Gene Pulser MXcell™
エレクトロポレーションシステム

取扱説明書

165-2670JA

ご使用の前に

本製品を正しく安全にお使いいただくために、ご使用の前に必ずこの取扱説明書を十分にお読みください。
お読みになったあとは、いつでも見られるところに必ず保管してください。

BIO-RAD

Copyright ©2007 Bio-Rad Laboratories, Inc.
*Bio-Rad Laboratories, Inc.*の書面による許可がない場合には、印刷または電子媒体のいかなる形式であっても複製を禁止します。

Gene Pulser MXcell^{TM} は、*Bio-Rad Laboratories, Inc.*に帰属する登録商標です。

その他のブランドまたは製品名は、それぞれの所有者の登録商標です。

安全性および規制の遵守

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムは、安全に作動するよう設計されています。本システムの安全な使用と規制要件について理解していただくために、以下のセクションをお読みください。

安全性に関する一般的な情報

この *Bio-Rad* 製機器は *EN61010* の安全性要件と *EN61326* の *EMC* 要件（*Class A*）を満たすように設計されており、これらの要件に適合することが証明されているほか、実験装置を利用する場合の電磁放射に関する「*Class A*」基準を満たしています。本機器の用途は、実験室での利用に限定されます。高感度機器の近傍や同一回線に設置した場合、本製品からの放射が一部の高感度機器に障害を与える可能性があります。このような可能性があることをご承知いただいた上で、障害を回避するための適切な措置を講じていただく必要があります。

外箱に明らかな破損が認められる場合や電子表示装置が取扱説明書の記載内容どおりに機能しない場合には、*Gene Pulser MXcell* システムの部品を使用しないでください。本機器は必ず、備え付けのケーブルやプレートチャンバー（ただし、これらに限定されるわけではありません）などの付属部品（または、その正規追加部品や取り替え部品）とともに使用することになっています。*Gene Pulser MXcell* システムとその関連部品の作動温度範囲は *18*～*35*℃です。

本機器の内部にユーザーが点検修理できる部品はありません。ケースカバーを開けようとしたり、安全インターロック装置を作動させないようにすることはおやめください。いかなる場合にも、本機器に改造や変更を加えないでください。本機器を改造すると、以下の結果を招くことになります：

- 製造業者の保証が無効になります。
- *IEC 1010* の安全性保証が無効になります。
- 安全を脅かす危険が生じることがあります。

Bio-Rad は、意図された目的以外の用途による本機器の使用や *Bio-Rad* または正規代理店以外による本機器の改造によって生じる損傷や損害に対して、一切責任を負いません。

電気に関する危険要因

Gene Pulser MXcell システムは最大 *500 V* の電圧を発生させるため、非常に高い電流が流れる可能性があります。最大電圧にまで充電すると、本機器には約 *210 J* が蓄積されます。この水準のエネルギーレベルに対して、ある程度配慮する必要があります。システムの安全機能によって、操作者が高電圧やサンプルチャンバー内側に埋め込まれた電極接点に接近しないように保護されています。これらのメカニカルインターロック装置を作動させないようにすることは、絶対におやめください。

右下に空白が表示されている場合は常に、*PULSE* ボタンが作動している状態にあります。*PULSE* ボタンが押し下げられており、本機器の前面にある液晶ディスプレイに「*pulse being delivered*（パルス供給）」と表示されている場合には、常に高電圧がかかっています。*Gene Pulser MXcell* プレートチャンバーには安全インターロック装置が内蔵されているため、プレートチャンバーの蓋が開いていても、エレクトロポレーションプレートにパルスが供給されることはありません。コンデンサが一部充電されているが始動していない場合（たとえば、パルスが供給される前に充電サイクルが遮断された場合など）、内部コンデンサに多少の電荷が残留している可能性があります。この電荷は、*1*～*2* 分間で消滅します。ただし、本システムには安全機能があるため、ユーザーが充電された電気部品と接触することはありません。

機械に関する危険要因

Gene Pulser MXcell システムには特許を取得したアーク防止回路が内蔵されており、サンプルに高電圧が供給された場合に、キュベットにアーク放電が生じるのを劇的に抑えることができます。本機器には、アークの開始を感知し、*2* マイクロ秒以内にサンプルからの電流の方向を変える回路が組み込まれているため、プレートチャンバーの機械的、視覚的および聴覚的現象を防止ないし大幅に減少させることができます。アークが発生した場合には、これらのわずかな放電を封じ込めるのにサンプルチャンバーが有効です。ご希望であれば、本機器の使用にあたり追加防護策として保護メガネを着用していただくこともできます。

その他の安全上の注意事項

本機器に液体をこぼさないようにしてください。*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムの外面を拭く場合には、水またはアルコールで湿らせたペーパータオルか布のみをご使用ください。

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムに付属の *Bio-Rad* ケーブルのみをご使用ください。

Gene Pulser MXcell プレートチャンバーは、必ず組み立てられた状態で使用してください。プレートチャンバーの防護機能を作動させないようにしたり、分解された状態で使用することはおやめください。

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムをご使用になる前に、取扱説明書をお読みください。

> **警告！**
> *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムは高周波エネルギーを発生させて使用し、これを放射します。本取扱説明書に記載されている手順にしたがってご利用いただけない場合には、無線通信に混信や妨害を与える可能性があります。*Gene Pulser MXcell* を検査した結果、商業環境で操作する場合にそのような混信や妨害に対する妥当な防護措置を備えた *Class A* コンピュータ処理装置の規制値を遵守していることが確認されています（*FCC* 規則パート *15* サブパート *J* に準拠）。住宅地で本機器を操作すると、混信や妨害を引き起こす可能性があります。このような場合には、混信や妨害を是正する必要があるため、ユーザーの自己負担で何らかの措置を講じていただかなくてはなりません。

操作条件

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムを安全に操作していただくため、環境条件を以下の範囲内に維持してください：

- 操作温度 *18*〜*35*℃、最大湿度 *90*%。
- 保管温度*-40*〜*+65*℃で保管する。
- 電源電圧 *90*〜*132 VRMS* および *198*〜*264 VRMS, 47*〜*63Hz*；自動設定
- 最大入力電力 *600 VA*

保証

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムには、お買い上げの日から *1* 年間、材料および製造上の欠陥に対する保証がついています。この保証期間中に本機器または付属品に何らかの欠陥が生じた場合には、バイオ・ラッド ラボラトリーズの判断に基づいて欠陥部品を無償で修理交換いたします。この保証はヒューズには適用されず、特に以下の事項には適用されません：

1. 不適切な操作によって生じた欠陥。
2. バイオ・ラッド ラボラトリーズ以外の者が修理や改造を行った場合。
3. 別の部品を代用したために生じた破損。
4. バイオ・ラッド ラボラトリーズ以外の者から提供された備品やスペア部品を使用した場合。
5. 事故や誤用によって生じた破損。
6. 災害による破損。
7. 不適切な溶媒やサンプルによって生じた腐食。

修理サービスに関するお問い合わせやご要望があれば、バイオ・ラッド ラボラトリーズにご連絡いただき、お手元にある機器のモデルとシリアル番号をお伝えください。

重要： *Bio-Rad* 製の本機器は、*EN61010**および *EMC* 要件 *EN61326*（*Class A*）という安全性規格を満たすように設計されており、これらの規格に適合することが証明されています。認定製品は、取扱説明書に従って操作すれば安全にお使いいただけます。いかなる場合にも、本機器に改造や変更を加えないでください。本機器を改造すると、以下の結果を招くことになります：

- 製造業者の保証が無効になります。
- *EN61010* の安全性保証が無効になります。
- 安全を脅かす危険が生じることがあります。

Bio-Rad は、意図された目的以外の用途による本機器の使用やバイオ・ラッド ラボラトリーズ以外による本機器の改造によって生じる損傷や損害に対して、一切責任を負いません。

