

Wako Bio Window

2003. NOV.

特集号

No.54

<http://www.wako-chem.co.jp>

遺伝子関連製品

アポトーシス関連製品

P.2~P.8

Apoptosis Ladder Detection Kit *wako*

Apoptosis Ladder Detection Kit *wako* Q&A

Apoptosis *in situ* Detection Kit *wako*

Apoptosis *in situ* Detection Kit *wako* Q&A

Apoptosis Screening Kit *wako*

アネキシン V-フルオレセイン染色キット

PARP Western Blot Kit *wako*

Apotech社 アポトーシス/ミトコンドリア関連抗体

遺伝子導入製品

P.9~P.16

amaxa社 Nucleofector™ System

免疫細胞への導入

心臓血管系細胞への導入

マウス胚線維芽細胞 (MEF) への導入

神経細胞系への導入

株化細胞への導入

Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit

siRNA 導入アプリケーション

お知らせ

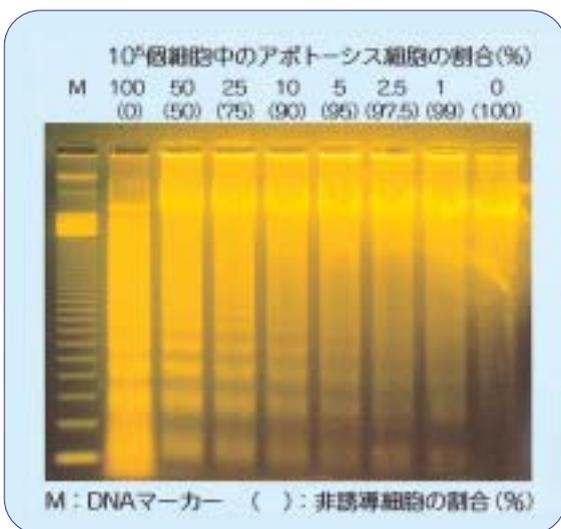
Nucleofector™ Deviceのプログラムバージョンアップ (V2.1) のお知らせ p.13

Apoptosis Ladder Detection Kit *wako*

アポトーシスは発生・分化・成熟・老化過程において細胞（組織）の統御されたシステムの中で、機能的に不要になった細胞の除去や、異常を来し有害となった細胞の積極的な排除が、遺伝子により制御されている細胞の死として理解されています。細胞のアポトーシスの測定は、細胞機能の基礎的研究のみならず、薬剤の開発研究などに盛んに行われています。

本キットは、高感度蛍光試薬によりアポトーシス細胞中のDNAラダーを検出するように設計されています。分析に使用する主要な試薬がすべて揃っており、簡便、迅速に再現性よく、培養細胞および組織細胞のアポトーシスによるラダーを検出することができます。

高感度検出	-----> 10 ³ 個のアポトーシス細胞が検出できます。
迅速な分析	-----> 細胞の溶解、DNAの抽出、電気泳動、SYBR® Green による染色、DNAラダーの検出までの一連の操作時間は約2時間30分です。
簡便な操作	-----> 最適化された試薬をプロトコールに従って使用するだけでアポトーシスが検出できます。
高い再現性	-----> 細胞中のタンパク質や脂質の影響を受けない独自のDNA抽出法を採用しているため、電気泳動できれいなラダー像が得られます。
安全な操作	-----> フェノールやクロロホルムのような有害な有機溶媒を使用しません。



アポトーシス誘導されたHL-60細胞の検出

HL-60細胞をアクチノマイシンDでアポトーシス誘導し、アポトーシス誘導細胞と非誘導細胞を各比率でtotal 10⁶個細胞に調製して、DNAラダーを本キットで検出しました。100%(10³個アポトーシス細胞)のサンプルにおいて、ヌクレオソーム単位で断片化したDNAが検出されました。



【キット内容】

- ▶ Enzyme Reaction Solution 18ml × 1本
 - ▶ RNase 1ml/用 × 1本
 - ▶ Enzyme Activator 2ml/用 × 1本
 - ▶ Protein Digestion Enzyme 1ml/用 × 1本
 - ▶ DNA Extraction Solution 30ml × 1本
 - ▶ TE Buffer 1.5ml × 1本
 - ▶ Agarise Gel 12レーン用 × 2枚 (24レーン用)
..... 12レーン用 × 8枚 (96レーン用)
 - ▶ Loading Buffer(10 ×)..... 200 μl × 1本
 - ▶ Ladder Marker(123bp) 200 μl × 1本
 - ▶ SYBR® Green *1 100 μl × 1本
- *1 : 本品はMolecular Probes, Inc.製です。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-53204	Apoptosis Ladder Detection Kit <i>wako</i>	アポトーシス研究用	24レーン用	36,000
297-53201			96レーン用	58,000

Q & A

キットの性能

Q 分析可能な細胞数は？

A $10^3 \sim 10^6$ 個です。 10^3 個未満は検出限界以下、 10^7 個以上では回収DNAの粘度が高すぎてアガロースゲルにアプライしにくくなります。

Q 組織細胞のアポトーシスを検出するには？

A 未固定の新鮮組織により作製した凍結切片からは、専用プロトコールに従って操作することにより検出可能です。

Q キット以外に用意するものは？

A 試薬類はイソプロパノール、70%エタノール、TAE Buffer、滅菌蒸留水が必要です。器具類は1.5mlマイクロチューブ、遠心機、サブマリン型電気泳動装置、染色トレイ、シェーカー、UVトランスイルミネーター、ポラロイドカメラ、Yellow Gelatin Filter(SYBR® Green Gel Photographic Filter)が必要です。

電気泳動

Q 使用できる電気泳動装置は？

A サブマリン型電気泳動装置で、ミュービッド等が使用できます。

Q アガロースゲルへのDNAサンプルのアプライ量は？

A Loading Bufferと合わせて $12 \sim 20 \mu\text{l}$ です。DNA量として $10\text{ng} \sim 10 \mu\text{g}$ になります。

Q 電気泳動写真できれいなラダー像を得るには？

A アプライするDNA量がアポトーシス細胞 10^4 個相当になるようTE Bufferで希釈して下さい。 10^5 個以上のアポトーシス細胞から得られるDNA量は、SYBR® Green 染色では過剰な蛍光を生じるため、きれいなラダー像が得られません。

Q 電気泳動は何分間くらいすればいいの？

A $30 \sim 40$ 分間です。目安として、Loading Buffer中の色素のうちBPB(泳動速度の速い方)がゲルの陽極端より約1cm手前に到達するまでと考えて下さい。

Q TAE Bufferの調製法とは？

A 以下の組成で $50 \times$ ストック溶液を調製するか、あるいは $50 \times$ TAE(コードNo. 313-90035)を用意し、使用時に50倍希釈して下さい。 $50 \times$ ストック溶液: Tris Base 242g、Glacial Acid 57.1ml、0.5M EDTA 100ml(pH8.0)

Q 泳動BufferにTBEは使えるの？

A 使えません。添付のアガロースゲルはTAEを用いて作製されていますので、泳動BufferもTAEを使って下さい。

SYBR® Green

Q SYBR® Green とEtBrの違いは？

A SYBR® Green とEtBrと同様、核酸のインターカレーターです。EtBrに比べ、検出感度が25倍、変異原性が低いことなどが特長です。

Q SYBR® Green を取り扱う場合に注意することは？

A DMSO溶液のため、保護手袋を二重に着用して使用して下さい。

Q SYBR® Green の保存方法は？

A キット開封後は、ボルテックスミキサーで十分に攪拌し、アガロースゲル1枚当りの使用量(約 $12 \mu\text{l}$)ずつポリプロピレン容器に分注、 -20°C で遮光保存して、使用直前に室温まで速やかに解凍して下さい。ガラス製やその他の容器では、色素が吸着するために保存安定性が低下します。

