

## アミノ酸早見表

製品名	製品番号	分子量	保存温度	可溶溶媒	試験濃度 (g/L)
L-Asparagine	A 4159	132.1	RT	1N NaOH または 1N HCl	0.25
L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	A 4284	150.1	RT	1N NaOH または 1N HCl	0.29
DL-Aspartic Acid	A 4409	133.1	RT	1N NaOH または 1N HCl	0.07
L-Aspartic Acid	A 4534	133.1	RT	1N NaOH または 1N HCl	0.07
L-Cystine	C 7602	240.3	RT	1N NaOH	0.02
DL-Glutamic Acid	G 5513	147.1	RT	1N HCl	0.15
L-Glutamic Acid	G 5889	147.1	RT	H <sub>2</sub> O	0.15
Hypoxanthine	H 9636	136.1	RT	1N NaOH	0.025
L-Isoleucine	I 7403	131.2	RT	H <sub>2</sub> O	0.262
L-Leucine	L 8912	131.2	RT	1N NaOH	0.39
L-Methionine	M 5308	149.2	RT	1N NaOH	0.149
DL-Phenylalanine	P 4905	165.2	RT	1N NaOH	0.248
L-Phenylalanine	P 5482	165.2	RT	1N NaOH	0.248
DL-Tryptophan	T 7425	204.2	RT	0.5 N HCl	0.02
L-Tryptophan	T 8941	204.2	RT	1N NaOH	0.04
L-Tyrosine	T 2025/T 8566	217.7	RT	1N NaOH 中で加熱	0.37
L-Valine	V 0513	117.1	RT	1N HCl	0.234

RT = 室温

## 試薬

## アミノ酸

## L-グルタミン安定性試験

L-グルタミンは他の大多数のアミノ酸とは違って溶液中で不安定であり、このことは多くの細胞培養研究者にとって重要となっている。この必須アミノ酸は、事実上すべての哺乳動物細胞の培養に必要とされている。代謝運命は推測の域を出ないが、我々はグルタミンの不安定性および変質を最小限に抑えられる条件を確認する目的で研究を行なった。

最初の試験では、L-グルタミンの分解を時間と温度の関数として表わすことを目的とした。細胞培養に使用するため、Earle塩を含有するEagle基本培地 (BME) を調製した。この培地は、脱イオン水に溶解した後に2.2 gの重炭酸ナトリウムを添加し、次いでpH調節を行ない、最後に滅菌濾過した溶液である。さらに、この培地に2 mMのL-グルタミンを添加した。この培地を分注し、それぞれを4°C、室温 (21°C)、インキュベーター (35°C) で保存した。定期的にサンプルを採取し、フェニルイソチオシアネートで誘導体に変換した。逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でアミノ酸の定量分析を行ない、各サンプルを内部標準とともに分析した。L-グルタミンのピーク高を正規化処理し、得られたデータを新鮮なBME培地に残存するグルタミンの割合 (%) として表した。これらの試験の結果を図1~3に示す。

グルタミンは4°Cで保存した培地で最も安定していることがわかった。グルタミンは最初の1週目の終わりまでまったく分解していないが、わずかに分解している程度で、その後の試験期間でも分解の進行はほとんど見られなかった。我々はすべての培地を冷所で保存することを推奨するが (図1)、0°C

以下では多くの成分が不可逆的な沈殿を生じるため、液体培地の凍結保存は推奨しない。

室温で保存した培地では、より速やかな分解が起こり、3日間で約20%のグルタミンが変質した (図2)。35°Cで保存した場合は、さらに急速な分解が起こった (図3)。9日間で50%のグルタミンが分解し、3週目の終わりに残っているグルタミンは20%未満であった。これらのデータは、細胞培養培地を数日ごとに交換する必要性を裏付け、無菌性を評価するためにインキュベートした培地は破棄する必要があることを示唆している。

重炭酸ナトリウムで緩衝したBMEから重炭酸ナトリウムがCO<sub>2</sub>として経時的に失われ、それに伴ってpHが上昇することから、グルタミンの安定性についての疑問が生じた。そこで、2番目の研究として、グルタミンの安定性に対するpHの影響を評価した。pH 3.0、7.3、9.0の10 mM L-グルタミン水溶液を調製し、室温で保存した。サンプルを定期的に採取し、上記の方法で分析した。

試験結果を図4~6に示す。グルタミンは中性のpHで最も安定しており、酸性または塩基性のpHではほぼ同じ速度で変質した。これらのデータは、室温の培地において、pHの上昇により少なくとも一部のL-グルタミンが分解することを示している (図2)。