**EN61010* とは、実験機器に対して国際的に用いられている電気安全規格です。

重要事項

FCC(US)への適合

FCC（米国連邦通信委員会）は製品を使用するユーザーが次の注意事項を守るように規定しています。
本装置はFCC規制のPart15に従った試験を行いClassAのデジタル機器の規格に適合していることが確認されています。この規格は装置を商業エリアで使用する際に障害の原因となる電磁は妨害に対して十分に保護が出来る規格に設定されています。この装置は無線周波エネルギーを発生、放射します。取扱説明書に従わないで設置・使用する場合には、無線通信を妨害する可能性があります。また、この装置の居住地域での使用も同様に無線通信を妨害する可能性が高く、この場合ユーザーは自身の費用でその対策を講じることを要求されます。

警告 Bio-Rad が認めていない変更や改修を行った場合、装置が FCC の ClassA の規制に適合しなくなり、装置を使用するユーザーの権限が無効になる危険性がありますのでご注意ください。

その他:本装置はFCC規制の“免除機器”に該当していますが､Bio-Radの自発的な試験によりFCCのClassAに適合することを確認しています。

EMC（EU）への適合

本装置はヨーロピアンユニオンにより規定されたEMC規格に適合することが確認されています。

CSA(Canada)への適合

カナダの電波妨害対象装置の規制ClassAに適合しています。

詳しくは英文マニュアルをご参照ください。

お客様登録カード

製品購入時に添付されている「お客様登録カード」にご記入頂き、当社まで発送いただきますと、製品ごとのお客様として登録されます。製品に関連する情報など確実にお届けさせていただきますので、是非ご登録下さい。

目　次

1　はじめに 1

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムの概要 *1*

Bio-Rad のリソースとリファレンス *2*

本取扱説明書で使用されている記述表現 *3*

2　さあ始めましょう 5

システムの開封とセットアップ *5*

Gene Pulser MXcell システムのセットアップ *6*

本システムの手引き *8*

エレクトロポレーションプレートのウェルセットと *Quadrant* *12*

3　哺乳類細胞の調製 14

哺乳類細胞の調製 *14*

エレクトロポレーション用の試薬と溶液 *16*

4　システムのプログラミングと実行 17

システムの電源を入れる *18*

Protocol Set-Up オプション *18*

Gradient Protocol オプション *20*

User Protocols オプション *22*

Pre-Set Protocols オプション *23*

Last Pulse オプション *24*

Data Management オプション *24*

Screen Intensity オプション *25*

Measurements オプション *25*

プロトコールの保存 *26*

ユーザーおよびプロトコールの追加と削除 *27*

5　Pre-Set Protocol 28

Mimi-Optimization Protocols *31*

Whole Plate Protocols *33*

Well Set Protocols *34*

Mixed Protocols *35*

6　エレクトロポレーションに影響を与える要因 38

エレクトロポレーションに影響を与える要因 *38*

エレクトロポレーションの原理 *42*

付録 A：Pulse Trac™ システム 46
Pulse Trac システムの解説 *46*
Pulse Trac 診断アルゴリズム *47*

付録 B：トラブルシューティング 48

付録 C：引用文献 49

付録 D：仕様と製品情報 50
製品仕様 *50*
製品情報 *51*

1 はじめに

このたびは *Gene Pulser MXcell*™ エレクトロポレーションシステムをお買い上げいただき、ありがとうございます。本機器は、ハイスループットエレクトロポレーションシステムです。本システムには、哺乳類細胞や植物細胞をはじめとする大半の真核細胞に分子を効率的に導入するための条件をすばやく *Optimize*（至適化）できる機能が満載されています。

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムは、*96* ウェル、*24* ウェルおよび *12* ウェルのエレクトロポレーションプレートを用いて細胞のエレクトロポレーションが行えるように設計されています。

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムの概要

本システムは、*3* つのコンポーネントで構成されています：

- **パワーモジュール：** パワーモジュールは、減衰波（*exponential waveform pulse*）または矩形波（*square waveform pulse*）を発生させます。本ユニットは周辺モジュールを必要としない自立型ユニットで、最大 *500 V* のパルスを発生させる能力があり、マルチウェルプレートに再現性の高いエレクトロポレーション条件を確実に供給することができます。本システムは、以下のパラメータを変更できるように設計されています：波形、抵抗、電圧、コンデンサー容量、パルス持続時間、パルス数。
- **プレートチャンバー：** プレートチャンバーは種々のマルチウェルエレクトロポレーションプレートをセットすることができ、最大限の汎用性を備えています。
- **マルチウェルエレクトロポレーションプレート：** エレクトロポレーションプレートは、*12* ウェル、*24* ウェルおよび *96* ウェルの *3* 種類のフォーマットが販売されています。*96* ウェルプレートまたは *24* ウェルプレートを使用する場合には、一度に *24* 種類の異なる条件をプログラムに組み入れることができ、*12* ウェルプレートを使用する場合には、*12* 種類の条件を設定することができます。*96* ウェルプレートを使用して条件を至適化した後に、*24* ウェルプレートか *12* ウェルプレートを使用して実験を行っていただくことが可能です。初期条件を選択する際に、プリセット *optimization*

プロトコールをお役立てください。初めて扱う細胞系で条件を選択する場合にも、このプリセット *optimization* プロトコールが役に立ちます。

Bio-Rad のリソースとリファレンス

Bio-Rad では、研究者向けに多数のリソースを提供しています。以下のウェブサイトには、エレクトロポレーションの実験操作に関する有用な情報が掲載されています：

- **Gene Expression Gateway（www.bio-rad.com/genomics/）**

  このサイトは、エレクトロポレーションと遺伝子発現に関するさまざまな手法と応用について、豊富な技術的リソースを提供しています。また、このサイトではツール、引用、テクニカルサポートおよびトラブルシューティングといったリソースを特集しています。
- **Life Science Research ウェブサイト（discover.bio-rad.com）**

  このサイトには、テクニカルノート、マニュアル、製品情報およびテクニカルサポートへのリンクが収録されています。

以下のリンクをクリックして、本取扱説明書の複写やその他の *Bio-Rad* の資料をダウンロードまたは請求してください：

- *PDF* アイコンをクリックしてポータブルドキュメントフォーマットの複写をダウンロードし、*Adobe Acrobat Reader* ソフトウェア（*www.adobe.com*）でダウンロードしたファイルを開いてください。
- フォルダアイコンをクリックして、複写印刷物をお申し込みください。
- ファックスアイコンをクリックして、複写物のファックス送信をお申し込みください。
- 最寄りのバイオ・ラッド ラボラトリーズオフィスに電話し、複写印刷物をお申し込みください。

お知りになりたいことがあれば、以下のリソースをご利用ください：

表 1. Bio-Rad のリソース

リソース	連絡方法
バイオ・ラッド ラボラトリーズ オフィス	ホームページ（*www.bio-rad.com*）でご自分の国を選択し、*Bio-Rad* ウェブサイトに掲載されている連絡窓口をご確認ください。
テクニカルノートおよび資料	*Gene Expression Gateway*（*www.bio-rad.com/genomics/*）にアクセスし、ウェブページの右上にある *Search* ボックスをご確認ください。検索ボックス内に検索語を入力し、製品、テクニカルノートおよびマニュアルへのリンクをご覧ください。

リソース	連絡方法
テクニカルスペシャリスト	*Bio-Rad* は、質の高いテクニカルサポートを提供しています。弊社では、顧客のみなさまに実用的かつ専門的な解決策を提供するため、テクニカルサポート部門に経験豊富なスタッフを配置しています。ウェブ上でテクニカルサポートをご覧いただくには、*Gene Expression Gateway*（*www.bio-rad.com/genomics/*）にアクセスしてください。

