

hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液

取扱説明書

一、製品概要

ヒト多能性幹細胞（human pluripotent stem cell, hPSC）は、ヒト胚性幹細胞（human embryonic stem cell, hESC）とヒト人工多能性幹細胞（human induced pluripotent stem cell, hiPSC）を含み、自己複製能と無限増殖能を持ち、ほぼすべての体細胞種へ分化できる多能性幹細胞であり、幹細胞研究における主な対象と焦点となっています。hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液は、未分化状態で培養したヒト多能性幹細胞向けに開発されたエレクトロポレーション用溶液です。この溶液は、安定した高トランスフェクション効率を実現し、トランスフェクション後の細胞生存率が高く、細胞への毒性がなく、後続実験に影響を与えません。ヒト多能性幹細胞のトランスフェクションに最適なソリューションです。

二、製品情報

表 1： hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液製品詳細

製品情報	品番	規格
hPSC Nucleofection Buffer	RP01005	2.5 ml (25 rxn)

三、保存条件

- 保存温度：4℃。
- 有効期間：6ヶ月。

四、設備と材料

表 2：推奨設備&材料

ヒト多能性幹細胞のエレクトロポレーション-推奨設備と材料
エレクトロポレーター Amaxa Nucleofector (II, Iibまたは他の型番)
室温に平衡化した hPSC Nucleofection Buffer
エレクトロポレーターに対応するカクテル（キュベット）とプラスチックピペット
エレクトロポレーションに必要なプラスミド（濃度0.5-1 µg/µl、A260/A280比は約1.80）
2×10 ⁶ -4×10 ⁶ のヒト多能性幹細胞/反応
ncEpicまたはncTarget多能性幹細胞培地（またはmTeSR, E8などのhPSC培地）とMatrigelまたはVitronectinでコーティングしたディッシュ
ヒト多能性幹細胞の消化に必要なSolase単細胞消化液/Accutase消化液

五、エレクトロポレーション前の準備

1. hPSCの培養（ncEpicまたはncTarget多能性幹細胞培地/Matrigel培養システムを例とする）
 - hPSC細胞は1:10～1:20の比率で通常の継代を行い、4日ごとに継代し、毎日新鮮な培地に交換します。コンフルエンス80～90%のhPSCをエレクトロポレーションに使用することを推奨します。

2. hPSCの消化

TIPS：エレクトロポレーション前にhPSCを単細胞懸濁液に消化する必要があります。細胞塊が残ると、エレクトロポレーション効率や細胞生存率が低下します。以下の手順で単細胞懸濁液が得られない場合は、エレクトロポレーション前に予備実験を行い、Solaseの消化時間を最適化してください。

- 2.1. フィーダーフリー培養システム（例：Matrigel）で培養したhPSCの場合は、室温に予熱したSolaseを使用し、37℃インキュベーターで5～10分間消化し、細胞を十分に分散させます。室温に予熱したDMEM/F12培地を加えて消化を停止します。5 mLピペットで1～2回緩やかにピペティングすることで、単細胞懸濁液を得ます。
- 2.2. フィーダー細胞培養システムで培養したhPSCの場合は、エレクトロポレーション実験の前に、一度継代を行い、Matrigelの上に播種します。コンフルエンス80～90%に達したら、2.1の方法に従って消化を行います。

六、hPSCのエレクトロポレーション

表 3：エレクトロポレーションシステム

6ウェルプレートの1ウェルを例として、各エレクトロポレーション反応システムは以下を含む
2×10 ⁶ - 4×10 ⁶ ヒト多能性幹細胞
1-5 µg のプラスミドDNA
100 µL hPSC Nucleofection Buffer

1. Amaxa II エレクトロポレーターを準備し、プログラム「B016」に設定します。
2. 必要量の Solase（6 ウェルプレートは1 mL/ウェル）と DMEM/F12 培地（3 mL/ウェル）を室温に予熱します。
3. Matrigelでコーティングしたプレートの各ウェルに、2 mLの培地+ ROCK 阻害剤を添加し、37℃ インキュベーターで予平衡化させます。
4. 滅菌済み 1.5 mL 遠心管に 1-5 µg のプラスミド DNA を添加します（総量 10 µL を超えないようにする）。
5. プラスミドを添加した1.5 mL遠心管に、hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液 100 µL を加え、均一に混和します。遠心機で一瞬遠心し、混和液を管の底に集めます。
6. インキュベーターから hPSC 培養プレートを取り出し、培地を吸引除去後、DPBS 2 mL/ウェルで 1 回洗浄します。
7. 予熱した Solaseを1 mL/ウェル加え、37℃ インキュベーターで 培養プレートを5-10 分間消化します。

