



今回のTechTalkでは、ご使用の4D-Nucleofector™ XユニットにおけるNucleofection™の実験条件を最適化するためのガイドラインと、ご使用いただく際によくいただくご質問をQ&A形式でご紹介します。

Q. 4D-Nucleofector™ Xユニットを使用する際、Nucleofection™の実験条件の最適化はどんな場合に行う必要がありますか？

A. Nucleofectionを成功させるためには、個々の細胞に適した最適条件を使用することが重要です。この最適化は、ご使用になる細胞に適した4D-Nucleofector™ XユニットのLonza社の推奨プロトコルがない場合に必要となります。最適化されたプロトコルが利用できるかどうかは、Lonzaのウェブサイトもしくは細胞遺伝子導入データベース (www.lonza.com/celldatabase) をご覧いただくか、技術サポートチームにご連絡下さい。

なお、96-well Shuttle™ システムでの実験条件は、4D-Nucleofector™ を用いたNucleocuvette™ ストリップ中での20 µL反応と同等です。従って、4D-Nucleofector™ Xユニットと96-well Shuttle™ システムの実験条件は、どちらのデバイスでもご使用いただけます。

Q. Nucleofector™ I またはIIの実験条件は、4D-Nucleofector™ Xユニットに対応していますか？

A. 4D-Nucleofector™ システムはNucleofector™ テクノロジーをアップグレードしており、導入用試薬およびプログラムの互換性はありません。4D-Nucleofector™ システムでの主な改善点は下記の通りです。

- 2種類のNucleofection™ キュベットをご使用になれます。キュベットの種類としては、多数の細胞数へ対応可能な100 µL Nucleocuvette™ (2×105~2×107個) と少数の細胞数へ対応している20 µL Nucleocuvette™ ストリップ (2×104~106個) をが使用可能です。Nucleofection の実験条件は、これら2種類のキュベット間で共通です。
- Nucleocuvette™ にはアルミニウムではなく導電性ポリマーを使用しているため、Nucleofection 後の細胞生存率が改善されました。
- 効率化された4D-Nucleofector™ 試薬では、ご使用の細胞に適したNucleofector™ 試薬を簡単に見つけることができます。
- より幅のあるプログラム条件の設定により、最適化の幅が広がりました。これらの違いにより、Nucleofector™ I またはII デバイスに推奨されている導入試薬およびプログラムは4D-Nucleofector™ システムに対応しません。しかしながら、4D-Nucleofector™ Xユニットを用いて最適化を行うことにより、Nucleofection™の結果を更に改善する可能性があります。

Q. どのパラメーターを最適化することができますか？

A. Nucleofection™ の最適化において最も重要なパラメーターはNucleofector™ 試薬 (Nucleofector™ キットに付属) とプログラム (Nucleofector™ 装置から伝達される電気パルス) です。初めて実験を行う場合は、20 µLのNucleofection™ 反応において200,000個の細胞および0.4 µgのプラスミドをご使用になることをお勧めします。細胞数および基質量はさらに最適化が可能です。(参考文献1)

Q. 最適化にはどんな基質が使用出来ますか？

A. 最適化には、使用する基質 (プラスミド、siRNA、タンパク質もしくは化合物) に関係なく、常にpmaxGFP™ ベクターをご使用いただくことをお勧めします。まずはpmaxGFP™ ベクターを用いてNucleofection™の実験条件を確立すれば、その後はお好みの基質をご使用になれます。pmaxGFP™ ベクターを最適化に用いることで、基質調製の質や分析のタイミングといったさまざまな変数をなくすることができます。

Q. 最適化のためには、どのNucleofection™ フォーマットを用いればよいですか？

A. 4D-Nucleofector™ Xユニットは最適化のステップを簡略化できるようデザインされています。より少ない細胞で最適化を行うために、20 µL Nucleocuvette™ ストリップをご使用になることをお勧めします。当社の初代細胞 (Primary Cell) もしくは細胞株 (Cell Line) の最適化Nucleofector™ キットはこのフォーマットに対応しています。いったん最適な実験条件を決定すると、同じ溶液と同じプログラムを使用し細胞数と基質量を5倍にすると、簡単に100 µL Nucleocuvette™ に切り替えることができます。