本取扱説明書で使用されている記述表現

本取扱説明書は、*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムとその付属品を操作する研究者および技術者向けのものです。この取扱説明書では、*Gene Pulser MXcell* システムを安全にセットアップして操作するための方法を説明しています。この取扱説明書には、*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステム上でエレクトロポレーション実験を無事に行うための手法に関する重要ポイントも収録しています。

関連情報を一目でわかりやすく提供するため、本取扱説明書では表 *2* に挙げた記述表現を使用しています。

表 2. 本取扱説明書で使用されている表現

表現	意味
重要ポイント	役立つ情報や指示説明が記載されています。
備考：	本取扱説明書の別の項でさらに詳しく説明されている情報など、重要情報が記載されています。
警告！	研究者や機器に損傷を与えたり、データの喪失を引き起こす可能性のある、きわめて重要な情報について説明しています。
スクリーンメッセージ	操作者が選択または入力する液晶ディスプレイのスクリーンメッセージやコマンドを表示します。たとえば、「`Select Protocol Set-up` *in the home screen*」と記載されていれば、*Home* 画面上のリストにある「**`Protocol Set-up`**」という文字がハイライト表示されていることを意味しています。
コントロールパネルキーの名称	大文字のクーリエ書体で記載されている単語は、*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムのコントロールパネル上にあるキーの名称を示しています。たとえば、これらのキーには以下の名称がついています： • **`ENTER`** キーは、コントロールパネルにある *ENTER* という名称のキーです。 • 矢印キー**`RIGHT`** は、右向きの矢印キーです。

表現	意味
X を選択	矢印キーを押して **X** を選択します。「選択」とは、矢印キーを押して当該の単語をハイライト表示させるという意味です。たとえば、「**Protocol Set-up** を選択する」と記載されていれば、「矢印キーを使用して、液晶ディスプレイ画面上の **Protocol Set-up** という選択項目をハイライト表示させる」という意味になります。
X＞**Y** を選択	メニュー**X** から **Y** を選択します。たとえば、「**Protocol Set-up**＞**WHOLE PLATE** を選択する」と記載されていれば、Protocol Set-up という選択項目をハイライト表示させ、次の画面に表示される *WHOLE PLATE* を選択するという意味になります。一般に、「選択」という単語は、画面上の文字をハイライト表示させることを意味しています。たとえば、「**WHOLE PLATE** を選択する」と記載されていれば、矢印キーを押して、画面上に **WHOLE PLATE** という文字をハイライト表示させるという意味になります。
X を押す	コントロールパネル上の **X** キーを押します。たとえば、「**ENTER** を押す」と記載されていれば、「コントロールパネル上の **ENTER** キーを押す」という意味になります。

本取扱説明書および *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムに使用されている安全性ラベルに関する情報は、*iii* ページの「安全性および規制の遵守」を参照してください。

2 さあ始めましょう

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムは、すべてが完備された状態で出荷されますので、すぐにセットアップして使い始めることができます。この章では二つのセクションを設け、このエレクトロポレーションシステムを使い始めるにあたっての情報をご案内いたします：

- *Gene Pulser MXcell* システムの開封（*5* ページ）
- 同システムのセットアップ（*6* ページ）
- *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムの手引き（*8* ページ）
- *Gene Pulser* エレクトロポレーションプレートのウェルセットと *Quadrant*（*12* ページ）

Gene Pulser MXcell システムのプログラミングとエレクトロポレーション実験操作に関する詳しい情報は、*17* ページの「システムのプログラミングと実行」を参照してください。

システムの開封とセットアップ

お手元に届いた *Gene Pulser MXcell* システムには、以下のコンポーネントが梱包されています：

- *Gene Pulser MXcell* パワーモジュール
- プレートチャンバー
- *Gene Pulser* エレクトロポレーションプレート（*1*×*96* ウェル）
- *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステム取扱説明書
- プロトコールクイックガイド
- *Optimization*（至適化）クイックガイド

梱包材料をすべて取り除き、適切な電気コンセントが近くにある平らな乾いた面にコンポーネントを置いてください。すべてのコンポーネントがお手元に揃っているか確認してください。一つでも梱包漏れや破損しているものがあれば、バイオ・ラッド ラボラトリーズ オフィスにご連絡ください（*2* ページ）。

Gene Pulser MXcell システムのセットアップ

Gene Pulser MXcell パワーモジュールをセットアップするために、以下の手順にしたがってください：

1. *Gene Pulser MXcell* パワーモジュールの背面に電源コードを取り付けます（図 *1*）：

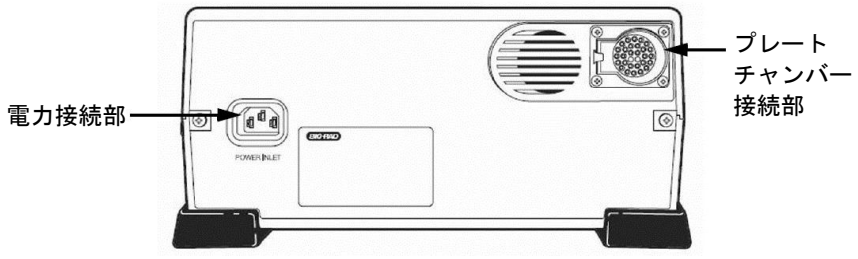


図 1. Gene Pulser MXcell パワーモジュールの背面パネル

2. パワーモジュールの背面に黒色コネクタを差し込み、プレートチャンバーを接続します：

図 2. パワーモジュールの前面とプレートチャンバーおよび電源スイッチ

3. 適切な電気コンセントにユニットのプラグを差し込みます。
4. パワーモジュールの右側にある電源スイッチを押して（図 *2*）、*Gene Pulser MXcell* システムに電源を入れます。

   重要ポイント： *Gene Pulser MXcell* システムの前面下部にある脚部を引き出し、液晶ディスプレイ画面の角度を変えてください。
5. *Home* 画面のリストにある選択項目を選び、操作を開始してください（図 *3*）。

1. Protocol Set-up
2. Gradient Protocol
3. User Protocols
4. Pre-set Protocols
5. Last Pulse
6. Data Management
7. Screen Intensity
8. Measurements

図 3. Home 画面の選択項目

Home 画面に一覧表示される選択項目の詳しい情報は、*17* ページを参照してください。

プレートチャンバーには、*Gene Pulser* エレクトロポレーションプレートをセットします。プレートチャンバーを使用してパルスを供給する場合には、必ずチャンバーの上蓋を閉じなくてはなりません。本システムの安全設計により、パルスを供給する前に上蓋を閉じることが必要条件として定められています。チャンバーの蓋が開いたままの状態で、エレクトロポレーションプレートにパルスが供給されることはありません。

備考： エレクトロポレーションプレートのスロット部分は、本機器専用に設計された *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションプレートしかセットできません。

プレートチャンバーを操作する場合には、以下のステップにしたがってください：

1. プレートチャンバー前面にあるタブをつまみ、ロックを外して上蓋を開けます。

図 4. プレートチャンバーを開ける

2. *96* ウェル、*24* ウェルまたは *12* ウェルプレートを入れ、ピンを揃えてセットし、しっかりと押し込みます。

図 5. 96 ウェルエレクトロポレーションプレートが設置されたプレートチャンバー

3. チャンバーを閉じる場合には、上蓋を静かに押し下げます。

備考： *Gene Pulser MXcell* システムには、*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファーのような抵抗の低いメディウム（*1000* オーム未満）のみを使用してください。

本システムの手引き

お手元の *Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムは、使いやすく直観的にプログラミングできるように設計されています。このセクションでは、本システムの操作方法について概要を説明します：

- *Gene Pulser MXcell* システムの概要（*8* ページ）
- コントロールパネルとキーの使用（*9* ページ）
- *Home* 画面上での操作選択（*10* ページ）