Q SYBR® Green を希釈するには？

A TAB Bufferを用いて、 $1:10,000$ まで行って下さい。さらに希釈すると検出感度が低下します。また、蒸留水で希釈しても感度が低下します。

Q 希釈したSYBR® Green 溶液の保存安定性は？

A 室温あるいは 4°C にて遮光保存した場合で24時間です。

Q SYBR® Green による染色時間は？

A 少なくとも30分間以上行って下さい。30分間以下では検出感度が低下します。また、120分間までは延長しても感度は変わりません。

Q SYBR® Green の破棄方法は？

A EtBrの際と同様に活性炭を用いた濾過を行い、SYBR® Green を吸着させて、吸着後の活性炭を焼却して下さい。活性炭フィルターにはEXTRACTOR(コードNo. 532-41011)が使用できます。

Q SYBR® Green 染色したアガロースゲルに照射するUVの波長は？

A 短波長の方が効果的で、 254nm で最も感度のよい結果が得られます。 300nm では感度が低下します。

Q SYBR® Green 染色したアガロースゲルへのUV照射時間は？

A UV照射による励起時間は1分間以内にして下さい。15分間を越えると、著明に検出感度が低下します。低下の程度は照射時間に依存します。また、一度蛍光強度の減少が生じる(検出感度が低下する)と、UV再照射あるいはSYBR® Green で再染色後に照射しても蛍光強度は増加しません。

トラブルシューティング

Q 抽出して得られたDNAがTE Bufferに溶解しにくい時は？

A ペレットDNAは乾燥させすぎると溶解しにくくなります。この場合は、十分に(一晚程度)時間をかけて溶解して下さい。ピペティングによる混合はDNA損傷の原因となりますので避けて下さい。

Q 十分な検出感度が得られない場合は？

A 本キットによる検出限界はアポトーシス細胞 10^3 個です。従って、アポトーシス誘導率が100%未満の試料では、 10^3 個細胞からアポトーシス細胞は検出できませんので、初発細胞数を $10^4 \sim 10^6$ 個に増やして検出を行って下さい。

Q 電気泳動写真上でLadder Markerのバンドが薄い、あるいは、ほとんど見えない場合は？

A カメラの露光が少ない時は、Ladder MarkerやDNAサンプルのバンドが見えにくいことがあります。カメラのシャッタースピードや絞りを調節し、露光をより多くして写真撮影して下さい。

Apoptosis *in situ* Detection Kit wako

本キットは、TUNEL法(TdT-mediated dUTP nick end labeling)に基づいたキットで、パラフィン包埋組織切片や凍結切片や中性ホルマリン固定した培養細胞中のアポトーシス細胞を高感度に検出することができます。本キットは、使用する主要な試薬がすべてそろっているため、簡便かつ迅速にアポトーシスを検出することができます。

【特長】

迅速な検出ができます。

例えばパラフィン包埋組織切片の場合、脱パラフィンから検鏡までの一連の作業時間は、約2時間です。

操作が簡単です。

各ステップの主要な反応試薬を全てセット化、わずらわしい試薬の調製は不要です。

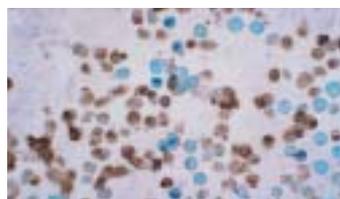
バックグラウンドが低く、きれいなシグナルを得ることができます。

2cm²の大きな切片でも処理できます。

【キット内容】(各1本)

- ▶ Protein Digestion Enzyme 1ml
- ▶ TdT 40 μl
- ▶ TdT Substrate Solution 4.4ml
- ▶ 100 × POD-Conjugated Antibody 44 μl
- ▶ DAB Solution 4.4ml
- ▶ DAB Enhancer 200 μl
- ▶ DNase 4 μl
- ▶ 10 × DNase Reaction Buffer 40ml

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
295-53501	Apoptosis <i>in situ</i> Detection Kit wako	40回用	60,000



培養細胞CHO-K1: アポトーシス誘導後(クロルプロマジン処理) (×400)



ラット小腸 (×400)



ヒトB cellリンパ腫: HE染色(×200)

Q & A

Q PBSは、予めどのくらい調製すればよいですか？

A パラフィン包埋切片の場合、PBSの洗浄操作は、計12回あります。また、DNase による陽性コントロールの反応を行うと計14回になります。余裕を持って、2,000mlくらい調製しておくことをお奨めします。

Q 1回の反応で検出できる切片の大きさはどのくらいですか？

A 1cm²以下の切片が理想ですが、最大では約2cm²の切片を処理することができます。

Q DAB溶液に沈澱が生じているのですが、発色に影響はないですか？

A 多少沈澱が生じているだけでは問題ありません。上清を使用して下さい。キット開封後は、なるべく超低温(-80)に保存して下さい。

Q POD標識抗体の免疫動物は何ですか？

A ヒツジです。

Q バックグラウンドが高いのですが...

A POD標識抗体反応の前にブロッキング反応を行って下さい。1% ヒツジ血清 / 5% BSA / 0.1% Tween20 / 3M NaCl / 10mM リン酸Buffer(pH7.4)を調製し、室温で約1時間反応後、PBSで5分間、3回洗浄して抗体反応に移って下さい。組織の状態や種類などにより、バックグラウンドが下がる場合があります。

Q 発色後の脱水処理は、エタノールとn-ブタノールどちらがよいですか？

A n-ブタノールの方が色彩鮮やかに染まります。

Q メチルグリーン溶液は販売していますか？

A アポトーシス研究用のメチルグリーン溶液を販売しています(コードNo.138-12701、100ml/4,000円)。

Q 検体として培養細胞を用いたのですが、DNase I処理しても全くシグナルが観察できなかったのですが...

A 筋組織由来の培養細胞など細胞の種類により浸透化処理だけでは不十分な場合があります。その場合、浸透化処理後にタンパク質分解酵素処理(例えば37、5分間)を行って下さい。

Q シグナルがでないのですが...

A シグナルがでない理由として、DNAの切断を伴うアポトーシスが生じていない場合と反応がうまくいっていないため検出できない場合の2つが考えられます。その場合、DNase により陽性コントロールを同時に行うことで判定することができます。陽性コントロールにシグナルが検出され、標準検体にシグナルがでない場合は、DNA切断を伴うアポトーシスが生じていない場合が考えられます。陽性コントロールにもシグナルが確認されない場合は、反応がうまくいっていない場合が考えられます。その場合、タンパク質分解時間を長くするか、分解酵素の添加量を多くすると効果的な場合があります。

【参考文献】

- 1) Nobuo, F., Hironobu, S., Soichirou, S., Masaki, N., Daiji, I., Ryoji, O. and Hiroshi, N.: *J. Pathol.*, 186, 429(1998)
- 2) Hong-Chuan, L., Shinji, Y., Junichiro, S., Hong, L., Subrata, G., Jhon, B., Carolina, L., Toshinobu, F., Mitsuaki, K. and Shunro, S.: *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 34(2000)
- 3) Shibata MA, Morimoto J, Otsuki Y.: *Cancer Gene Ther.* 2002 Jan; 9(1): 16-27.
- 4) Shibata MA, Horiguchi T, Morimoto J, Otsuki Y.: *J Gene Med.* 2003 Mar; 5(3): 219-31.
- 5) 柴田雅朗・森本 純司・伊藤 裕子・大槻 勝紀: *乳癌基礎研究* Vol. 12. 17-22 2003.

