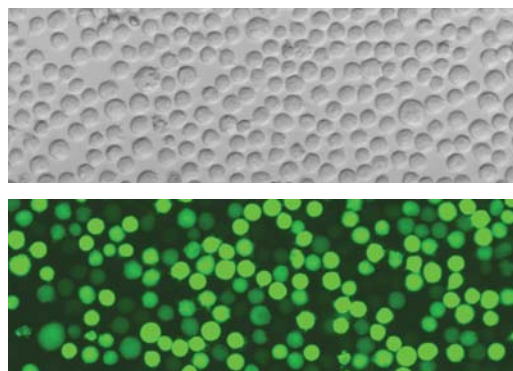


エレクトロポレーションによる遺伝子導入システム

Neon™ Transfection System

使用例集



ラット小脳初代培養細胞への蛍光タンパク質発現ベクターの導入

理化学研究所 BSI Launey 研究ユニット Thomas LAUNEY 先生



Credit: Launey Research Unit, RIKEN Brain Science Institute

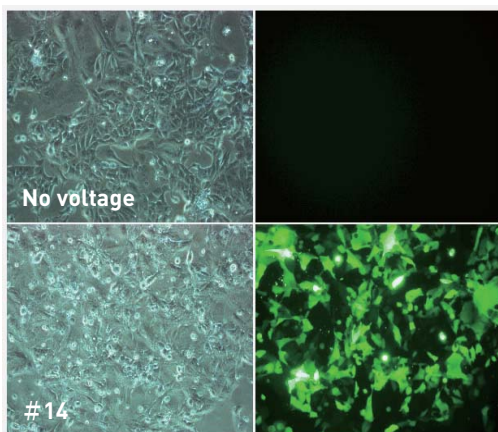
細胞種：ラット小脳初代培養細胞
条件：#7 (1200V, 30ms, 1pulse)

結果

Neon スタンダードプログラム #7(1200V, 30ms, 1pulse) で、膜タンパク -GFP 融合タンパク発現ベクターと Katushka (赤色蛍光タンパク質, 635nm, コントロール) ベクターを各 $6\mu\text{g}$ 導入し、その 3 週間後に固定・抗 GFP 抗体で免疫染色した。他の方法では導入が困難だった小脳プルキンエ培養細胞における膜タンパク -GFP 融合タンパク (緑色) の発現が低効率ながら観察された。Neon は他の手法と比較して簡便であり、スタンダードプログラムの範囲で上記の結果を得られたことから、さらなる最適化の余地は十分にあるものと思われる。

マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) への GFP 発現ベクターの導入

東京大学 農学部細胞生化学講座 田中 智 先生



細胞種：マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞)
条件：#14 (1200V, 20ms, 2pulse)

結果

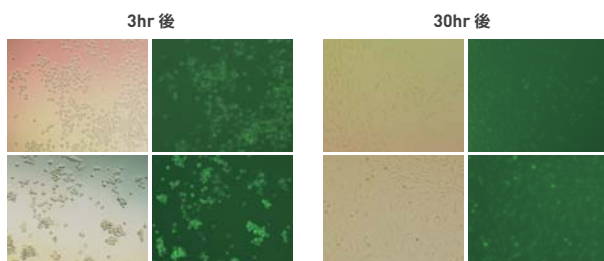
最適化プログラム #14(1200V, 20ms, 2 pulse) で 60-70% (目視) の細胞が GFP を発現していた。これまでもっとも高い効率が得られていた細胞を浮遊させた状態で行うリポフェクション法でも、導入効率は 30%未満である (参考文献 1)。従来法に比べ、非常に高い導入効率を得ることができた。

参考文献

1) Himeno, E., Tanaka, S. & Kunath, T. [2008]. Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1, Unit 1E 4.

Hela 細胞および U251 細胞への Alexa488 標識デキストランの導入

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻蛋白質工学研究室 上田 宏 先生



細胞種：Hela
条件：至適化条件 (1050V, 20ms, 1pulse)

細胞種：U251
条件：#7 (1200V, 30ms, 1pulse)

結果

3 時間後は Hela、U251 共にまだほとんどの細胞が丸い状態で元気がないようであったが、緑色蛍光でみた限り導入効率はとても高く、ほぼ全ての細胞が緑色に光っていた。また 30 時間後は多くの細胞がプレートにしっかりと張り付いて、分裂していた。全ての生細胞で蛍光が観察された訳ではないが、細胞分裂や蛍光の退色・細胞外への排出等を考慮すると、導入効率はかなり良いと言える。更に蛍光標識ウサギ IgG についても同等の条件での導入に成功しており、本機種はこの程度の分子量 (~150k) までの蛋白質の細胞内導入に十分使用可能と思われる。(データ省略)