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステム概要

Gene Pulser MXcell パワーモジュールは、*2* 種類の異なる波形の一つをパルスとして発生させます：

- 減衰波（*EXP*）
- 矩形波（*SQR*）

波形を供給するために、パワーモジュールには *25 µF* 刻みで選択できる作動可能範囲 *25*～*2475 µF* のコンデンサーセットが搭載されています。矩形波パルスの場合、パワーモジュールは抵抗の低いメディウムにパルスを供給するのに必要な大コンデンサー容量（*2,475 µF*）を備えています。

パワーモジュールは、*50*～*1500*Ω の電子制御された電気抵抗を設定できます。サンプルと並列に抵抗器を設置することにより、モジュールが回路の電気抵抗を制御するため、減衰波のタイムコンスタントを減少させることができます。この設定は、抵抗の高いメディウムを使用する場合にタイムコンスタントを制御する有効ですが、抵抗の低いメディウムを用いる場合のタイムコンスタントにはほとんど影響を与えません。

> 備考： *Gene Pulser MXcell* システムには、*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファーのような抵抗の低いメディウム（*1000* Ω未満）のみを使用してください。

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムでは、本システム用に特別に設計された *12* ウェル、*24* ウェルおよび *96* ウェルフォーマットの *Gene Pulser* エレクトロポレーションプレートを使用します（*12* ページの「エレクトロポレーションプレートのウェルセットと *Quadrant*」を参照してください）。

パルス後に、各プレートまたはウェルセットの結果が画面に表示されます。

> **重要ポイント：** *Gene Expression Gateway* ツールウェブサイト（*www.bio-rad.com/genomics/*）にアクセスし、結果記録用のテンプレートをダウンロードしてください。

Gene Pulser MXcell システムでパルスを供給する際に、以下のパラメータを用いることができます：

- 電圧：ボルト（*V*）
- 電流：マイクロファラド（*µF*）
- 電気抵抗：オーム（Ω）
- 通電時間：ミリ秒（*ms*）
- パルス数：個々のパルス数（*NP*）
- パルス間隔：各パルス間の時間

コントロールパネルの使用

コントロールパネルには、液晶ディスプレイ画面とキーパッドが組み込まれています：

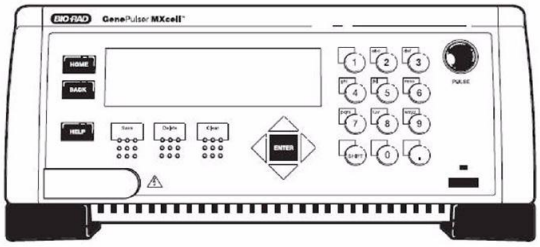


図 6. Gene Pulser MXcell システムのコントロールパネルとキーパッド

エレクトロポレーション実験に関する全パラメータを入力するには *Gene Pulser MXcell* コントロールパネル上のキーを使用します。表 *3* では、コントロールパネル上の各キーの機能について説明します。

表 3. コントロールパネル上のキーの機能

キー	機能
英数字キー	*Gene Pulser MXcell* システムのプログラミングを行う際に、これらのキーを押して文字や数字を入力します。英字と数字の入力切り替えは *Shift* キーを使用します。同じキーに割り当てられた文字を *2* 回続けて入力したい場合には、右向き矢印キーでカーソルを移動させます。たとえば、「*a*」と入力してから「*b*」と入力したい場合には、まず「*abc*」キーを *1* 回押し、*ENTER* キーを押し、次に「*abc*」キーを *2* 回押します。 備考： *2* 桁の数字を入力する場合には、最初の桁を入力してから *2* 秒以内に次の桁を入力しなければなりません。*2* 桁目の入力が遅いと、パワーモジュールが *2* 桁ではなく *1* 桁の数字を入力してしまいます。
`Shift` キー	英字と数字の入力を切り替えます。たとえば、英字を入力する場合には、*Shift* キーを押して英字モードに切り替えてから、しかるべき文字キーを押します。「*a*」と入力する場合には数字キーの「*2*」を *1* 回押し、「*b*」と入力する場合には数字キーの「*2*」を *2* 回押し、「*c*」と入力する場合には数字キーの「*2*」を *3* 回押します。一般に、英字入力と数字入力のいずれか一方のみが必要な場合には、*Gene Pulser MXcell* システムが英字入力と文字入力を自動的に切り替えます。
`HOME` キー	プログラムのどこからでも *Home* 画面に戻ることができます。
`BACK` キー	操作範囲内で、一つ上の階層の画面に戻ります。
`HELP` キー	それぞれの操作画面の内容に見合ったヘルプ画面を表示します。ヘルプ画面を開きたい場合には、`HELP` キーを押します。ヘルプ画面を消して操作画面に戻す場合には、`HELP` キーをもう一度押します。 各ヘルプ画面は、各機能についての記載が表示され、引き続き現在実行中の操作に戻ることができます。上下の矢印キーを押してヘルプ画面をスクロールさせてください。
`Save` キー	*User Name* と *User Protocol* を保存します。
`Delete` キー	フィールド内に最後に入力された文字のみを削除します。*User Name* と *User Protocol* のファイルを削除する場合にも使用します。

表 3. コントロールパネル上のキーの機能

キー	機能
Clear キー	当該フィールドの文字列をすべて消去します。
ENTER キー	選択項目を確定したり、次の位置にカーソルを移動させる場合にこのキーを押します。
矢印キー	*4* つの矢印キーの一つを押すと、矢印の方向にカーソルが移動します。上下の矢印キーを押すと、*1* 回につき一列ずつカーソルが上下します。画面とカーソルの位置に応じて、右または左向きの矢印キーを押すと、*1* 回につき *1* マスずつカーソルが左右に移動し、同一メニューで複数の画面がある場合には画面が前後に切り替わるほか、入力数値を増減させることができます。
PULSE キー	この赤いキーを押すと電気パルスが発生し始めます。プレートにパルスが供給されている間は画面に Pulsing と表示され、本システムからブザーが鳴ります。本システムから複数のパルスが供給される場合には、ラストパルスが供給された後にブザーが鳴ります。

Home Screen に表示される各項目の概要

Gene Pulser MXcell システムの *Home* 画面には、必要な選択項目がすべて盛り込まれています：

- **プログラムおよび実行プロトコール：** エレクトロポレーション実験のパラメータの設定を行います。
- **システム機能：** データ表示、バッファーのテスト、画面の調整を行います。

プログラムプロトコールに対するオプションも含め、*Home* 画面から本システムのすべての選択項目にアクセスすることができます：

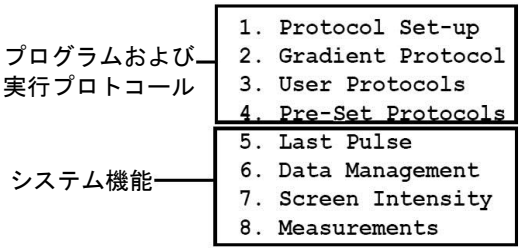


図 7. Home 画面の選択項目

重要ポイント： コントロールパネルの *HOME* キーを押せば、プログラムのどこからでも *Home* 画面に戻ることができます。

選択項目には、*2* タイプの操作が組み込まれています：

- **プロトコール：** *Gene Pulser* エレクトロポレーションプレートを用いて実行する際に、*4* 種類あるプロトコールオプションの一つを使用してプロトコールを作成、保存または表示します。一つのプレート内で異なるプロトコールを実行するようにウェルセットと *Quadrant* をプログラミングすることができます。各プロトコール内で、それぞれ個々のウェル、各ウェルセットまたは各 *Quadrant* のパラメータを変更することができます。
- **システム機能：** *4* 種類ある機能の一つを使用して、データへのアクセスやシステムパラメータの調整を行います。

Gene Pulser MXcell システムの操作を開始するには、*Home* 画面に表示される選択項目の一つを選びます。表 *4* に、すべての選択項目と関連する操作内容を列挙します。

