

スーパーエレクトロポレーター-NEPA21 Type III

ネッパジーン社が開発したNEPA21 Type III スーパーエレクトロポレーターは、独自の4ステップ式マルチパルス方式に減衰率設定機能が加わり、遺伝子導入が困難と言われるプライマリー細胞(初代細胞)や免疫・血液系細胞へも高生存率・高導入効率を実現しました。また、高価な専用試薬・バッファーは使用しないので、膨大なランニングコストが掛からず大変経済的です。実機デモンストレーションを以下の要領で開催します。是非ご参加ください。

期間 令和8年 **5月8日(金)~7月8日(水)** 随時受付

内容 利用者のサンプルによるデモと取扱説明

場所 共同研究棟9階 9階培養室A(D91-02A) ※

※共同研では、動物を扱った実験はできませんので、in vivo実験をご希望の方は、許可された場所での実施をお願いします。

申込方法 ネッパジーン株式会社 営業部 松本光二郎 氏
E-mail: matsumoto@nepagene.jp
1)所属、2)氏名、3)連絡先、4)希望日時

◆今回のデモンストレーションは共同研デモとなります。導入は未定です。◆

NEPA21 Type IIIの特長

「定電圧モード」・「定電流モード」・「電流設定&定電圧モード」
の3モードから選択可能!! 最高電圧が上がりました。

◆アプリケーション(裏面を参照)

- in vitro
キュベット電極 初代細胞・iPS細胞・株化細胞問わず 高導入効率・高生存率
高価な専用試薬・バッファーは不要
オルガノイドに高効率の遺伝子導入
藻類(クラミドモナス・フェオダクチラム等)細胞壁ありのまま高効率導入
付着細胞用脚付電極 付着状態(接着状態のまま)細胞に高効率の遺伝子導入
- in vivo
マウス・ラット(筋肉・肝臓・皮膚・精巢・卵巣・眼球・膀胱・腎臓・脳・網膜・角膜)等の生体組織
や植物種子に直接遺伝子導入
[GONAD 法]
マウス・ラット卵管中の受精卵にCRSPR/Cas9を導入してゲノム編集
採卵・顕微注入・移植不要(パイプカットオス・偽妊娠メスも不要)
遺伝子改変マウス作製
- in utero(exo utero)
マウス・ラット子宮内胎児の脳室に直接遺伝子導入
- in ovo(ex ovo)
チックエンブリオ(ニワトリ胚)に直接遺伝子導入
- ex vivo
組織切片(脳等)・摘出臓器・全胚培養(マウス・ラット胎児)に直接遺伝子導入
[TAKE 法]
マウス・ラット・ブタ・マーモセット・カニクイザル受精卵にCRSPR/Cas9を導入してゲノム
編集1度のエレクトロポレーションで10~50個の受精卵に導入可能 遺伝子改変マウス