Apoptosis Screening Kit *wako*

アポトーシスの生化学的検出法であるTUNEL法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) の原理を利用し、アポトーシス細胞をマイクロプレート内で標識、発色させるキットです。多検体処理が可能ですので、ドラッグスクリーニングに適したキットです。



【特 長】

- 96穴のマイクロプレートで検出できます。
- 10⁴個の細胞に含まれる10³個以上のアポトーシス細胞を検出できます。
- 使用する試薬がすべてセット化されているため、簡単かつ迅速に検出できます。
- 全工程を3時間で行うことができます。
- アポトーシスの程度を数値化できます。

【備 考】実績のある細胞

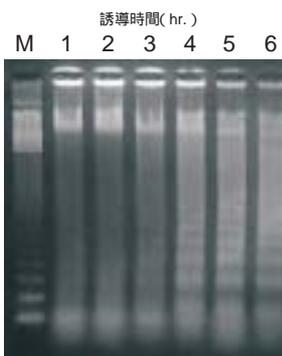
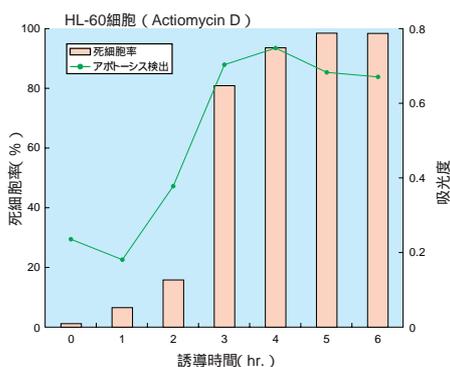
- 付着細胞：HepG2, CHO, HT-29
- 浮遊細胞：HL-60, U937

【キット内容】

- ▶ Fixation Solution 580 μl × 1本
- ▶ Permeabilize Solution 19.2ml × 1本
- ▶ TdT 20 μl × 1本
- ▶ TdT Substrate Solution 4.8ml × 1本
- ▶ Hydrogen peroxide 340 μl × 1本
- ▶ 500 × POD-conjugated Antibody 20 μl × 1本
- ▶ Antibody Dilution 9.6ml × 1本
- ▶ Chromogenic Substrate (DAB) 2mg錠 × 5錠
- ▶ Chromogenic Substrate Buffer 10ml × 1本
- ▶ Stop Solution 9.6ml × 1本
- ▶ Sterilized Microtiter Plate 96ウエル × 1枚

【HL60細胞(Actinomycin D誘導)】

HL-60 細胞のアポトーシス誘導



DNAラダー検出

10⁴個のHL-60を各ウェルに分注し、1時間おきに1 μg/ml/アクチノマイシンDを添加して培養し、経時的に吸光度を測定した。その後、プロトコールに従って検出を行い、顕微鏡下で細胞の形態的観察により死細胞率を算出し、吸光度との関係を見た。また、経時的にラダー検出を行った。

コードNo.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
291-55801	Apoptosis Screening Kit <i>wako</i>	96回用	46,000

アネキシン - フルオレセイン染色キット

アポトーシスの初期段階では、通常細胞膜の内側に存在するホスファチジルセリンが細胞膜表面へ移動することが知られています。アネキシンVはCa²⁺の存在下でホスファチジルセリンと特異的に結合しますので、本品は蛍光法によりアポトーシス細胞を検出することができます。また、DNAと結合するよう化プロピジウムを用いて二重染色することにより、初期段階のアポトーシスとネクローシスを容易に区別することが可能です。

【染色方法】

A. フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡

- 1) 10⁶個の細胞をPBSで洗い、5分間、200 × gで遠心分離します。
- 2) 細胞ペレットを染色液100 μlで再懸濁させ、15 ~ 25 °Cで10 ~ 15分間インキュベートします。
- 3) 蛍光顕微鏡で分析する場合は、励起波長450 ~ 500nm、検出波長515 ~ 565nmで行います。フローサイトメトリーを用いる場合は、細胞濃度に従いBinding Bufferを0.4 ~ 0.8ml/加えます。励起波長488nm、Fluorescein検出には515nm、Propidium Iodide検出には600nm以上のフィルターを用いて分析します。

B. 付着細胞

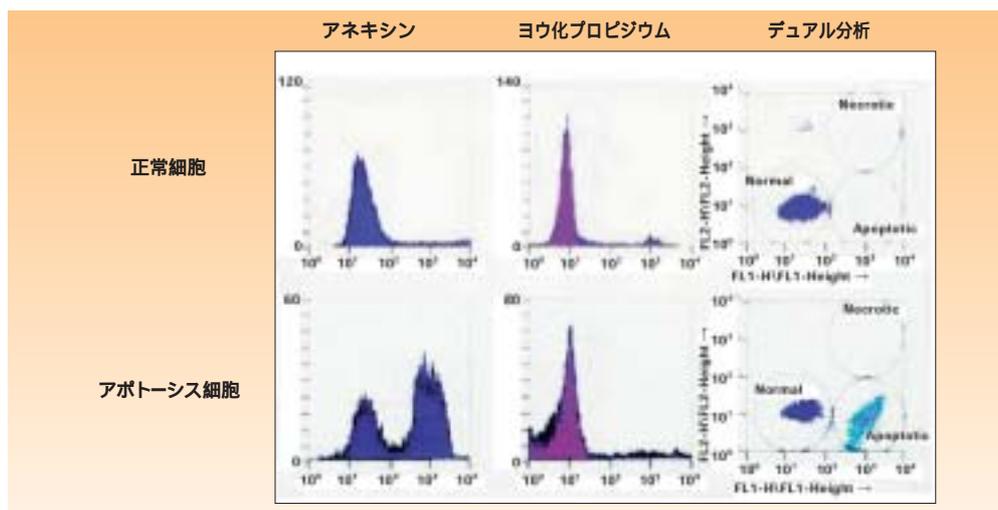
- 1) 染色する前にチャンバースライドで細胞を成長させ、アポトーシスを誘導させます。
- 2) チャンバーを取り除きます。
- 3) 培養液を取り除き、染色液100 μlでスライドを覆います。
- 4) スライドにカバースリップを被せ、15 ~ 25 °Cで10 ~ 15分間インキュベートします。
- 5) A . 3)と同様の操作を行います。

【キット内容】

- ▶ Annexin V-Fluorescein110 μl
- ▶ Propidium Iodide.....150 μl
- ▶ Binding Buffer50ml

【染色液の調製】

10サンプルを染色するには、Annexin V-Fluorescein 20 μlをBinding Buffer 1,000 μlで希釈した後、Propidium Iodide 20 μlを加えます。



カンプトテシン処理したU937細胞のFACS分析

(上段)カンプトテシン未処理、(下段)カンプトテシン処理(4 μg/ml)

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-55901	Annexin V-Fluorescein Staining Kit	アポトーシス研究用	50回用	40,000

【参考文献】

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. : *J. Immunol. Methods*, 184, 39(1995)

PARP Western Blot Kit *wako*

アポトーシスの実行過程において、様々なタンパク質がカスパーゼによって分解されます。ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ〔PARP〕もその一つで、アポトーシスの初期にカスパーゼ3によって分解されることが知られています。本キットはこのPARPの分解産物を生化学的解析手法の一つであるウエスタンブロット法を用いて検出するシステムです。アポトーシスの生化学的な検出法には従来より、アネキシン法、TUNEL法などが知られていますが、それらと本キットを組み合わせることでより正確なアポトーシスの判定が可能になります。

【特長】

- 各ステップの主な反応試薬をセット化
- PARP分解産物(85kDa)およびPARP(116kDa)を検出可能

【キット内容】(各1本)

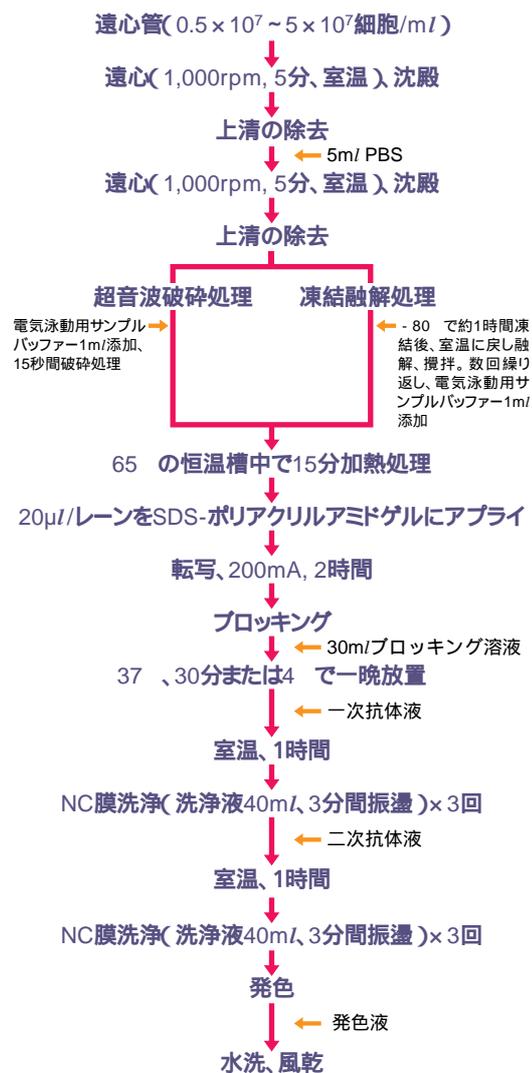
- ▶ 一次抗体..... 40 μl
- ▶ ALP標識二次抗体..... 40 μl
- ▶ 洗浄液(5×)..... 100ml
- ▶ ブロッキング溶液..... 90ml
- ▶ 基質発色液(BCIP)..... 70 μl
- ▶ 基質発色液(NBT)..... 150 μl
- ▶ 発色用緩衝液..... 25ml