表 4. Home 画面に一覧表示される選択項目

選択項目	操作内容
プロトコール	
Protocol Set-up	プレートに供給するパラメータを手動でプログラムします。
Gradient Protocol	プレート上のすべてのウェルに対して設定値の勾配を自動的にプログラムするために使用する初期値を設定します。
User Protocols	各システムユーザーのディレクトリ内にあるすべてのプロトコールにアクセスするほか、新規ユーザーディレクトリを作成します。
Pre-Set Protocols	プレートにパルスを供給するためのパラメータを容易に *optimization*（至適化）するために設計された *21* 種類のプリセット・プロトコールの一つを表示します。
システム機能	
Last Pulse	エレクトロポレーションで最後に使用したパルスのパラメータを呼び出し、同一条件を用いてパルスを供給します。
Data Management	日付と時刻別に記録された過去 *100* 回分のパルスについて、パルスパラメータと実験結果を表示します。
Screen Intensity	液晶ディスプレイのコントラスト強度を調整します。
Measurements	本装置にセットされているウェルの電気抵抗やコンデンサー容量を測定します。

エレクトロポレーションプレートのウェルセットと Quadrant

Gene Pulser エレクトロポレーションプレートは、以下の *3* 種類の異なるフォーマットをご利用いただけます：*96* ウェル、*24* ウェルおよび *12* ウェルです。表 *5* に、プレート *1* 枚の各ウェルに対して推奨される細胞濃度と容量を示します。

表 5. エレクトロポレーターのプレートフォーマット

プレートフォーマット	細胞濃度	容量	ウェルセット数
96 ウェル	1×10^5〜2×10^6 個	*100*〜*200 µL*	*24*
24 ウェル	5×10^5〜8×10^6 個	*500*〜*800 µL*	*24*
12 ウェル	1×10^6〜1.5×10^7 個	*1.0*〜*1.5mL*	*12*

哺乳類細胞のエレクトロポレーション法に関する詳しい情報は、*14* ページの「哺乳類細胞の調製」を参照してください。

ウェルセットと *Quadrant* は、エレクトロポレーションプレートを機能単位に分割します。それぞれ異なるウェルセットまたは *Quadrant* に対して異なるプロトコールを実行することも選択できます。各プレートフォーマットは、以下の定義にしたがって分割されます：

- **ウェルセット：** 一つのプレート内で、ひとまとまりとして扱うウェル
- **Quadrant：** 一つのプレートを四分割した *1* エリアにあるすべてのウェルまたはウェルセット

ウェルセット

1 ウェルセットとは、*96* ウェルプレートの縦列を構成している *4* つのウェルからなる *1* 群のことであり、プログラミングされた同一のエレクトロポレーション条件が同時に供給されます。以下の事項を行う場合、ウェルセットが役に立ちます：

- 同じ細胞タイプおよび同じプロトコールを使用して実験を再現する。
- 異なるウェルセットに異なる実験試料（分子または細胞）を入れ、まったく同一のエレクトロポレーション条件下でさまざまな可変条件をテストする。たとえば、同一の細胞系に異なる *siRNA* を導入するなど。

96 ウェルプレートの場合、各ウェルセットは縦列にある *4* つの隣接したウェルで構成されています。たとえば、縦列 *1* と横列 *A, B, C* および *D* からなる *4* つのウェルが一つのウェルセットになります（図 *8*）：

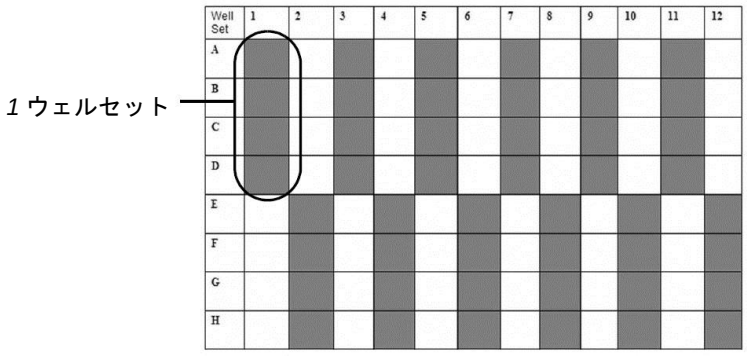


図 8. 96 ウェルプレートのウェルセット

図 *8* の網掛け部分と白抜き部分は、ひとまとまりとして扱う一連のウェルを表しており、ウェルセット単位でまとめてグループ分けされています。通電の際は、各ウェルセットに対して入力されたパラメータは、当該セットを構成するすべてのウェルに同時に供給されます。

プロトコールをプログラミングする場合、ウェルセットは横列の英文字とこれに続く縦列の番号の組合せで表示されます。たとえば、ウェルセット「*ABCD1*」は、縦列 *1* にあるウェル *A, B, C* および *D* で構成されています（図 *8*）。

警告！ ウェルセットを構成しているすべてのウェルに、サンプルかサンプルバッファーのいずれかを満たさなければなりません。たとえば、*6* つのウェルに対してエレクトロポレーションを行いたいのであれば、ウェルセットを構成している *4* つのウェル（たとえば *ABCD1*）すべてにサンプルを満たし、次のウェルセットのうち二つのウェル（たとえば *AB2*）にもサンプルを満たします。最後に必ず、二つ目のウェルセットの残り二つのウェル（たとえば *CD2*）にサンプルバッファーを満たしてください。

Quadrant

24 ウェルプレートと *96* ウェルプレートは、*Quadrant* を用いてプログラミングすることができます。*96* ウェルのエレクトロポレーションプレートの場合、一つの *Quadrant* は *6* つのウェルセットをひとまとまりとして扱います。*24* ウェルプレートの場合、それぞれの *Quadrant* には *6* つのウェルがひとまとまりとして含まれています。*Quadrant* をプログラミングすれば、勾配実験を容易に再現することができます。図 *9* に、*96* ウェルおよび *24* ウェルエレクトロポレーションプレートのそれぞれの *Quadrant* を提示します。

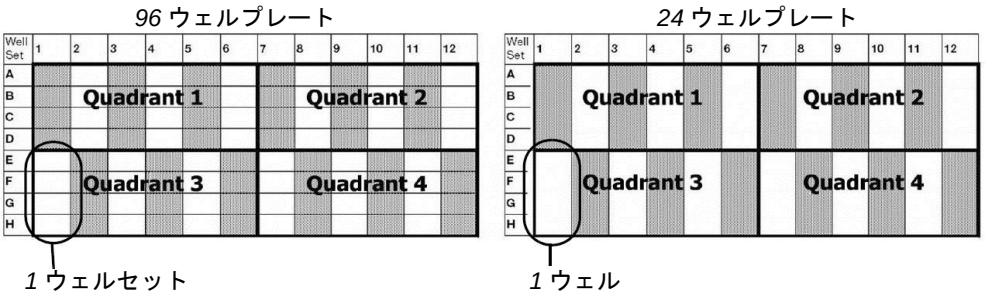


図 9. 96 ウェルプレートと 24 ウェルプレートの Quadrant

3 哺乳類細胞の調製

エレクトロポレーション実験を成功させるには、細胞の調製がきわめて重要になります。本章では、*Gene Pulser MXcell™* エレクトロポレーションシステムで実験をうまく進める方法について、重要な情報を記載しています。以下のセクションをご参照ください：

- 哺乳類細胞のエレクトロポレーション（*14* ページ）
- エレクトロポレーション用の試薬と溶液（*16* ページ）

哺乳類細胞の調製

このセクションでは、エレクトロコンピテントな哺乳類細胞の調製法とエレクトロポレーション後の哺乳類細胞の扱い方について記載します。これらの手技の多くは、*Bio-Rad でテスト済み*です。以下のリストは、*Gene Pulser MXcell™* エレクトロポレーションシステムを使用してエレクトロポレーション実験を行う際の主なステップの概要を記載したものです。詳しい情報をお知りになりたい場合には、当該ページをご参照ください。