Q. Nucleofection™ の実験条件を4D-Nucleofector™ Xユニットでどのように最適化すればよいですか？

A. ご使用の細胞に推奨されるプロトコルがない場合は、下記の3つの選択肢をお試し下さい。(Decision Guiding Schemeをご覧ください。)

- 推奨されるプロトコルがない場合は、第一段階として基本最適化プロトコルを使用します。このステップでは、5つのNucleofector™ 試薬 (P1からP5は初代細胞用、SE、SF、SGは細胞株用) を15の異なるプログラムをテストします。(参考文献2)
- 細胞が特定の種類 (線維芽、内皮、上皮、神経、幹細胞、等) に分類可能な場合には、4D-Nucleofector™ Xユニットのそれぞれの細胞種の基本最適化プロトコルによる最適化を行います。細胞種ごとの基本最適化プロトコルは、6~7個のプログラムを1つもしくは2つのNucleofector™ 試薬を使用します。
- 多くの細胞については、Nucleofector™ 実績データベースに、4D-Nucleofector™ Xユニット用として実験条件とデータが記述されています。これらのデータには、ユーザーからのフィードバックいただいたデータも含まれており、更に条件検討が必要なものもあります。これらについては、まず記述された条件をテストする、または先に述べた初めの2つのオプションをお試しいただくことが考えられます。



Q. Nucleofection™ 最適化のためには、どのような情報が必要ですか？

A. Nucleofection™ 後、24時間および必要なタイムポイントで導入効率と細胞の生存率を記録してください。導入効率は、蛍光顕微鏡またはFACS分析による、GFPを発現している生存細胞の割合で表されます。用途によっては、FACS解析ではGFPシグナルの強度をX-平均 (X-mean) として記録してください。細胞生存率はトリパンブルーの取り込みなどの細胞生存率アッセイで測定してください。また、電気プログラムに依存しないバックグラウンドとしての細胞生存率を得るために、Nucleofector™ 溶液ごとに電気パルスなしのコントロールテストすることをお勧めします。

Q. Nucleofection™ の実験条件をさらに改善するにはどうすればよいですか？

A. いったん最適化の第1段階でNucleofection™ の結果が得られたら、その結果をe-mailで<bioscience.technicalsupport.jp@lonza.com>に送信していただくと、より良い結果が得られると思われるプログラムについてご連絡いたします。(フィードバックをリクエストすることが可能です。)

図のDecision Guiding Schemeに示されている微調整表は基本最適化プロトコルの実験結果から、微調整を行うために使用することができます。(参考文献2)

- 最もよい結果の得られる初期プログラム (DN-100など) を微調整表からお選びください。最適化の第1段階に述べられている15のプログラムは表の中央に垂直に並んでいます。
- 細胞生存率を上げるためには、選択したプログラムの左側にあるプログラムをお使いください (DH-100など)。導入効率を上げるためには、初期プログラムから右のプログラムをお使いください (ER-100など)。はじめに選択したプログラムからさらに左もしくは右に行くほど、それぞれ生存率もしくは導入効率がさらに改善される可能性が高まります。

参考文献

- Optimization of adult sensory neuron electroporation to study mechanisms of neurite growth. McCall J, Nicholson L, Weidner N and Blesch A. 2012. *Frontiers in Molecular Neurosciences*, Volume 5, Article 11.
- Optimization of mouse neural stem/progenitor cell (NSC) transfection with the 4D-Nucleofector™ System. Bertram B, von Holst A and Muster G. 2011. Lonza Application Notes & Toss Sheets, CD-SP001.

解決への図解

使用する細胞は、4D-Nucleofector™ の実験条件を最適化を必要とするか？