* メンブレンはキットに付属しておりません。別にご用意下さい。PVDF膜ではバックグラウンドが高く、検出感度が低いため本キットには適していません。ニトロセルロース膜(ミリポア社イモビロン-NC Standard)を推奨いたします。

* お使いになる細胞によって実験プロトコルが変わりますので、最適な系を実験毎にご確認の上ご使用下さい。

* サンプルバッファー中に6M Ureaを添加、また超音波破碎を行っているのは、PARP/DNA結合体から効率よくPARPを分離するためです。

【実験操作フローチャート】



上記フローチャートは、NC膜1枚分使用時のプロトコルです。

コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
295-56801	PARP Western Blot Kit <i>wako</i>	アポトーシス研究用	24レーン用	35,000

【関連製品】

種別	コードNo.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
酵素	168-18821	Poly(ADP-ribose) polymerase, from Bovine Thymus	生化学用	100 μg	52,000
PARP阻害剤	018-18611	4-Amino-1,8-naphthalimide	生化学用	20mg	11,000
PARP阻害剤	166-20211	α(5H)-Phenanthridinone	生化学用	500mg	24,000

アポトーシス / ミトコンドリア関連抗体

約1,000品目のアポトーシス関連抗体、測定キット及び関連試薬をラインナップしているApotech社製品の取り扱いを開始致しました。

【主な分野】

Apoptosis/Detection, Death Receptors, Caspases, Bcl-2 Family, Mitochondria, DNA Fragmentation, PARP-1
 Inflammation/TNF & TNF-R Superfamily, IL-1R & TLR, NF B & JNK Signaling
 Cancer Research/MDR
 Obesity & Diabetes Research

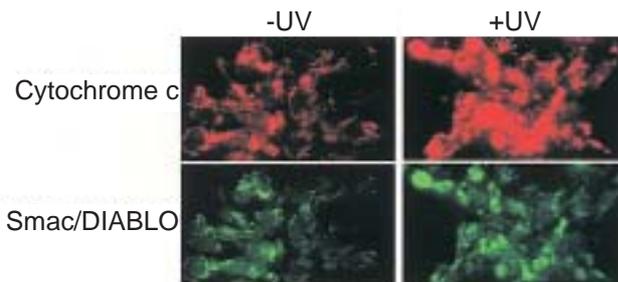
下記11品目について在庫致しております。

【在庫品】

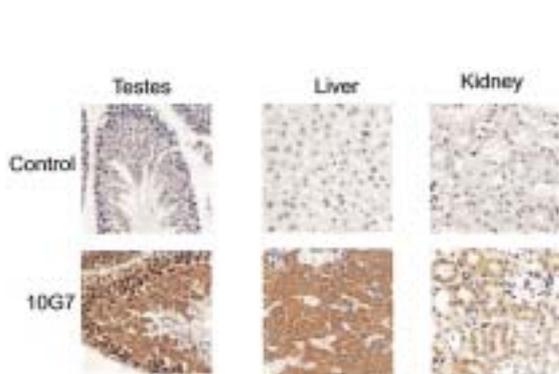
コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
575-72451	APO-20A-069-C100	Anti Mouse Smac/DIABLO, Monoclonal Antibody	100 µg	69,600
572-72461	APO-20A-066-C100	Anti Human Smac/DIABLO, Monoclonal Antibody	100 µg	69,600
579-72471	APO-20A-060-C100	Anti Human Apaf-1, Monoclonal Antibody	100 µg	76,800
576-72481	APO-20A-061-C100	Anti Mouse Apaf-1, Monoclonal Antibody (13F11)	100 µg	76,800
573-72491	APO-20A-062-C100	Anti Mouse Apaf-1, Monoclonal Antibody (18H2)	100 µg	76,800
576-72501	APO-20A-063-C100	Anti Rat Native Cytochrome c, Monoclonal Antibody	100 µg	63,800
573-72511	APO-20A-007-C100	Anti Horse Denatured Cytochrome c, Monoclonal Antibody	100 µg	56,500
570-72521	APO-25A-011-C100	Anti Active Caspase-3, Rabbit	100 µg	107,000
577-72531	APO-25A-025-C100	Anti Active Caspase-9, Rabbit	100 µg	108,000
574-72541	APO-25A-023-R100	Anti Mouse Survivine, Rabbit	100 µl	63,800
571-72551	APO-20A-059-C100	Anti Human HtrA2/Omi, Monoclonal Antibody	100 µg	75,400

K. T.

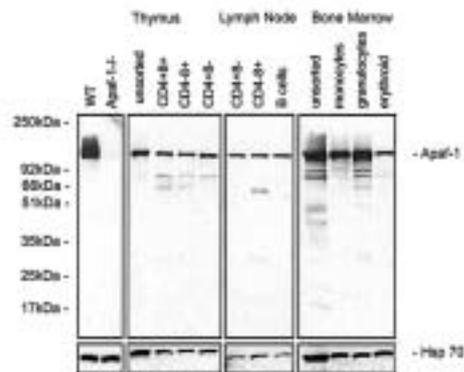
【染色写真】



Anti Human Smac / DIABLO, Monoclonal Antibodyによる
 ヒトNT2細胞の免疫蛍光染色



Anti Mouse Smac / DIABLO, Monoclonal Antibodyによる
 マウスSmac / DIABLOの免疫組織染色



Anti Mouse Apaf-1, Monoclonal Antibody(13F11)による
 各種マウス組織でのウエスタンブロッティング

ウイルス法に代わる簡易な遺伝子導入法

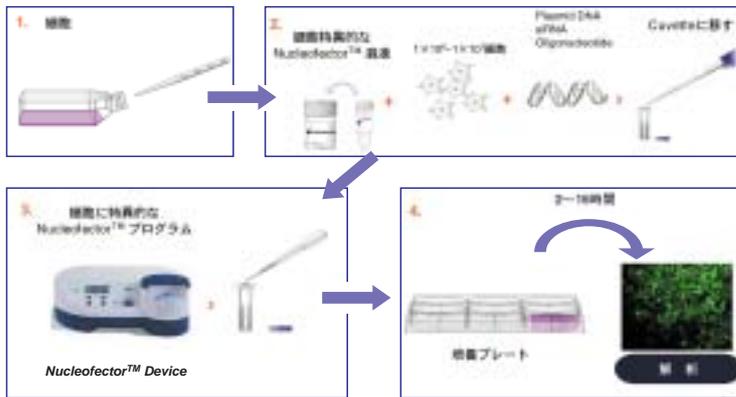


Nucleofector™ System

遺伝子導入は遺伝子機能の研究や遺伝子治療の開発等において重要な手法の一つであります。しかしながら、プライマリー細胞に遺伝子を導入するために用いる従来法(リボソーム法、ウイルスベクター法)では手間がかかり、又わずかに導入された遺伝子も十分な発現が得られない等多くの問題があります。

amax社が開発したNucleofector™ はエレクトロポレーション法を応用しNucleofector™ Deviceと細胞専用試薬を使用することによりプライマリー細胞、導入の難しい株化細胞に高い導入効率を実現しました。遺伝子を核内に直接導入するため発現時間が早く、早い時間に発現確認が可能です。また、本システムはプラスミドDNAの他にオリゴDNA、mRNA、siRNAについての遺伝子導入アプリケーションも可能です。