- 細胞の回収と細胞数の計測（*15* ページ）
- エレクトロポレーション用の細胞調製（*15* ページ）
- *Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファーに細胞を再懸濁し、エレクトロポレーションプレートに移す。
- エレクトロポレーションプレートをプレートチャンバーにはめ込む。
- *Home* 画面から新規のプロトコールを作成するか既存のプロトコールを選択し、*PULSE* ボタンを押して細胞のエレクトロポレーションを行う。
- エレクトロポレーションプレートを取り出し、新鮮な細胞培養プレートに細胞を移す。必要であれば、ほかのウェルの細胞も同じ培養プレートに混合する。トランスフェクション効率を評価する。

エレクトロポレーション条件に影響を与える因子の情報については、*38* ページを参照してください。

細胞の回収と細胞数の計測

細胞の回収と細胞数の計測を行う場合には、以下の手順にしたがってください。

1. エレクトロポレーションの前日に細胞を継代しておきます。いずれの細胞タイプも，活発に増殖している状態で回収します。接着細胞を扱うのであれば、トリプシン処理して細胞を剥離させます。増殖培地を添加した後、細胞をかるく遠心し沈降させます。浮遊細胞を扱う場合も、細胞をかるく遠心し沈降させてください。
2. 細胞を沈降させたら培地を除去し、*PBS* 等のバッファーを加え静かにピペッティングして細胞を懸濁します。
3. 懸濁した細胞から一部を取り出して計数します。

エレクトロポレーション用の細胞調製

エレクトロポレーション用の細胞を調製する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. 実験を行うのに必要な数の細胞を取り出します。接着細胞の場合、弊社では 1×10^6 *cell/mL* の濃度でご使用になることを推奨していますが、*Bio-Rad* の実験では $0.5〜5\times10^6$ *cell/mL* の範囲で問題なく使用することができました。浮遊細胞の場合は $2〜3\times10^6$ *cell/mL* を推奨しますが、社内実験では $1〜5\times10^6$ *cell/mL* の範囲で順調に使用することができました。
2. 細胞をかるく遠心して沈降させます。*PBS* を吸引除去し、適量の *Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファー試薬に細胞を再懸濁させます（接着細胞 1×10^6 個に対して *1 mL*、浮遊細胞 $2〜3\times10^6$ 個に対して *1 mL*）。
3. 核酸またはその他の分子を添加します。*siRNA* を導入するエレクトロポレーションの場合、*10〜100 nM* の *siRNA* を使用してください。プラスミド *DNA* を導入するエレクトロポレーションでは、*5〜40 µg/mL* を使用してください。

エレクトロポレーション

細胞のエレクトロポレーションを行う場合には、以下の手順にしたがってください：

1. *96* ウェルエレクトロポレーションプレートの場合、*1* ウェルに対して *100〜200 µL* の混合物（エレクトロポレーションバッファー試薬中の細胞と核酸）を使用してください。*24* ウェルエレクトロポレーションプレートの場合には、*1* ウェルにつき *500〜800 µL* の混合物を使用します。*12* ウェルエレクトロポレーションプレートでは、*1* ウェルにつき *1〜1.5 mL* の混合物を使用します。

   警告！ 一つのウェルセットを構成しているすべてのウェルには、サンプルかサンプルバッファーのいずれかを満たさなければなりません。たとえば、*6* つのウェルに対してエレクトロポレーションを行いたいのであれば、ウェルセットを構成している *4* つのウェル（たとえば *ABCD1*）すべてにサンプルを満たし、次のウェルセットのうち二つのウェル（たとえば *AB2*）にもサンプルを満たします。最後に必ず、二つ目のウェルセットの残り二つのウェル（たとえば *CD2*）にサンプルバッファーを満たしてください。
2. プレートを揺り動かして電極を湿らせ、細胞を均一にし、エレクトロポレーションを行います。
3. 増殖培地を添加した組織培養ディッシュに細胞を移します。
4. アッセイに供する準備が整うまで、CO_2 加湿インキュベータを用いて *37*℃で細胞をインキュベートします。
5. *24* 時間インキュベートしたら、増殖培地を交換します。

トランスフェクション効率の評価

トランスフェクション実験の効率を評価する場合、いくつかの手技を用いることができます：
蛍光標識 *siRNA* を使用すれば、*siRNA* を導入する場合のトランスフェクション効率を測定することができます。トランスフェクション効率は、蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーによって測定することができます。プラスミドを導入する場合のトランスフェクション効率は、*GFP* や *β* -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子を発現しているプラスミドをエレクトロポレーションすることによって測定することができます。

哺乳類細胞系のエレクトロポレーションを初めて行う場合には、当該細胞やほかの類似細胞を用いて別途実施した実験に基づき、エレクトロポレーション後の増殖条件を選択します。

エレクトロポレーション用の試薬と溶液

以下に、エレクトロポレーション実験を行う場合に推奨される試薬と溶液を列挙します：

- *Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファー（カタログ番号 *165-2676* と *165-2677*）
- *FBS* と必要な添加物を加えた増殖培地
- トリプシン-*EDTA*
- 滅菌 *PBS*：*137 mM NaCl*、*2.7 mM KCl*、*9.5 mM* リン酸ナトリウム、*pH7.3*

4 システムのプログラミングと実行

プリセット・プロトコールまたは新規作成したプロトコールを使用して、*Gene Pulser MXcell™* エレクトロポレーションシステムによる実験を行います。エレクトロポレーション実験を行う場合、新規のプロトコールをプログラミングすることもできますし、既存のプロトコールを選択することも可能です。

この章では、プロトコールのプログラミング、プロトコールの実行およびその他のシステム機能の使用について手順を記載します：

- *Gene Pulser MXcell* システムの電源を入れる（*18* ページ）。
- `Protocol Set-up` という項目を選択し、プレート全体またはウェルセットに対して新規プロトコールをプログラミングする（*18* ページ）。
- `Gradient Protocol` という項目を選択し、プレート全体または *Quadrant* に対して新規の *gradient protocol* をプログラミングする（*20* ページ）。
- `User Protocols` という項目を選択して、ユーザー・プロトコールを表示する（*22* ページ）。
- `Pre-Set Protocols` という項目を選択して、プリセット・プロトコールを表示する（*23* ページ）。
- `Last Pulse` という項目を選択して、最後に供給したパルスを確認する（*24* ページ）。
- `Data Management` という項目を選択して、出力されたプロトコールのデータを確認する（*24* ページ）。
- `Screen Intensity` という項目を選択して、液晶ディスプレイの輝度を変更する（*25* ページ）。
- `Measurements` という項目を選択して、バッファーの電気抵抗とコンデンサー容量をチェックする（*25* ページ）。
- 新規プロトコールまたは編集済みプロトコールを保存する（*26* ページ）。
- `User Protocols` という項目を選択して、新規ユーザーを追加する（*27* ページ）。

システムの電源を入れる

パワーモジュールの右側にある電源ボタンを押して、*Gene Pulser MXcell* システムの電源を入れます（*6* ページの図 *2* 参照）。

電源を入れると、*Gene Pulser MXcell* システムが一連のテストを実行します。これらのテストによって、本システムが規格内で作動しているかどうかを検証します。テストでは、*Pulse Trac*™ システム（*46* ページ）とファームウェアをチェックします。テストが行われている間、システムには *Bio-Rad Laboratories* のロゴ、*Gene Pulser MXcell* システムの名称およびファームウェアのバージョンが表示されます。

初期化の後、*Home* 画面が表示されます（*10* ページ）。この画面から、プロトコールのプログラミングと実行に関する最初の *4* 項目を含むすべての選択項目に容易にアクセスすることができます。*Home* 画面に表示されている項目を選択する場合には、上下の矢印キーを押して当該項目を選択し、ENTER キーを押して選択項目を確定します。