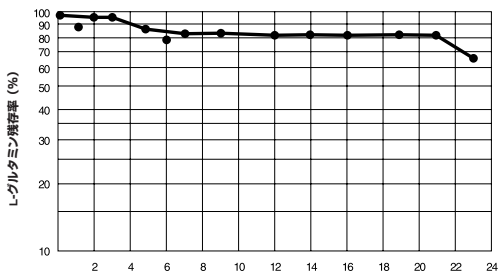


図1 4°Cで保存した日数

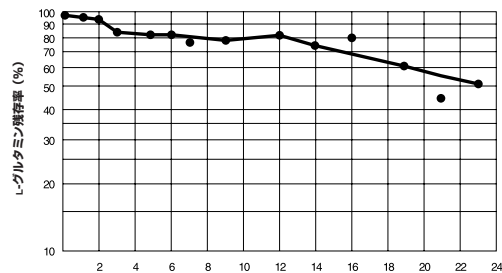


図2 21°Cで保存した日数

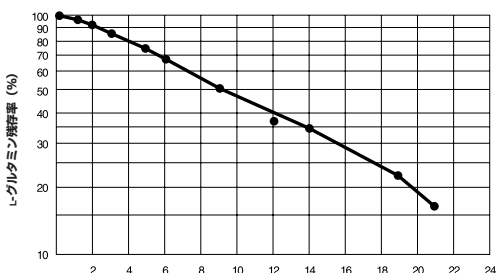


図3 35°Cで保存した日数

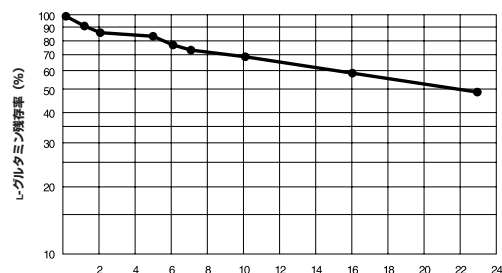


図4 pH 3.0, 21°Cで保存した日数

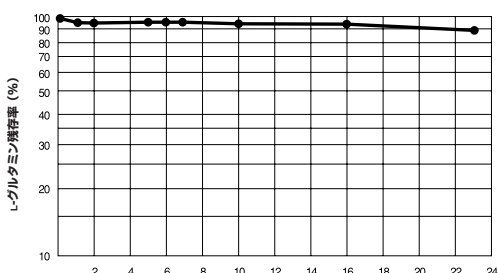


図5 pH 7.3, 21°Cで保存した日数

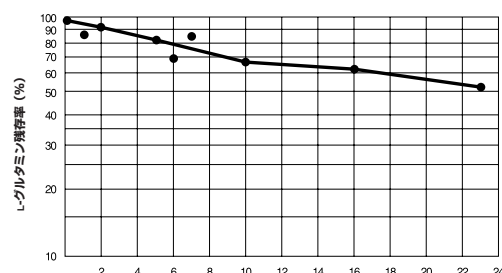


図6 pH 9.0, 21°Cで保存した日数

## 試薬

## アミノ酸

## 培地へのグルタミン添加

シグマ・アルドリッチの液体培地は、抗生物質および血清が添加されていないほか、ほとんどの製品には L-グルタミンも添加されていません。これによって、保存寿命が長くなり、用途の幅がさらに広がります。抗生物質および血清は、培地を使用する直前に必要量を無菌的に添加する必要があります。グルタミンを添加する場合は、200 mM L-glutamine Solution (製品番号G 7513) または L-glutamine Powder (製品番号G 5763 またはG 6392) を使用するようになしてください。G 7513は

滅菌濾過によって、G 6392は2.0~4.0 Mradの  $\gamma$  線照射によってそれぞれ滅菌されていることにご注意ください。製品番号G 5763は滅菌済み試薬ではないため、使用前に溶解して滅菌濾過する必要があります。調製した培地に適切な量のL-グルタミンを固体または液体として添加し、アミノ酸を推奨濃度に調節するには、以下の表をご参照ください。

液体培地	製品番号	200 mM L-glutamine Solution (ml/L)	L-glutamine Powder (g/L)
BME EBSS	B 1522	10.0	0.292
BME HBSS	B 2900	10.0	0.292
DME	D 0422	20.0	0.584
DME HEPES	D 6171	20.0	0.584
DME	D 5546	20.0	0.584
DME	D 5671	20.0	0.584
DME w/o phenol red	D 5921	20.0	0.584
DME	D 6546	20.0	0.584
DME/F-12	D 6421	12.5	0.365
Glasgow MEM	G 5154	10.0	0.292
IMDM Hybri-Max®	I 2762	20.0	0.584
IMDM	I 3390	20.0	0.584
L-15	L 5520	10.25	0.3
McCoy's 5A	M 8403	7.5	0.2192
M-199 EBSS	M 2154	3.4	0.1
M-199 HEPES	M 7528	3.4	0.1
M-199 HBSS	M 7653	3.4	0.1
MEM	M 2289	10.0	0.292
MEM	M 2414	10.0	0.292
MEM EBSS	M 2279	10.0	0.292
MEM Alpha	M 4526	10.0	0.292
MEM EBSS NEAA	M 5650	10.0	0.292
MEM HBSS	M 5775	10.0	0.292
MEM HEPES	M 7278	10.0	0.292
MEM EBSS	M 7647	10.0	0.292
MEM Joklik	M 8028	10.0	0.292
NCTC 109	N 1140	4.65	0.13573
Nut. Mix F-10	N 2147	5.0	0.146
Nut. Mix F-12	N 4888	5.0	0.146
Nut. Mix F-12 HEPES	N 8641	5.0	0.146
Nut. Mix F-10	N 6013	5.0	0.146
RPMI-1640	R 0883	10.25	0.3
RPMI-1640 Hybri-Max®	R 5507	10.25	0.3
RPMI-1640 HEPES	R 5632	10.25	0.3
RPMI-1640 HEPES	R 5886	10.25	0.3
RPMI-1640 mod.	R 7513	10.25	0.3
RPMI-1640 w/o phenol red	R 7509	10.25	0.3
RPMI-1640 Dutch mod.	R 7638	10.25	0.3
RPMI-1640	R 7880	10.25	0.3
RPMI-1640 w/o phenol red	R 8632	10.25	0.3
Williams' Medium E	W 4128	10.0	0.292