【操作概要】



1. 細胞を用意します。
2. 細胞に最適なNucleofector™溶液と遺伝子、細胞を混合しキュベットに移します。
3. キュベットをNucleofector™ Deviceにセットし、各細胞ごとに特化した最適プログラムを選択後、電気を流します。
4. キュベットから細胞を培養プレートに戻し培養を行います。

【特長】

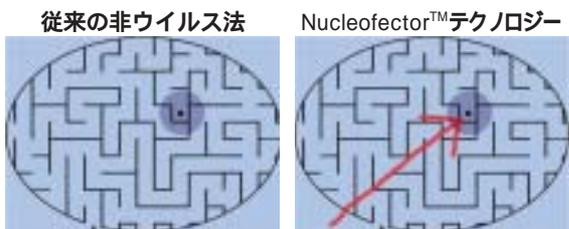
- 高い遺伝子導入効率/低い死細胞率
- 導入の際にサイトカイン等の刺激を必要としない
- ウイルス法に比べ操作が簡単
- siRNAの導入が可能
- 遺伝子導入のためのわずらわしい条件設定が不要



【キット内容】(25回用)

- ▶ Nucleofector™ Solution 2.25m/
- ▶ Supplement 0.5m/
- ▶ キュベット 25個
- ▶ ピペット 25本

【原理】



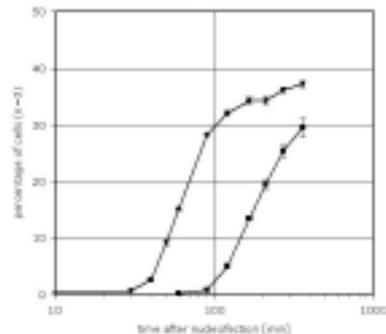
従来非ウイルス法: 核にDNAを効果的に導入するためには、細胞の増殖が必要

Nucleofector™テクノロジー: DNAを核に直接導入できるため、すぐに遺伝子が発現する

分裂細胞が盛んな細胞に適した方法
インキュベーション時間が長い(24~48時間)
従来のエレクトロポレーションでは死細胞率が高い

プライマリー細胞や株化細胞に適した方法
発現までの時間が短い(株化細胞: 2~4時間、プライマリー細胞: 4~16時間)

【CD4⁺ T cell(helper T cell)における発現タイムコース】



DNAが直接核へ導入されているので、短時間で発現している。
新たに分離された末梢血単核細胞において、
細胞質での発現(: EGFP)および
細胞表面分子での発現(: H-2K^k)

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
500-98921	AAD-1001	Nucleofector™ Device	1台	2,500,000

免疫細胞への導入

Human Dendritic Cell用キット

免疫学的治療の分野にて注目を浴びるHuman Dendritic Cell用の専用試薬をご紹介します。

非ウイルス法では、導入が不可能とされていましたが、本システムでは、簡易な操作で約40%の遺伝子導入効率を実現します。導入後も細胞機能を失わずに、免疫機能を保持します。

【遺伝子導入後のDendritic Cellの免疫機能保持】

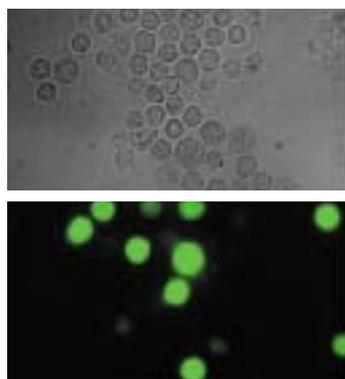


LPS(Lipopolysaccharide)を加えたものと加えていないDendritic CellのTNF-、IL-6の分泌量をELISA法にて測定した。

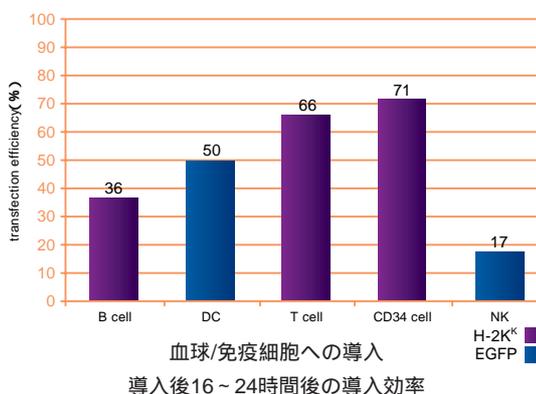
【参考文献】

Dendritic cells : Mordmüller B, Krappmann D, Esen M, Wegener E, Scheidereit C. *EMBO Rep.* 2003 Jan ; 4(1): 82-87.

【ヒトB細胞への導入例】



5 μgのpEGFPを導入。
上) 顕微鏡像
下) 蛍光顕微鏡像



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
507-98931	VPA-1001	Human B Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
504-98941	VPA-1002	Human T Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
501-98951	VPA-1003	Human CD34 Hematopoietic Progenitor Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
579-32671	VPA-1004	Human Dendritic Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
571-77051	VPA-1005	Human Natural Killer Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000

【参考文献】

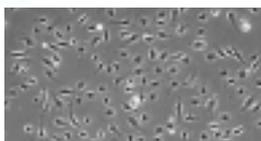
T cells : 1) Cron RQ. *Immunol Res.* 2003 ; 27(2-39) 185-202.
 2) Harriague J, Bismuth G. *Nat Immunol.* 2002 Nov ; 3(11): 1090-1096.
 3) Kunzmann S, Wohlfahrt JG, Itoh S, Asao H, Komada M, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. *FASEB J.* 2003 Feb ; 17(2): 194-202.
 4) Kunzmann S, Mantel PY, Wohlfahrt JG, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. *FASEB J.* 2003 Jun ; 17(9): 1089-95.
 5) Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. *Nat Immunol.* 2003 Jan ; 4(1): 78-86.
 6) Moriuchi M, Moriuchi H. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11 ; 278(15): 13003-7.
 7) Murphy LL, Hughes CC. *J Immunol.* 2002 Oct 1 ; 169(7): 3717-25.
 8) Nambiar MP, Fisher CU, Kumar A, Tsokos CG, Warke VG, Tsokos GC. *J Immunol.* 2003 Mar 15 ; 170(6): 2871-6.
 9) Roy J, Paquette JS, Fortin JF, Tremblay MJ. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Nov ; 46(11): 3447-55.
 10) Schmidt-Weber CB, Wohlfahrt JG, Akdis CA, Blaser K. *Eur J Immunol.* 2002 Apr ; 32(4): 1196-204.
 11) Tenbrock K, Juang YT, Tolnay M, Tsokos GC. *J Immunol.* 2003 Mar 15 ; 170(6): 2971-6.

B cells : 1) Shi GX, Harrison K, Wilson GL, Moratz C, Kehl JH. *J Immunol.* 2002 Sep 1 ; 169(5): 2507-15.
 2) Tolnay M, Vereshchagina LA, Tsokos GC. *J Immunol.* 2002 Dec 1 ; 169(11): 6236-43.