> **重要ポイント：** コントロールパネルの *HOME* キーを押せば、プログラムのどこからでも *Home* 画面に戻ることができます。

Protocol Set-up オプション

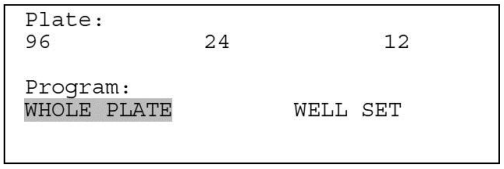
Protocol Set-up という選択項目を利用すれば、以下のようにプレートに対してプロトコールをプログラミングすることができます：

- **プレート全体（WHOLE PLATE）：** エレクトロポレーションプレート全体に同一のパルスパラメータを適用します（*18* ページ）。
- **ウェルセット（WELL SET）：** エレクトロポレーションプレート内の一つのウェルセットに対してパラメータを適用します（*19* ページ）。

WHOLE PLATE プログラミング

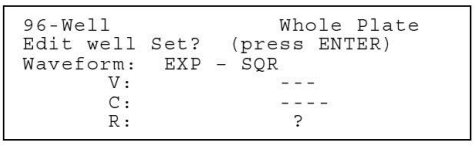
プレート全体をプログラミングする場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面の** Protocol Set-up **を選択します。**
   ENTER キーを押して選択内容を確定します。
2. **プレートサイズを選択します。**
   矢印キーを使用して Plate（*96, 24* または *12*）を選択し、ENTER キーを押して選択内容を確定します。
3. WHOLE PLATE **を選択します。**
   ENTER キーを押して選択内容を確定します：



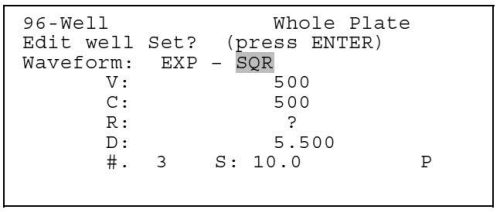
4. **波形を選択します。**
   矢印キーを押して波形（EXP または SQR）を選択し、ENTER キーを押して選択内容を確定します。
5. **パラメータを入力します。**
   パルスユニットに必要なパラメータ値を入力します。
   備考： パラメータとして入力された数値が *Gene Pulser MXcell* システムの制限範囲から外れている場合には、許容範囲内の最も近い数値に変更されます。

矢印キーを押してパラメータを選択した後、英数字キーを押して新たな数値を入力します。ENTER キーを押して入力を確定します。



重要ポイント： 数値を消去する場合には Clear キーを押します。

ここでは具体例として、矩形波パルス（SQR）を使用する場合の各パラメータの数値をいくつか例示します：



備考： 右下の p は、必要なパラメータがすべて入力されており、PULSE ボタンを押せる準備が整ったことを示しています。

重要ポイント： 矢印キーでカーソルを移動させて Edit well Set?という項目を選択すれば、ウェルセットの編集を行うこともできます。編集を開始する場合には、*ENTER* キーを押してください。ウェルセットプログラミングの詳しい情報は、*20* ページのステップ *5*「波形（EXP または SQR）の選択」を参照してください。

6. **（任意実施項目）Save キーを押して、プロトコールの変更事項を保存します（26 ページ）。**
7. **PULSE ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**

   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、PULSE ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

WELL SET プログラミング

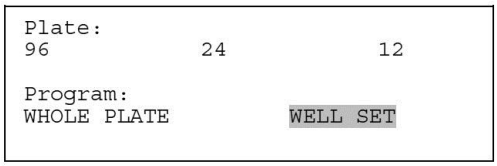
ウェルセットに対して異なるプロトコールを実行する場合のプレートのプログラミングについては、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面の Protocol Set-up を選択します。**

   ENTER キーを押して選択内容を確定します。
2. **プレートサイズを選択します。**

   矢印キーを使用してプレートサイズを選択した後、ENTER キーを押して選択内容を確定します。
3. **WELL SET を選択します。**

   WELL SET を選択し、*ENTER* キーを押して選択内容を確定します。



4. **プレートのウェルセットを選択します。**

   ウェルセットの選択やパラメータ間の移動は、左右の矢印キーを使用します。

   ENTER キーを押して、パラメータ入力を確定します。

5. **波形（EXP または SQR）を選択します。**
   矢印キーを押して波形を選択します。次に、各パラメータの数値を入力します。入力したら、ENTER キーを押して選択内容を確定してください。
   備考： 右下の p は、必要なパラメータがすべて入力されており、PULSE ボタンを押せる準備が整ったことを示しています。
6. **（任意実施項目）ほかのウェルセットを選択します。**
   上向きまたは下向きの矢印キーを長押しすれば、プレート内のほかのウェルセットを選択することができます。実験を実行するにあたり、各ウェルセットに対してすべてのパラメータを入力してください。
7. **（任意実施項目）PULSE ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**
   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、PULSE ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

Gradient Protocol オプション

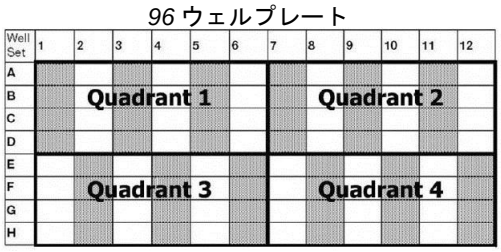
Gradient Protocol を利用すれば、プレートの全ウェルに対して設定値の勾配を自動的にプログラムするために使用する数値を指定することができます。このプロトコールを用いれば、ご使用になる細胞タイプに対する条件をすみやかに至適化できます。

備考： *Gradient Protocol* は、*24* ウェルと *96* ウェルのエレクトロポレーションプレートにのみ実行できます。

gradient protocol を設定するには、まず勾配をかけるプレートの位置を選択します。以下のセクションに記載されている手順にしたがい、プレートに *gradient protocol* を設定してください：

- GRADIENT： ウェルセットまたはプレート全体に対して *gradient protocol* を実行します（*21* ページ）。
- QUADRANT： プレートを四分割した *1* エリアにあるウェルに対して *gradient protocol* を実行します（*21* ページ）。

96 ウェルプレート



24 ウェルプレート

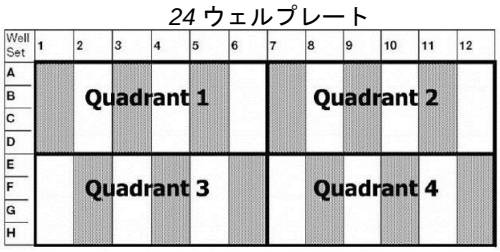


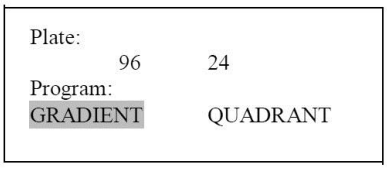
図 10. 96 ウェルプレートと 24 ウェルプレートの Quadrant Quadrant とは、プレートを四分割した 1 エリアにあるウェルのことである。

入力した電圧の中央値がウェルセットの中間点に適用されます。プレート全体でみた場合、中間点は *EFGH1* のウェルセットに対応しており、*Quadrant* 単位でみた場合には、*ABCD4, ABCD10, EFGH4* または *EFGH10* のいずれかに相当します。入力したパーセント値の左側にあるウェルは入力したパーセンテージだけ減少するのに対し、入力したパーセント値の右側にあるウェルはパーセント値の分だけ増加します。実行完了後、右矢印キーを使用すれば各パラメータの数値を求めることができます。

GRADIENT プログラミング

gradient protocol のプログラミングを行う場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面の** Gradient Protocol **を選択します。**
   ENTER キーを押して選択内容を確定します。
2. **プレートサイズを選択します。**
   矢印キーを押して Plate（96 または 24）を選択し、ENTER キーを押して選択内容を確定します。
3. GRADIENT **を選択します。**
   GRADIENT を選択した後、ENTER キーを押して選択内容を確定します。