肺癌細胞株（A549、H1993、H2347）への遺伝子導入

東京大学医学部附属病院 呼吸器内科 305 研 渡辺 広祐 先生

Fig1, A549 細胞

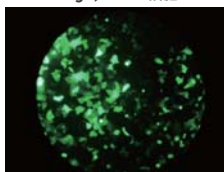


Fig2, H1993 細胞

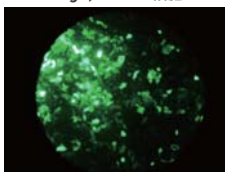
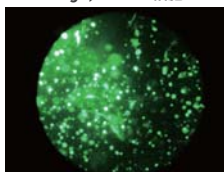


Fig3, H2347 細胞



細胞種：A549

条 件：#16 (1400V, 20ms, 2pulse)

細胞種：H1993

条 件：#15 (1300V, 20ms, 2pulse)

細胞種：H2347

条 件：#9 (1400V, 30ms, 1pulse)

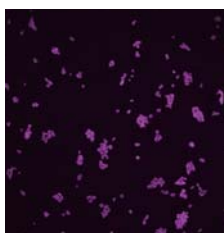
結果

A549 では最適の条件（1400V, 20ms, 2pulse）にて 80～90% 程度の導入効率が（Fig 1）、H1993 では最適の条件（1300V, 20ms, 2pulse）にて 80%程度の導入効率が認められ（Fig 2）、LipofectamineLTX と比較し良好な結果であり、細胞毒性も特に高くなかった。H2347 では最適条件（1400V, 30ms, 1pulse）でも細胞毒性が強く Viable な細胞は 2 割程度であったが、GFP の発現が認められた（Fig 3 は培地交換前）。

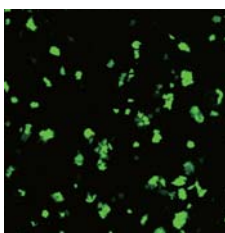
マウス ES 細胞への GFP 発現ベクターの導入

理化学研究所 BSI 神経遺伝研究チーム 浅田 幸江 先生

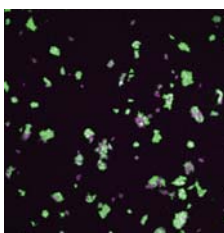
DAPI



GFP



merge



細胞種：マウス ES

条 件：#21 (1300V, 10ms, 3pulse)

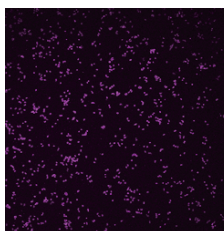
結果

フィーダーレスで培養したマウス ES 細胞に GFP 発現ベクターを導入した。導入 24 時間後細胞を固定し共焦点顕微鏡で DAPI、GFP の蛍光画像を取得した。画像解析ソフトを用いて総細胞数と GFP 発現細胞数を測定し、導入効率と生存率を算出した。今回、プログラム #21 (1300V, 10ms, 3pulse) において最も良好な結果が得られた。（90% 導入効率、20% 生存率）その他 6 種類のプログラムにおいても、80% 以上の導入効率、最大 35% の生存率が示された。条件検討により生存率が向上する可能性はあると思われる。

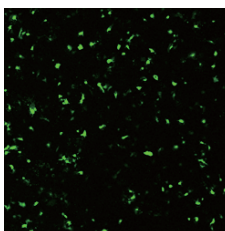
初代神経系細胞への GFP 発現ベクターの導入

理化学研究所 BSI 神経遺伝研究チーム 浅田 幸江 先生

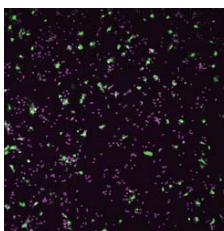
DAPI



GFP



merge



細胞種：初代神経系細胞

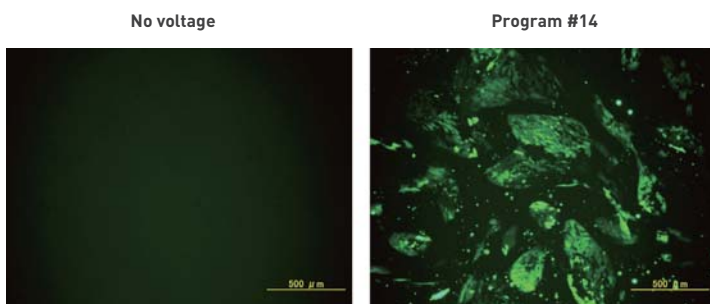
条 件：#23 (1500V, 20ms, 3pulse)