心臓血管系研究



心臓血管系細胞への導入

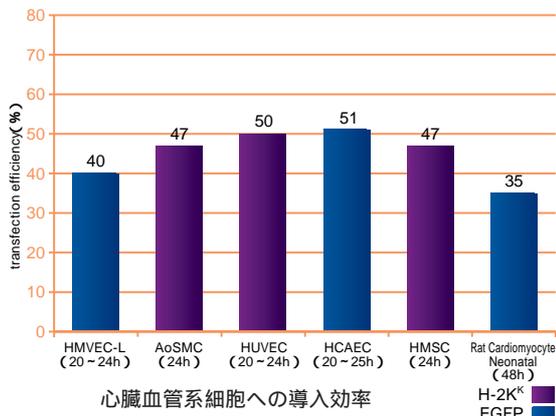


【HUVECへの導入例】

pEGFPをプログラムU-01にて導入後24時間後に観察。



上) 顕微鏡像
下) 蛍光顕微鏡像



コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
508-98961	VPB-1001	Human Coronary Atery Endothelial Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
505-98971	VPB-1002	Human Umbilical Vein Endothelial Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
573-35491	VPB-1003	Human Microvascular Endothelial Cell-Lung Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
502-98981	VPC-1001	Human Aortic Smooth Muscle Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
576-35481	VPE-1001	Human Mesenchymal Stem Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
574-77041	VPE-1002	Rat Cardiomyocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000

【参考文献】

- HUVEC : 1) Zernecke A, Erl W, Fraemohs L, Lietz M, Weber C. *FASEB J.* 2003 Jun ; 17(9) : 109.
2) Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. *J Cell Biol.* 2003 Apr 28 ; 161(2) : 429-39. 9-101.

皮膚病学/細胞工学研究



マウス胚線維芽細胞(MEF)への導入

本キットは多種に渡るMEF細胞株に対応するため、初回にスターターキットを用いて導入条件を検討します。キット中のMEF 1 およびMEF 2 Nucleofector™ Solutionを用い、下記表の2プログラム(A-23、T-20)を実行します。得られた結果より、単品のMEFキットを購入して頂きます。

Nucleofector™ Solution
MEF1, MEF2の各試薬を用いA-23、T-20を実行します。

Solution	MEF 1	MEF 2
Sample 1	A-23	-
Sample 2	T-20	-
Sample 3	-	A-23
Sample 4	-	T-20

一番効率の良かった試薬とプログラムの組み合わせを見つけます。

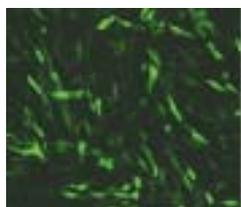
の結果をもとに、次回よりMEF1またはMEF2キットの25回用を使用します。

【キット内容】

スターターキット (10回用)

- ▶ MEF 1 Nucleofector™ Solution 0.45ml/
- ▶ MEF 2 Nucleofector™ Solution 0.45ml/
- ▶ MEF 1 Supplement 0.1ml/
- ▶ MEF 2 Supplement 0.1ml/
- ▶ 専用キュベット 10個
- ▶ 専用ピペット 10本

【導入例】

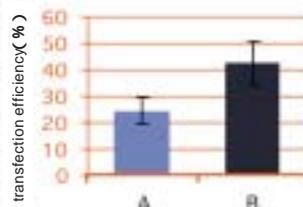


MEF (C57B6Jx129SV)へNucleofector™ Solution MEF 1、プログラムA-23にてpEGFP導入後、24時間経過時に、蛍光顕微鏡にて観察。

【参考文献】

- Mouse embryonic fibroblasts :
1) Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17 ; 278(3) : 1585-93.
2) Verrecchia F, Wagner EF, Mauviel A. *EMBO Rep.* 2002 Nov ; 3(11) : 1069-1074.

【導入効率】

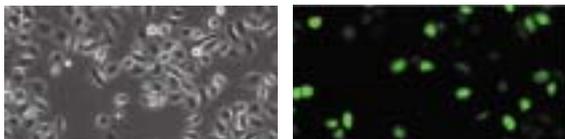


MEF細胞へプログラムA-23を使用しpEGFPを導入後、24時間経過後の導入効率
細胞生存率：60-80%

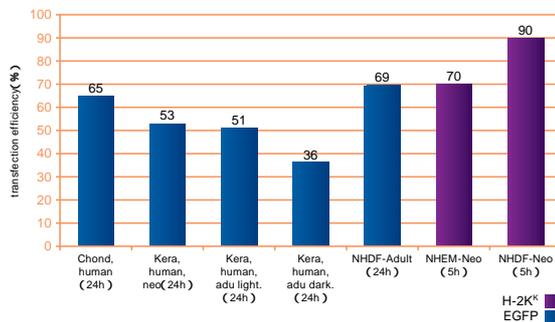
- A. MEF (C57BL/6, spontaneously immortalized)へ1.5 µgのpEGFPを導入。
継代数：20 継代
(Courtesy of Dr. H. Hermanns and Prof. P.H. Heinrich, University of Aachen, Germany.)
B. MEF (C57B6Jx129SV, SV40-transformed)へ7µgのpEGFPを導入。
継代数：4継代
(Courtesy of Prof. Saftig, University of Kiel, Germany.)

【Keratinocyte-adultへのpEGFPの導入例】

導入後24時間経過時の顕微鏡像 導入後24時間経過時の蛍光顕微鏡像



Keratinocyte Nucleofector™ Kitを用い、プログラムT-24にて2.5μgのpEGFPを導入。



皮膚系細胞への導入効率

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
509-98991	VPD-1001	Normal Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
506-99001	VPD-1002	Normal Human Epidermal Keratinocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
503-99011	VPD-1003	Normal Human Epidermal Melanocyte-Neonatal Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
577-76431	VPD-1004	Mouse Embryonic Fibroblast 1 Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
574-76441	VPD-1005	Mouse Embryonic Fibroblast 2 Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
570-76421	VPD-1006	Mouse Embryonic Fibroblast Nucleofector™ Starter Kit	10回用	35,000
573-35511	VPF-1001	Human Chondrocyte Nucleofector™ Kit	25回用	60,000
574-70721	VPH-1001	Mouse ES Cell Nucleofector™ Kit	25回用	60,000

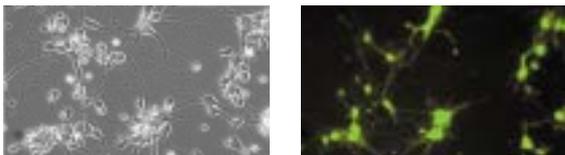
神経研究



神経幹細胞から中枢神経、グリア細胞まで幅広く導入できます

【ラット海馬状神経細胞への導入例】

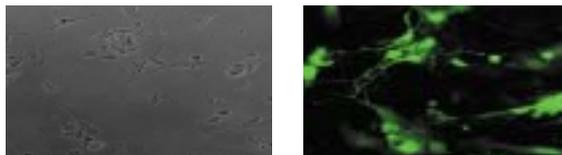
導入後48時間経過時の顕微鏡像 導入後48時間経過時の蛍光顕微鏡像



Rat Neuron Nucleofector™ Kitを用い、pEYFPをプログラムO-03により導入。

【マウス海馬状隆起神経細胞への導入例】

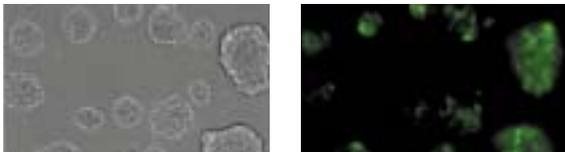
導入後48時間経過時の顕微鏡像 導入後48時間経過時の蛍光顕微鏡像



Mouse Neuron Nucleofector™ Kitを用い、3 μgのpEGFPをプログラムO-05により導入。

【マウス神経幹細胞への導入例】

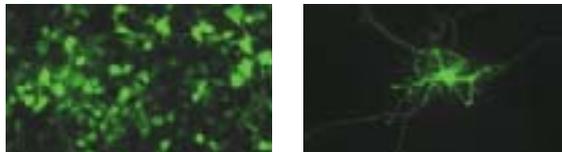
導入後48時間経過時の顕微鏡像 導入後48時間経過時の蛍光顕微鏡像



マウス胚から神経幹細胞を単離し、Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™ Kitを用いてプログラムA-33よりpEGFPを導入。

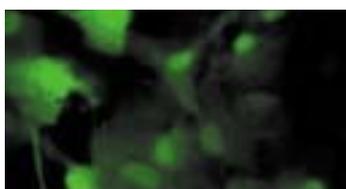
【ラット神経幹細胞への導入例】

導入後2日経過時の蛍光顕微鏡像 導入後7日経過時の蛍光顕微鏡像



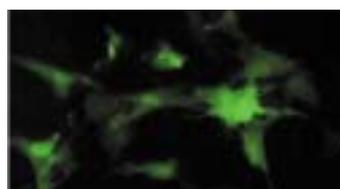
ラット胚から神経幹細胞を単離し、Rat Neural Stem Cell Nucleofector™ Kitを用いてプログラムA-31よりEGFPを導入。

