

● In Vivo ● In Ovo ● In Utero ● Ex Vivo

## 国内売上No.1のIn Vivoエレクトロポレーターです！！

- 成体マウス・ラット組織(筋肉・肝臓・皮膚・精巢・卵巣・眼球・膀胱・腎臓等)
- 成体・新生児マウス・ラット脳
- マウス・ラットエンブリオ(子宮内胎児)
- 新生児マウスの網膜・角膜
- チックエンブリオ
- 腫瘍(ガン組織)
- 単一細胞(付着細胞)
- 単一細胞(植物プロトプラスト細胞)



### ●安全機能

実験を安全に行う為に高電流出力を制限するリミッター機能内蔵(電極を手で持ちながら行うIn Vivoエレクトロポレーション実験で、実験者の感電を防止する為)。

### ●実行電流値・実行電圧値測定機能

パルス出力後の実行電流値・実行電圧値を自動測定します。エレクトロポレーションの実験が成功するか否かの鍵を握る実行電流値を知ることは極めて重要です。

### ●In Vivoエレクトロポレーター

CUY21SCは、In Vivo-In Ovo-In Utero-Ex Vivo等のエレクトロポレーションをされている研究者の方の様々な要望を取り入れて専用で製作されたIn Vivoエレクトロポレーターです。また、微小な電流値が必要な成体・新生児マウス・ラット脳へのエレクトロポレーションに最適です。

### ●正確な低電圧コントロール

単一細胞・チックエンブリオ・脳スライス等のエレクトロポレーションの条件設定として使用される低電圧(特に40V以下)が、正確なスクエア波波形で出力されます。0.1V~99.9Vまで設定でき、0.1V刻みの電圧設定が可能です。

### ●抵抗値測定機能内蔵

電極間(組織・バッファー)のパルス出力前後の抵抗値を最大30kΩまで測定できます。エレクトロポレーションの条件設定をする上で、設定電圧と共に重要な実行電流値を予測できます(電圧を抵抗値で割算する一オームの法則)。電極が組織・バッファーにプラス極・マイナス極ともに接触し通電しているかのチェックができます。

DC波形	スクエア	リミッター機能	安全の為、高電流出力を制限 リミット:1.60A
抵抗測定値	30kΩまで(オートレンジ切替)	実行値測定	電圧値:0.1~99.9V
設定電圧	0.1~99.9V (0.1V刻み)		電流値:1~999mA(1mA刻み)
設定パルス時間	0.05~99.9ms (0.01ms刻み)		電流値:1.00~1.60A (0.01A刻み)
設定パルス間隔	0.1~999ms (0.1ms刻み)		回数1~99回
設定パルス回数	1~99回	電源	100V, 50/60Hz
メモリー機能	99条件をメモリー可能	寸法・重量	375W×360D×170Hmm, 12.3kg
	項目(電圧・Pon・Poff・回数)		

### ●エレクトロポレーション法による子宮内胎仔脳への遺伝子導入

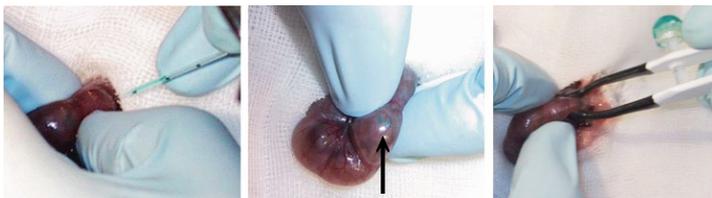


図1. 子宮内マウス胎仔に対するエレクトロポレーション法の実験手順

- ① プラスミド溶液を注入する。
- ② 注入後の胎仔、両側の側脳室がFast Greenで満たされている(→)。
- ③ 電気パルスを与える。

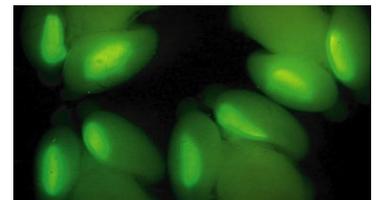
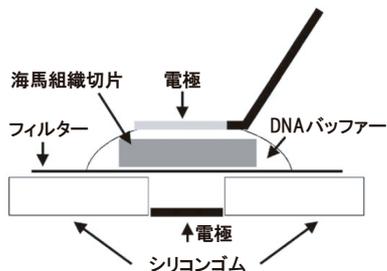


図2. GFP発現ベクターを導入した例

胎生14.5日胚にCAG-EGFPプラスミドを両半球の側脳室へ注入しエレクトロポレーション法を行った。これを胎生17.5日で固定して脳を取り出し蛍光の実体顕微鏡で観察した。

## ● エレクトロポレーション法による海馬組織切片への遺伝子導入



### ■ エレクトロポレーションのセットアップ略図

マウス胎児の海馬切片をミリポアフィルター上に置きDNAバッファー5  $\mu$ l (DNA濃度: 1  $\mu$ g/ $\mu$ l)を海馬切片の上から滴下します。ニードル白金電極(CUY611P3-1)をDNAバッファー表面に接触させます。エレクトロポレーション後、海馬切片を冷たいHBSS溶液の入ったシャーレに戻します。