◆NEPA21 Type III



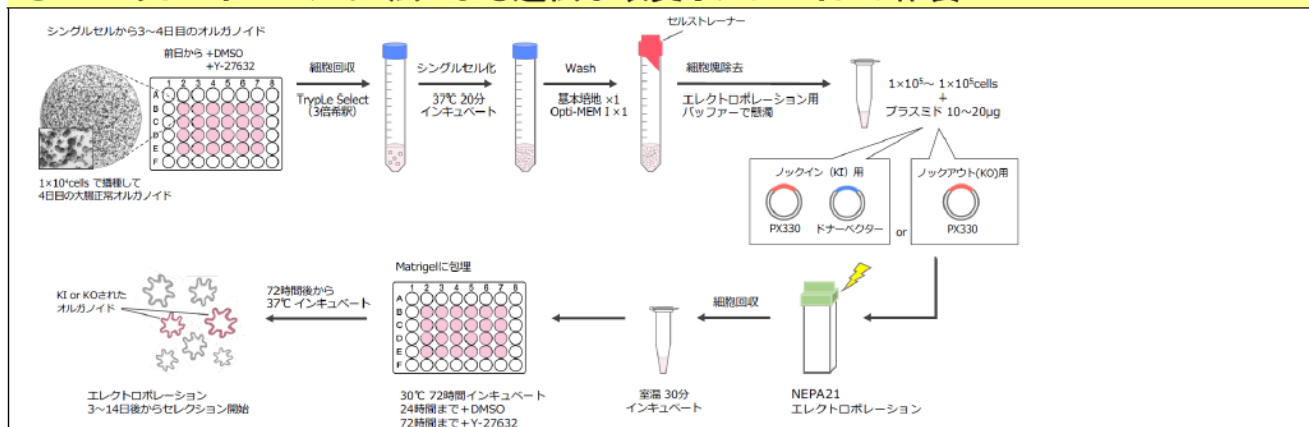
iPS 細胞

● ヒト iPS 細胞への NEPA21 エレクトロポレーターによる遺伝子導入プロトコール

- 電圧 12 条件を検討する場合、最低でも 10cm ディッシュにセミコンフルエントのヒト iPS 細胞 (1.5×10^7 cells 以上) が必要。
フィーダーフリーの培養条件が望ましい。
- ヒト iPS 細胞培地 StemFitAK02N、細胞剥離液 TrypLE Select (ライフテクノロジーズ社) または Accutase
- iMatrix-511 でコートした 6 ウェルプレート
- NEPA21 スーパーエレクトロポレーター (ネッパジーン社)
ヒト iPS 細胞への遺伝子導入は、FuGENE HD (プロメガ社) などを用いたリポフェクション法、Neon (ライフテクノロジーズ社) や Nucleofector (ロンザ社) などのエレクトロポレーターも使用可能であるが、導入効率および導入後の生存率の点で NEPA21 が優れている。
- NEPA キュベット電極セット 2mm gap (ネッパジーン社 #EC-002S)、キュベット電極用チャンパー (ネッパジーン社 #CU540)
- Opti-MEM (ライフテクノロジーズ社 #31985062) 血清・抗生物質不含のこと。
- プラスミド DNA: Qiagen 社や Nucleobond 社等の Maxi カラムで精製。できれば Endotoxin-free が望ましい。
2,000~4,000ng/ μ l の濃度で TE または純水に溶かして調整する。ゲノム等の目的外 DNA バンドが無いことを確認する。
- ROCK 阻害剤 Y-27632 (ナカライテクス社) ヒト ES/iPS 細胞は単細胞に分離すると Rho-associated kinase (ROCK) が活性化されアポトーシスが誘導される。この経路を阻害することで、単細胞分離時の細胞死を防ぐ。

オルガノイド

● エレクトロポレーション法による遺伝子改変オルガノイドの作製



細胞の準備

- ①エレクトロポレーション 3~4 日前、オルガノイドを TrypLE Select 10X (D-PBS:3 倍希釈) を用いてシングルセルパッセージし最適培地で培養する。
- ②エレクトロポレーション前日、培地に 1.25% (vol/vol) DMSO と Y-27632 (最終濃度: 10 μ M) を添加する。
- ③エレクトロポレーション当日、オルガノイドを TrypLE Select 10X (D-PBS:3 倍希釈) を用いて 37°C で 20 分インキュベートしシングルセル化する。この際、5 分おきにピペッティングする。
- ④基本培地^{*1}を 14ml まで加え、室温で 400 × g、3 分間遠心分離する。
- ⑤上清を除き、Opti-MEM I を 14ml 加えてピペッティングした後、室温で 400 × g、3 分間遠心分離する。
- ⑥上清を除き、Opti-MEM I を 1ml 加えてピペッティングした細胞懸濁液を 20 μ m のセルストレーナーに通し細胞塊を除去、シングルセルのみを回収する。
- ⑦細胞数を計測し、1 条件当たり 1.0 × 10⁵ ~ 1.0 × 10⁶ cells となるように 1.5ml の低吸着チューブに細胞懸濁液を移す。
細胞数は 3.0 × 10⁵ cells 以上を推奨する。
- ⑧室温で 400 × g、3 分間遠心分離し上清を完全に取り除いた後、90 μ l のエレクトロポレーション用バッファー (BTXpress buffer) で懸濁する。