【ラット アストロサイトへの導入例】



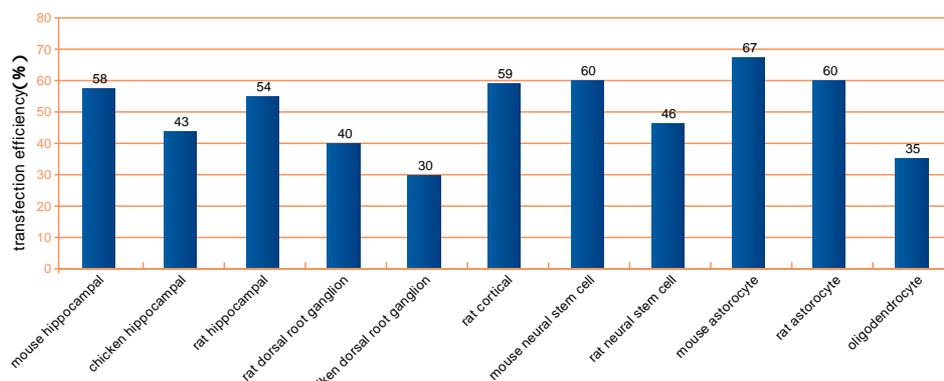
ラット胚 (E17) よりラットアストロサイトを単離後プログラムT-20にてpEGFPを導入し24時間後に蛍光顕微鏡にて観察。

【マウス アストロサイトへの導入例】



マウス胚 (E14) よりマウスアストロサイトを単離後プログラムT-20にてpEGFPを導入し2日後に蛍光顕微鏡にて観察。

【神経細胞系への導入効率】



pEGFP (EYFP) 導入から24時間後、48時間後の導入効率

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
570-35521	VPG-1001	Mouse Neuron Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
577-35531	VPG-1002	Chicken Neuron Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
570-38681	VPG-1003	Rat Neuron Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
572-72341	VPG-1004	Mouse Neural Stem Cell Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
579-72351	VPG-1005	Rat Neural Stem Cell Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
570-77021	VPG-1006	Mouse Astrocyte Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
577-77031	VPG-1007	Rat Astrocyte Nucleofactor™ Kit	25回用	60,000
578-77061	VPG-1008	Mouse Oligodendrocyte Nucleofactor™ Kit	25回用	近日発売予定
575-77071	VPG-1009	Rat Oligodendrocyte Nucleofactor™ Kit	25回用	近日発売予定

Nucleofactor™ Deviceのプログラムバージョンアップ (V2.1) のお知らせ

U937、THP-1細胞等用にプログラム (V-01 ~ V-33) を追加するため、Nucleofactor™ Deviceのプログラムのアップデートを行っております。アップデートは、お持ちの装置にチップカードを差し込み、読み込むだけと、簡単な操作で完了します。

【現在のソフトウェアバージョンの確認方法】

現在のソフトウェアのバージョン確認方法はNucleofactor™本体の電源を入れ、画面にV2-1と表示されない場合はバージョンアップを行なって下さい。V2-1と表示された場合はアップデートの必要はありません。



このバージョンアップは無償で行いますのでお持ちのDeviceのプログラムバージョンをご確認下さい。アップグレードのお済みでない方は弊社の営業担当、取り扱い代理店までお問い合わせください。

株化細胞への導入

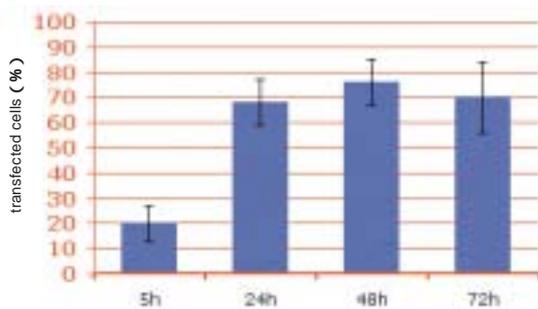
Nucleofector™では株化細胞にも高い導入効率が可能です。従来1%しか導入できなかった細胞に60%以上導入できたというデータもあります。試薬は株化細胞用試薬を3種類(R, T, V)から、お手持ちの細胞に一番最適な試薬を使用します。現在までの株化細胞への導入実績は下記の通りです。

株化細胞

293	C6	CHO-K1	COS-7	HaCaT
HeLa	HepG2	HL-60	Jurkat	K562
NIH3T3	PC-12	THP-1	U937	23132/87
32D	3T3-L1	ATDC	BAF-3	BCBL-1
b-END	BJAB	BJBC3879	BW	C2C12
CA46	CEM.NKR	CH27	Colo-201	Colo-205
daudi	DT40	DU145	EBV-transform B cell	EL-4
F36P	FDC-P	H1299	H9(AHT78)	HMC-1
HT29	h-tert BJ1	Hydra cell	Karpas299	KG1
L1.2	L-52	LCL	LNCaP	MCF-7
MDA-MB231	MDCK	MDCKII	Meg-01	MNT-1
Mouse L Cell	MT2	MT4	Namalwa	NK3.3
NK92	NKL-1	NRK52E	NS0	OCI-AML1a
Panc-1	Ramos	RAW 264.7	RBL	RPMI8226
RTB3	SAOS-2	SK-MEL-28	SP2/0	SP9
SW13	SW1353	SW48	SW480	T1165
T2	tet-E	TF-1	TG40	TK-1
U87MG	UT-7/Epo	UT-7/GM	UT-7/Original	WEHI
y189/111	YT	Z70	ZYGF	

赤字は専用プロトコール有り

【Jurkat細胞での一過性の発現タイムコース】



Jurkat細胞 (ACC 282, DSMZ) にマウスMHC class molecule H-2K^bをコードしたプラスミドを導入し、生細胞中の発現率をフローサイトメリーにて分析をおこなった。

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
500-99021	VCA-1001	Nucleofector™ Kit R for Cell Line (e.g. for HeLa, NIH 3T3, UT7/Epo)	25回用	60,000
507-99031	VCA-1002	Nucleofector™ Kit T for Cell Line (e.g. for CHO)	25回用	60,000
504-99041	VCA-1003	Nucleofector™ Kit V for Cell Line (e.g. for 293, COS-7, K562, PC12, Jurkat, HepG2, HL60, HaCaT)	25回用	60,000

導入実績のない細胞へ導入をお考えの方に

Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit

Nucleofector™は最適化された条件で遺伝子導入を行なうシステムですが、本キットは導入条件が最適化されていない細胞に対して最適導入条件を検討するキットです。検討方法はプロトコールに指示された下記プログラムを用いて遺伝子導入を行なうことにより最適試薬と最適プログラムを決定します。キット内容はCell Line Nucleofector Kit R, T, Vの三種類の試薬から成り、50回用になっています。

Solution	R	T	V
program 1	A-23	A-23	A-23
program 2	A-27	A-27	A-27
program 3	T-20	T-20	T-20
program 4	T-27	T-27	T-27
program 5	T-16	T-16	T-16
program 6	T-01	T-01	T-01
program 7	O-16	O-16	O-16
program 8	O-17	O-17	O-17

各試薬について上記の8つのプログラム(8×3=24通り)で遺伝子導入を行ないます。

ステップ1



死細胞が少なく、高導入効率である試薬、プログラムを見つけます。

ステップ2



見つけたプログラムを基にさらに有効なプログラム条件の検討も可能です。弊社にお問い合わせ下さい。

【Cell Line Optimization Kitの使用例】

MLO-Y4-A2細胞の導入条件の最適化(北海道医療大学歯学部 口腔生化学講座より提供データ)

