますか？
- Q：私は以前に HAP1 細胞を使ったことがありません。培養状態が正しいかどうかどうすればわかりますか？
- Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株は完全なノックアウトですか？
- Q：qRT-PCR でノックアウトを確認できますか？
- Q：遺伝子ノックアウト後も HAP1 細胞は一倍体ですか？
- Q：HAP1 細胞の参考文献をいくつか教えてください。
- Q：私が目的とする遺伝子は HAP1 細胞で発現されていますか？
- Q：HAP1 細胞株は何継代まで増殖することが期待できますか？
- Q：興味のある HAP1 細胞株を検索すると「GENERATED ON REQUEST」または「IN STOCK」が表示されますが、違いは何ですか？
- Q：HAP1 細胞株は TNF α 誘導に反応しますか？
- Q：HAP1 細胞株のトランスフェクション方法のプロトコルはありますか？
- Q：目的の遺伝子に関して複数の HAP1 細胞株がリストされているのはなぜですか？
- Q：HAP1 細胞のゲノムはシーケンスされていますか？このデータはありますか？
- Q：HAP1 細胞の大きさは？
- Q：HAP1 細胞は異種移植片に使用できますか？
- Q：HAP1 細胞株は遺伝的に安定していますか（すなわち、一倍体のままでいますか）？
- Q：細胞はなぜ半数体なのですか？
- Q：HAP1 細胞が特定の生物学的経路の研究に適しているかどうかはどうすればわかりますか？

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株はどのように作製されますか？

遺伝子改変済み HAP1 細胞株は、CRISPR-Cas9 システムを使用し、目的の遺伝子のコード配列にフレームシフト変異を導入することにより作製されています。

Q：研究に HAP1 細胞株を使用できますか？

HAP1 細胞株は、DNA 損傷修復経路およびストレス応答などの広範囲の生物学的プロセスの研究、ならびに疾患モデリングの研究において使用されています。これらの [HAP1 が利用された論文](#)は、HAP1 細胞株が幅広く利用できることを示しており、研究に役立つ特性評価データを提供しています。

Q：HAP1 細胞とはどんな種類の細胞ですか？

HAP1 細胞は、男性の慢性骨髄性白血病（CML）細胞株 KBM-7 に由来する、ほぼ一倍体のヒト細胞株です（[Carette et al. Nature, 2011.](#)） HAP1 細胞は線維芽細胞様形態で接着性細胞です。

詳細については、[HAP1 細胞の概要](#)をご覧ください。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株はどのように検証されていますか？

すべての遺伝子改変済み HAP1 細胞株は、PCR 増幅と Sanger シーケンス解析によって、導入した変異をゲノム DNA レベルで検証しています。Horizon の結果を検証できるようにするために、Horizon はプライマー配列を含む当社のシーケンス結果を提供しています。

参考) HAP1 野生型細胞は、[全ゲノム配列決定](#)および[トランスクリプトーム分析](#)によって広く特性が明らかになっています。

Q：HAP1 細胞をどのように培養しますか？

HAP1 細胞は、10% ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンの存在下で、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）で培養されます。細胞は、初期密度に応じて、1：10 または 1：20 の希釈度で 48 時間ごとに継代します。より詳細な情報は[こちら](#)から入手できます。さらに、この情報は細胞株の Certificate of Analysis にも記載されています。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株を注文すると何を受け取れますか？

目的の遺伝子のエクソンにフレームシフト変異を有するクローンの HAP1 細胞株です。変異はデータシート（Certificate of Analysis）に記載されており、ゲノム DNA の PCR とそれに続く Sanger シーケンス解析によって確認されています。

全ての変異細胞株は、遺伝子改変部位以外はアイソジェニックである親細胞株と共にペアで提供されます。親細胞株は実験コントロールになるため、ペアを用いたシステムは、実験から得られた表現型が遺伝子改変に直接起因するか否かの解釈が容易です。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株は抗生物質耐性カセットを含んでいますか？

遺伝子改変済み HAP1 細胞株は抗生物質耐性カセットを含みません。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株に標的以外の変異が含まれていないことをどのように確認していますか？