結果

胎生 16 日マウスの大脳海馬から調製した神経細胞に GFP 発現ベクターを導入した。導入 24 時間後細胞を固定し共焦点顕微鏡で DAPI、GFP の蛍光画像を取得した。画像解析ソフトを用いて総細胞数と GFP 発現細胞数を測定し、導入効率と生存率を算出した。今回、プログラム #23 (1500V, 20ms, 3pulse) で最も良好な結果が得られた。（28% 導入効率、21% 生存率）条件検討により導入効果および生存率が向上する可能性はあると思われる。

ヒト iPS 細胞への GFP 発現ベクターの導入

国立成育医療センター研究所 生殖・細胞医療研究部 三浦 巧 先生



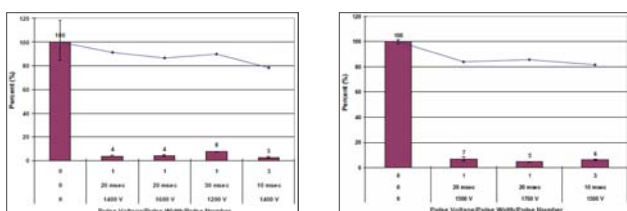
細胞種：ヒト iPS
条 件：#14 (1200V, 20ms, 2pulse)

結果

GFP 遺伝子を導入後、4 日目のヒト iPS 細胞の写真である。効率良く GFP 遺伝子が導入されていることが確認できた。今後、未分化性や分化能が維持されているかを確認する必要がある。

Jurkat 細胞と PC12 細胞での siRNA 効果の検証

Life Technologies R&D Ravi chandran, Lesslie Beauchamp



細胞種：Jurkat
条 件：#22 (1400V, 10ms, 3pulse)

細胞種：PC12
条 件：#5 (1700V, 20ms, 1pulse)

結果

Neon により 50pmol の GAPDH siRNA を導入し、24 時間後にノックダウン効果を検証した。Jurkat 細胞は、条件実施しすべて 90% 以上のノックダウン効率が見られ、1400V, 10ms, 3pulse の条件で最大 97% のノックダウン効率が見られた。PC12 細胞は、3 条件実施し、1700V, 20ms, 1pulse の条件で最大 95% のノックダウン効率を確認された。最高のノックダウン効率を確認された時の生存率は、alamablu 試薬で確認した結果、それぞれ約 80% と約 83% であった。

製品名	サイズ	製品番号	価格
Neon™ Transfection System ^{*1}	1 ユニット	MPK5000	¥900,000
Neon™ Transfection System Starter Pack ^{*2}	1 セット	MPK5000S	¥1,050,000
Neon™ Transfection System Kit (100μL)	1 キット	MPK10096	¥165,000
Neon™ Transfection System Kit (10μL)	1 キット	MPK1096	¥165,000
Neon™ Transfection Tubes (100 本)	1 パック	MPT100	¥49,000
Neon™ Pipette	1 ユニット	MPP100	¥75,000
Neon™ Pipette Station	1 ユニット	MPS100	¥100,000

*1 Neon™ Transfection System (MPK5000) は、Neon™ システム本体、Neon™ Pipette (MPP100)、Neon™ Pipette Station (MPS100) で構成されています。

*2 Starter Pack (MPK5000S) には、Neon™ Transfection System (MPK5000) に、Transfection Kit (MPK10096、MPK1096 各 1 キット) が添付されています。

* 価格に消費税は含まれておりません。記載の価格は 2012 年 4 月現在の価格です。価格は予告なしに変更する場合がありますので、予めご了承ください。

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8 TEL.03-6832-9300 FAX. 03-6832-9580
大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28 TEL.06-6389-1201 FAX. 06-6389-1206

■ コールセンター	0120-650591 (携帯からでもご利用いただけます)
■ テクニカルサポート	0120-477-392 FAX: 0120-477-120
■ オーダーサポート	TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
■ カスタムプライマーについて	TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9585
■ サービスラボ	TEL: 03-5753-3006 FAX: 03-5753-3007
■ 営業部	TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

研究用にのみ使用できます。診断目的及びその手続上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は弊社または各社の商標または登録商標です。

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan. IVN013-C12040B

www.lifetechnologies.co.jp

販売店

life
technologies™