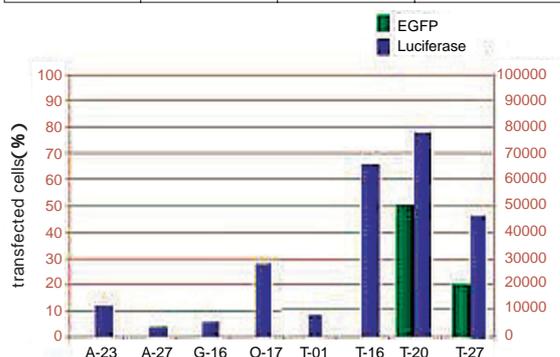
MLO-Y4-A2細胞へEGFPとLuciferase遺伝子プラスミドをco-transfectionし導入効率の検討を行った。

従来法での導入効率は非リボソーム系脂質の導入試薬により30%程度であった。

ステップ1結果

Vキット

導入遺伝子	EGFP	Luciferase	生存率 (%)
プログラム	導入効率 (%)	導入効率	
A-23	0	10855	50
A-27	0	2704	50
G-16	0	4724	50
O-17	0	28024	50
T-01	0	8655	50
T-16	0	65310	50
T-20	50	78570	50
T-27	20	48358	50



各試薬とプログラムにて導入を行った所、Vキットでの導入効率が良くプログラムT-20にて高い導入効率を示した。

(EGFP発現は蛍光顕微鏡により目視にて測定)

遺伝子量: 2 µg (EGFP) 2 µg (Luciferase)

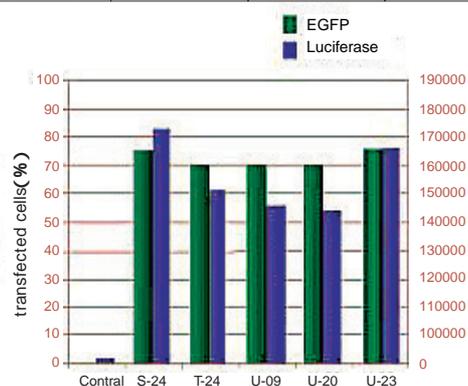
Luciferase分析時間: 30秒

細胞生存率: 50%

ステップ2結果

Vキット

導入遺伝子	EGFP	Luciferase	生存率 (%)
プログラム	導入効率 (%)	導入効率	
S-24	75	173793	80
T-24	70	151537	80
U-09	70	146255	80
U-20	70	145398	80
U-23	75	166057	80
contral (none)	0	138	100



ステップ1のデータをamasa社に送ると導入データを基にS-24, T-24, U-09, U-20, U-23のプログラムの検討が提案された。

Vキットにて提案されたプログラムにて導入を行うとステップ1では得られなかった高導入効率(75%)が細胞を死滅させることなく得られた。

(EGFP発現は蛍光顕微鏡により目視にて測定)

細胞生存率: 80%

コードNo.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
573-26341	VCO-1001	Cell Line Optimization Nucleofector™ Kit	50回用	140,000

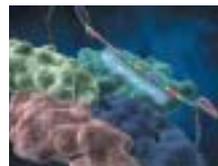
Nucleofector™を用いた siRNA導入アプリケーション

siRNAは特異的な遺伝子発現抑制作用を持つため、非常に注目を集めています。

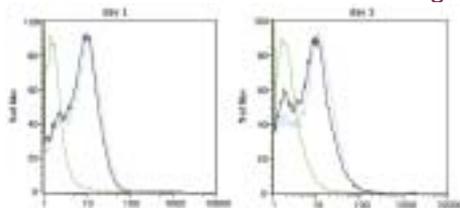
この効果を高めるには細胞への導入効率が大きなポイントになってきますが、Nucleofector™は操作が簡単であり、しかも高導入効率が得られるため、siRNAの導入法として最適です。また、多種の細胞に導入できるというメリットがあります。細胞ごとに最適化した試薬とプログラムを用いてPlasmidを導入する条件で導入できます。

【特長】

siRNAのタイプに関わらず細胞毎の同一試薬・プログラムにて導入可能
RNaseフリーを保証
操作が簡単



【Nucleofector™を用いたJurkat TAg細胞への合成siRNAの導入】

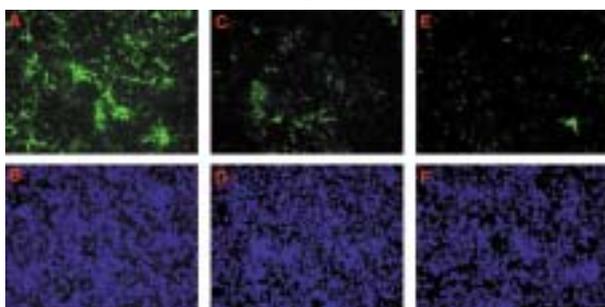


グリーン...GFP-siRNAを導入した時の蛍光強度
ダーク黒...GFPの蛍光強度
ライトブルー...コントロールsiRNA(GFPの発現を阻害しない)を導入した時の蛍光強度

- 導入条件：Nucleofector™ Solution (100 μl)中に終濃度0.5~1 μMのsiRNAを加えた
- 使用キット：Nucleofector™ Kit V for Cell Line
- プログラム：C-16

GFPを安定的に発現しているJurkat TAg細胞へGFP発現抑制siRNAの導入後、1日目と3日目の蛍光強度を測定。3日目でも抑制効果が維持していた。

【マウス皮質へのsiRNAの導入例】



Mouse cortical neurons (E17) にEGFP plasmid, EGFP発現阻害のsiRNAをco-transfectionした。導入後4日経過時の蛍光顕微鏡像にて観察。

- A)EGFP 3 μg使用時のGFPの発現
- B)EGFP 3 μg使用時のDAPI染色
- C)EGFP 3 μg, siRNA 1.5 μg使用時のGFPの発現
- D)EGFP 3 μg, siRNA 1.5 μg使用時DAPI染色
- E)EGFP 3 μg, siRNA 3 μg使用時のGFPの発現
- F)EGFP 3 μg, siRNA 3 μg DAPI染色

【参考文献】

- 1) Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ. *Nature*. 2002 Sep 26; 419(6905): 395-9.
- 2) Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. *J Biol Chem*. 2003 Jun 2

RNAi用陽性コントロール用siRNA

(以下の製品は、株式会社ニッポンジーン製です。)

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
314-05911	Control siRNA duplex, Jellyfish GFP (EGFP)	5nmol	20,000
319-05841	Control siRNA duplex, Human β -actin	5nmol	20,000
316-05851	Control siRNA duplex, Human NuMA	5nmol	20,000
313-05861	Control siRNA duplex, Human cdk1	5nmol	20,000
310-05871	Control siRNA duplex, Human Eg-5	5nmol	20,000
317-05881	Control siRNA duplex, Human Lamin A/C	5nmol	20,000
314-05891	Control siRNA duplex, Human Lamin B1	5nmol	20,000
317-05901	Control siRNA duplex, Human Vimentin	5nmol	20,000
311-05921	Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL2(ピッカジーンベクターに相当)	5nmol	20,000
318-05931	Control siRNA duplex, Firefly Luciferase GL3(ピッカジーンベクター2に相当)	5nmol	20,000

*カスタム合成も行っております。お問い合わせ下さい。

I.K.

本文に記載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「家庭用品」などとして使用できません。希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

和光純薬工業株式会社

本社 ☎540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 ☎06-6203-3741(代表)
支店 ☎103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号 ☎03-3270-8571(代表)
●九州営業所 ☎(092)622-1005(代) ●中国営業所 ☎(082)285-6381(代)
●東海営業所 ☎(052)772-0788(代) ●横浜営業所 ☎(045)476-2061(代)
●北関東営業所 ☎(048)641-1271(代) ●筑波営業所 ☎(0298)68-2278(代)
●東北営業所 ☎(022)222-3072(代) ●北海道営業所 ☎(011)271-0285(代)
フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806

機器の問合わせ先 06-6203-2759 / 03-3270-8124 03.216.Y学_{01F}

ご意見・お問合せ E-mail: biowin@wako-chem.co.jp

<http://www.wako-chem.co.jp/>