標的とする配列以外のゲノム領域に、意図しない突然変異が導入される問題（オフターゲット効果）を完全に排除することはできません。しかし、最近の多くの論文では、CRISPR-Cas9 システムが非常に特異的であることが示されているので、オフターゲット効果は比較的少なく、制御可能なリスクであると考えられます。

これに加えて、共同研究者グループは、彼らが HAP1 細胞株のオフターゲットを調査し、非常に低い頻度を観察する論文を発表しています。

Horizon では、オフターゲット効果のリスクをさらに軽減するために、独自の選択アルゴリズムにより、ヒトゲノム内の予測される標的外部位が最少限であるガイド RNA のみを選択するようにしています。これに加えて、研究者は複数の独立したクローンの使用、または野生型 cDNA によるノックアウトのレスキューを通じて実験を制御することができます。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株における標的以外の変異に関するデータはありますか？

ありません。Certificate of Analysis に記載されている変異に関するゲノム DNA レベルでの検証データのみとなります。

Q：私は以前に HAP1 細胞を使ったことがありません。培養状態が正しいかどうかどうすればわかりますか？

細胞の画像を Horizon までお送りいただければ、Horizon のテクニカルサポートチームがお客様の培養状態を視覚的に確認することができます。また、HAP1 細胞培養ガイドラインに詳細な情報と画像例が掲載されていますのでご参照ください。

Q：遺伝子改変済み HAP1 細胞株は完全なノックアウトですか？

各遺伝子改変済み HAP1 細胞株はクローン細胞株であり、目的の遺伝子にフレームシフト突然変異を持っています。そのため、野生型対立遺伝子のコードするタンパク質の発現はないと考えています。しかし、以下のようなケースでは、タンパク質が検出される可能性があります（Horizon はターゲット領域のゲノム配列の確認のみを行っており、タンパク質の発現確認を実施していません）。

- ・ Truncated タンパク質が安定的に発現する場合
- ・ 本来より下流の開始コドンから翻訳が開始してしまう場合
- ・ ゲノム編集されたエクソンを含まない転写産物（選択的スプライシングに起因）から翻訳される場合

Q：qRT-PCR でノックアウトを確認できますか？

HAP1 細胞株における遺伝子のノックアウトは、フレームシフト突然変異を引き起こす小さな挿入／欠失の導入により作製されます。この突然変異導入はコード配列を非機能的にすることができますが、場合によっては、ナンセンス変異の導入された対立遺伝子から転写された mRNA が依然として発現する可能性があり、誤解を招く可能性のある qRT-PCR の結果をもたらすことがあります。そのため、タンパク質レベルでの検証を強く推奨します。

Q：遺伝子ノックアウト後も HAP1 細胞は一倍体ですか？

クローンの大部分はノックアウト細胞株の樹立まで一倍体ですが、Horizon は倍数性の検証を提供していません。しかしながら、変異細胞株が二倍体になったとしても、これは依然として完全なノックアウトです。

Q：HAP1 細胞の参考文献をいくつか教えてください。

HAP1 細胞を記載している厳選された論文には以下のものがあります。

Essletzbichler P. et al., Genome Res. 2014 – Genomic characterization of HAP1 cell line.

Dong M. et al., Neurology 2014 – HAP1 knockout cell line for evaluation of pathogenic mutations using phenotype rescue experiments.

Kravtsova-Ivantsiv Y. et al., Cell 2015 - HAP1 knockouts of KPC1 and KPC2 support role of KPC1 as E3 ligase that mediates processing of NF- κ B1 p105 to p50.

Carette et al. Nature. 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1.

Lackner DH et al. Nat Commun. 2015 A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging.