### ■ エレクトロポレーション法による海馬ニューロンの蛍光タンパク質発現

図(a~c)、エレクトロポレーション後3日目の器官培養した海馬組織切片のeGFP発現(使用したプロモーター a: CAG, b: T $\alpha$ 1, c:  $\beta$ -actin)

図(d, e)、成長した海馬ニューロンは、エレクトロポレーション後培養され14日間に渡りeGFP発現( $\beta$ -actin)が維持されました。

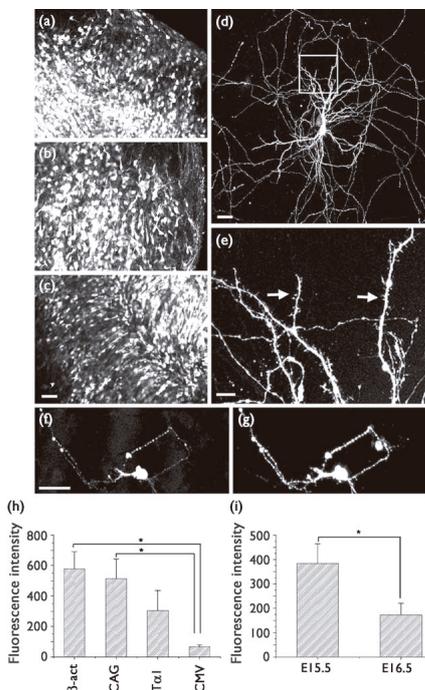
図(d)の四角領域を拡大したものが図(e)で、樹状突起の矢印部分に樹状突起スパインが見られます。

図(f, g)、T $\alpha$ 1X4-eGFPとT $\alpha$ 1X4-mRFP1を1対1の割合で混合して、エレクトロポレーション後7日目の海馬ニューロン。単一細胞の中で、eGFP蛍光(f)とmRFP1蛍光(g)の両方を観察することができます。

図(h)、4つの異なるプロモーター配列( $\beta$ -actin, CAG, T $\alpha$ 1, CMV)を有するeGFP発現プラスミドにおけるエレクトロポレーション後の海馬組織切片の蛍光強度の比較。組織切片は4日間培養後に固定され、共焦点顕微鏡を使用し蛍光強度を測定しました。(単位領域ごとに)

図(i)、2つの異なる発育ステージ(E15.5, E16.5)におけるエレクトロポレーション後の海馬組織切片の蛍光強度の比較。組織切片は4日間培養後に固定され、共焦点顕微鏡を使用し蛍光強度を測定しました。

図(a~d, f, g)スケールバー: 50  $\mu$ m, 図(e)スケールバー: 10  $\mu$ m



東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 細胞生物学 岡部繁男先生 提供 ※Neuroreport, Volume 15, Issue 6, Pages 971-975, 29 April 2004 参考

## ● エレクトロポレーション法による筋肉への遺伝子導入

### ■ パルス発生装置ならびに電極

電気パルスは、パルス発生装置 CUY21: ネットパジーン(株)を用いて発生させた。電極は電極幅が3mmあるいは5mmに固定された直径0.4mm (27G相当)の平行な2本のステンレス針からなる針型電極を用いた。これもネットパジーン(株)から入手可能である。

### ■ プロトコール

- マウスに0.01ml/gの割合で、6mg/mlのペントバルビタールナトリウム液を腹腔内投与し、麻酔する
  - 生理食塩水に溶解した発現プラスミド50  $\mu$ g (濃度1.5  $\mu$ g/ml)をインスリンシリンジ(27ゲージ針)に移す
  - このDNAをマウスの下腿部筋肉(前脛骨筋)に筋注する
  - その後直ちに、DNA筋注部位を挟むように、5mm間隔の一对の針電極(27ゲージ)を筋肉内に挿入し、50msの電気パルスを1パルス/秒の割合で3パルス、さらに逆方向に3パルス与える
  - プラスミド発現の範囲を調べるため、pCAGGS-lacZを導入したマウスについて、導入5日後の組織切片をX-galで染色する
- 注)マウスの前脛骨筋は小さいので、注射できる容量は50  $\mu$ lまでである



### ■ X-gal染色

発現の範囲を調べるために、 $\beta$ ガラクトシダーゼ発現プラスミド pCAGGS-lacZを同様の方法で筋肉に導入した。筋注の2日後に、前脛骨筋を摘出し、ドライアイスアセトンでOCTコンパウンドに包埋した後、クリオスタットで15  $\mu$ mの切片を作製し、APS\*でコートしたスライドガラスにはりつけた。これを1.5%のグルタルアルデヒドで室温、10分固定した後、PBSで3回洗浄した。そして、1mMのX-galを37 $^{\circ}$ C、3時間反応させた後に再び洗浄し、エオジンで対比染色を行った。その結果、多くの筋線維で発現していることが示された。エレクトロポレーションなしでは、ほとんど染色される細胞は認められなかった。

\*3-amino-propyltriethoxysilane

大阪大学大学院医学系研究科 幹細胞制御分野 宮崎純一先生 提供 ※nature biotechnology, Volume 16, Number 9, Pages 867-870, September 1998 参考