8. 予熱した DMEM/F12 培地を2 mL/ウェルに加え、1-2 回ピペッティングすることで、単細胞懸濁液を得ます。
9. 全細胞を 15 mL 遠心管に集め、120 gで4 分間遠心します。
10. 15 mL 遠心管の上清を吸引除去し、管の底部を軽く叩いて細胞ペレットを緩ませます。予熱した DMEM/F12 培地（1 mL/ウェル程度）で 5-6 回ピペッティングし、細胞を完全に分散させます。
11. 細胞懸濁液 10 μ L を採取してカウントします。2-4 $\times 10^6$ の細胞/管で細胞懸濁液を新しい 1.5 mL 遠心管に分注します。
12. 瞬時遠心機で 8 秒間遠心して細胞を回収し、上清を慎重に吸引除去後、管底部を軽く叩いて細胞ペレットを緩ませます。
13. ステップ 3 で平衡化した培養プレートを用意します。
TIPS : 以下の全ての手順は、連続的かつ穏やかな操作で、可能な限り短時間に完了させる必要があります。
14. 各管に、ステップ 5 で調製した「hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液&プラスミド混和液」を加え、管底部を軽く数回叩いて細胞を懸濁させます。（注意：マイクロピペットを用いたピペッティングは避けてください）
15. 細胞&プラスミド&エレクトロポレーション液の混和液をエレクトロポレーションキュベットに移し（ピペッティングは穏やかに行う）、卓上で軽く 2 回叩いて気泡を除去し、エレクトロポレーターのスロットに挿入後、プログラム B016 を実行します。
16. キュベットを取り出し、ステップ 13 の6ウェルプレートから培地 約500 μ L を採取し、キュベット内壁に沿ってゆっくり添加します。卓上で軽く 2 回叩いて混和した後、ピペットで慎重に混和液を吸引し、プレートの対応するウェルに滴下します。プレートを軽く揺らして細胞を均一に分散させます。
17. 培養プレートを37℃ インキュベーター内に移して培養を行います。エレクトロポレーション後 16-24 時間後に遺伝子発現を検出可能です。

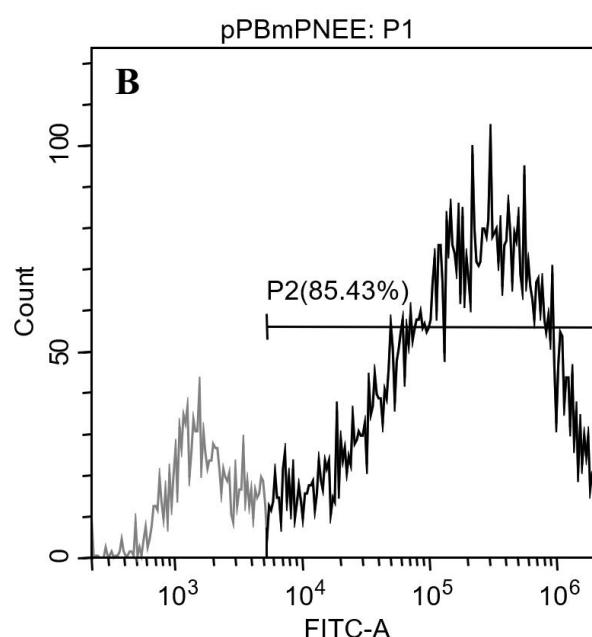
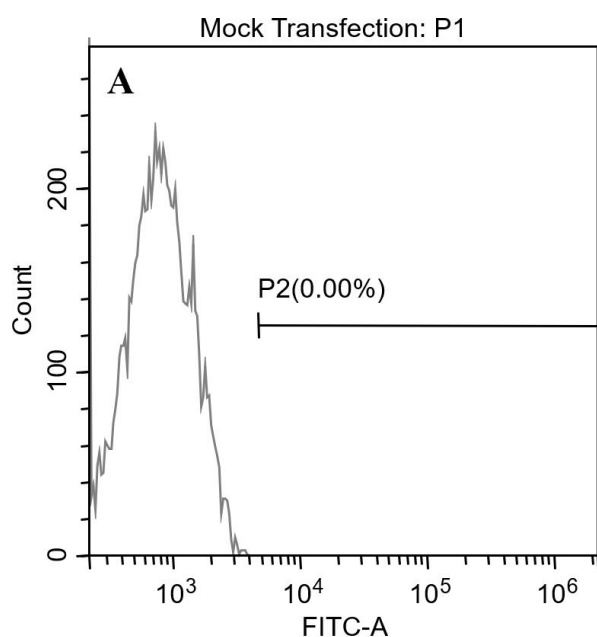


図1 : hiPSC/hESC 高効率エレクトロポレーション液を用いた hiPSC トランスフェクションの例 :
EGFP を発現する pPBmPNEE プラスミド 2 μ g (約 6.5 kb) を hiPSC にエレクトロポレーションし、トランスフェクション後 24 時間後にフローサイトメトリーで EGFP 陽性細胞を測定。
A : エレクトロポレーション時にプラスミドを添加しなかった陰性対照 B : エレクトロポレーション時に pPBmPNEE プラスミドを添加した場合、トランスフェクション効率は 85.43% を達成可能。