Q：私が目的とする遺伝子は HAP1 細胞で発現されていますか？

RNAseq によって HAP1 細胞における遺伝子発現を分析しています。ご希望の遺伝子を Horizon までご連絡ください。

Q：HAP1 細胞株は何継代まで増殖することが期待できますか？

Horizon の経験では、細胞培養ガイドラインに従えば、HAP1 細胞は 20 継代まで維持することができます。

Q：興味のある HAP1 細胞株を Horizon 本社ウェブサイトで検索すると「GENERATED ON REQUEST」または「IN STOCK」が表示されますが、違いは何ですか？

「IN STOCK（在庫品）」とは、その特定の遺伝子を改変した HAP1 細胞株が作製済みであるのに対し、「GENERATED ON REQUEST」は、ご希望の遺伝子を改変した HAP1 細胞株の作製を Horizon に依頼するということとなります。

「IN STOCK（在庫品）」は 2~4 週間で提供できますが、「GENERATED ON REQUEST」は約 12 週間かかります。CRISPR-Cas9 を使用して遺伝子改変 HAP1 細胞株を作製する必要があるためです。

Q：HAP1 細胞株は TNF α 誘導に反応しますか？

Horizon は、HAP1 細胞株において TNF α と IFN γ の両方に対する応答を観察しています。興味のある他の経路があるならば、Horizon までご連絡ください。

Q：HAP1 細胞株のトランスフェクション方法のプロトコルはありますか？

siRNA や microRNA 試薬の導入には、DharmaFECT 1 トランスフェクション試薬がおすすめです。トランスフェクションの 1 日前に、6 ウェルプレートに 50 万個の細胞を播種します。トランスフェクション効率は比較的高く、毒性は低いです。

HAP1 細胞株のトランスフェクションは電圧ポレーションでも可能であるというお客様からのフィードバックを受けました。そのプロトコルでは、Neon Electroporation システムを 1575 V、10 ms、3 パルスの条件で使用するのが最も高効率でした。

Q：目的の遺伝子に関して複数の HAP1 細胞株がリストされているのはなぜですか？

CRISPR 技術により遺伝子の編集を行うときは、フレームシフトが成功した複数のクローンを単離することがよくあります。それらの違いは挿入または欠失されている塩基の数であることがよくあります。

各クローンの製品ページをクリックしてページを下にスクロールすると、データシート（Certificate of Analysis）の pdf リンクがあります。その中にフレームシフトの位置の記述があるので、あなたはどちらがあなたの実験により適しているか決めることができます。

Q：HAP1 細胞のゲノムはシーケンスされていますか？このデータはありますか？

はい。HAP1 細胞のゲノムは [Kim 等](#) と [Essletzbichler 等](#) の両方で配列決定されました。

Q：HAP1 細胞の大きさは？

HAP1 細胞は他の細胞株と比較して小さく、直径約 11 μ m です。

Q：HAP1 細胞は異種移植片に使用できますか？

免疫無防備状態のマウスにおける HAP1 細胞の腫瘍形成性は、[OncoTest](#) によって評価されています。

3 匹のメス NMRI nu/nu マウスを有する 3 つのグループに、それぞれ Haplogen Genomics GmbH により供給された HAP-1 細胞を両側皮下注射（左右の側腹部）しました（注射部位あたり 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^6 細胞）。

90 日間の観察期間中に、9 匹のマウスのうち 6 匹のマウスの注射部位 18 箇所の中のうち 8 箇所で腫瘍が増殖しました。それらの容積は 111 mm^3 から 1700 mm^3 以上の範囲でした。腫瘍増殖開始までの潜伏期間は 19~78 日でした。担癌マウスの死亡または進行性体重減少、ならびに臨床的徴候は観察されませんでした。

Q：HAP1 細胞株は遺伝的に安定していますか（すなわち、一倍体のままでいますか）？

Horizon は、一倍体細胞株が経時的に自発的に二倍体化することを観察しています。遺伝子がノックアウトされている場合、二倍体化はノックアウト状態に影響を与えませんが、二倍体化の潜在的な影響を最小限に抑えるために、非常に低い継代数で細胞を操作することを推奨します。低継代細胞のストックを準備し、頻繁に復活するようにしてください。

Q：細胞はなぜ半数体なのですか？

HAP1 細胞株は、稀ではあるが、半数体に近いことがより頻繁に観察される新生物性疾患である慢性半骨髄性白血病（CML）に由来します。

Q：HAP1 細胞が特定の生物学的経路の研究に適しているかどうかはどうすればわかりますか？

あなたの実験的なニーズを議論するために Horizon までご連絡ください。この細胞株を用いた内部研究プロジェクトは進行中であり、共有できるデータを持っている場合もあります。