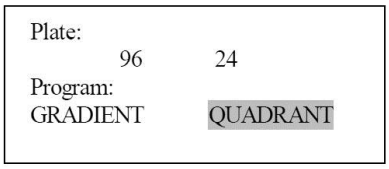


4. **波形（**EXP **または** SQR**）を選択します。**
   矢印キーを押して波形を選択した後、各パラメータの数値を入力します。入力したら、ENTER キーを押して選択内容を確定してください。
   備考： ディスプレイ右下の p は、必要なパラメータがすべて入力されており、PULSE ボタンを押せる準備が整ったことを示しています。
5. PULSE **ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**
   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、PULSE ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

QUADRANT プログラミング

Quadrant プログラムのプログラミングを行う場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面の** Gradient Protocol **を選択します。**
   ENTER キーを押して選択内容を確定します。
2. **プレートサイズを選択します。**
   矢印キーを使用して Plate（96 または 24）を選択し、ENTER キーを押して選択内容を確定します。
3. QUADRANT **を選択します。**
   矢印キーを使用して QUADRANT を選択し、ENTER キーを押して選択内容を確定します。



4. **波形（**EXP **または** SQR**）を選択します。**
   矢印キーを押して、各パラメータの数値を入力します。入力したら、ENTER キーを押して選択内容を確定してください。
   備考： ディスプレイ右下の p は、必要なパラメータがすべて入力されており、PULSE ボタンを押せる準備が整ったことを示しています。

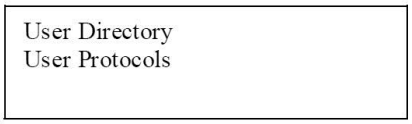
5. **（任意実施項目）別の Quadrant を選択します。**
   上下の矢印キーを押したり離したりすれば、*Quadrant* の範囲内でパラメータ間を移動することができます。上下の矢印キーを長押しし、別の *Quadrant* を選択します。
6. **PULSE ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**
   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、PULSE ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

User Protocols オプション

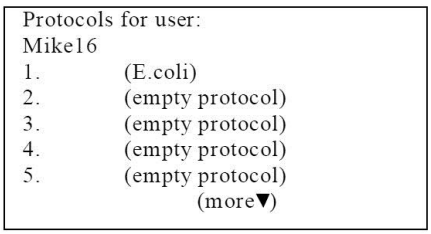
User Protocol リストから既存のプロトコールを選択して実行します。また、User Protocol リストからプロトコールを作成、表示、名称変更または削除することもできます。今後の実験のため、あらゆるプロトコールを *User Protocols* として保存しておいてください。プロトコールはそのまま実行するか、あるいは編集してから実行します。

User Protocols を選択実行する場合には、以下の手順にしたがってください：

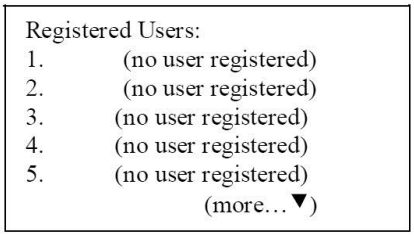
1. **Home 画面の User Protocols を選択します。**
   ENTER キーを押して選択内容を確定します。



   備考： この操作では、ユーザー本人のディレクトリが表示されます。別のユーザーのディレクトリを選択したい場合には、*User Protocols* ではなく **User Directory** を選択してください。*ENTER* キーを押して選択内容を確定します。
2. **User Protocols のリストからプロトコールを選択します。**
   上下の矢印キーを押してプロトコールを選択してください。*ENTER* キーを押して選択内容を確定します。



3. **（任意実施項目）別のユーザーのディレクトリからほかのプロトコールを表示させたい場合には、Back キーを押してください。**
   上下の矢印キーを押したり離したりすれば、画面が進んで次のプロトコールを表示させることができます。
   上下の矢印キーを長押しすれば、次の画面にスクロールさせることができます。



4. **選択したプロトコールを編集します。**
   変更事項を入力したら、`Save` キーを押して変更内容を保存します：
   - プロトコールの名称を変更する場合には、*CLEAR* キーを押して元の名称を消去してから新しい名称を入力します。*ENTER* キーを押して変更内容を確定します。
   - プロトコールのパラメータを変更する場合には、変更したいパラメータを選択して新しいパラメータを入力します。
   - *ENTER* キーを押して選択内容を確定します。
5. **選択したプロトコールを削除します。***DELETE* キーを押してください。画面にプロンプトが表示されたら、もう一度 *DELETE* キーを押してください。
6. **`Save` キーを押して、プロトコールの変更事項を保存します（26 ページ）。**
7. **`PULSE` ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**
   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、`PULSE` ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

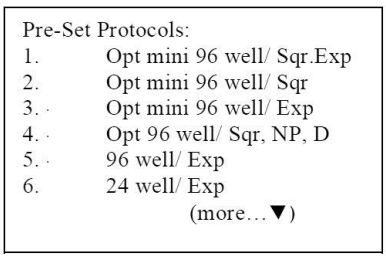
Pre-Set Protocols オプション

`Pre-Set Protocols` リストから既存のプロトコールを選択して実行します。今後の実験のため、あらゆるプロトコールを *User Protocols* として保存しておいてください。プロトコールはそのまま実行するか、あるいは編集してから実行します。

Bio-Rad の研究者が 21 種類の至適化のための *Pre-Set Protocol* を開発いたしましたので、すぐに実験を行うことができます。これらのプロトコールでは代表的なエレクトロポレーション条件が至適化を行うことができ、既知のあるいは未知のパラメータで検討を開始することもできます。

pre-set protocol を実行する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面の `Pre-Set Protocol` を選択します。**
   `ENTER` キーを押して選択内容を確定します。
2. **リストから pre-set protocol を選択します。**
   上下の矢印キーを押したり離したりすれば、画面が進んで次のプロトコールを表示させることができます。上下の矢印キーを長押しすれば、次の画面にスクロールさせることができます。`ENTER` キーを押して選択内容を確定します。



備考： 各 *Pre-Set Protocol* のパラメータとプレートのセットアップに関する詳しい情報は、*17* ページの「システムのプログラミングと実行」を参照してください。

3. **（任意実施項目）パラメータの数値を変更します。**
   矢印キーを押してパラメータを選択し、英数字キーで新たな数値を入力します。変更内容を保存して新たなプロトコールを作成する場合には、*Save* キーを押します（*26* ページ）。
   備考： 保存する前に、必ずプロトコールの名称を変更してください。*CLEAR* キーを押して *Pre-Set Protocol* の名称を消去し、英数字キーで新しい名称を入力します（*26* ページ）。
4. **（任意実施項目）Save キーを押して、プロトコールの変更事項を保存します（26 ページ）。**
5. **PULSE ボタンを押して、サンプルのエレクトロポレーションを実施します。**
   重要ポイント： プロトコール開始後であっても、必要であれば実験を停止させることができます。プロトコールを中止する場合には、PULSE ボタンを長押しします。プロトコールが停止すると、画面にラストパルスが表示されます（*24* ページの「*Last Pulse* オプション」参照）。

Last Pulse オプション

パルスが終了すると、画面にラストパルスデータが表示されます。また、Last Pulse 機能を選択すれば、当該データを表示させることもできます。

重要ポイント： この機能を利用すれば、停電が発生した場合でも停電前に本システムが供給したラストパルスから続行することができます。

Last Pulse の項目を表示させる場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home screen から Last Pulse を選択します。**
2. **ENTER キーを押して選択内容を確定します。**

Data Management オプション

Data Management 機能には、これまでに実行された過去 *100* 回分のプロトコールリストが保存されており、最後に実行された最新データから最も古いデータまで順番に保存されています。このリストを使用すれば、実験の的確なパラメータを表示させることができます。

備考： ファイルが最大番号に達すると、最も古いプロトコールファイルが削除されます。

プロトコールを実行する場合、*Data Management* によって実験結果と実験に使用したパラメータの一覧が表示されます。このリストに表示される名称は、実験を行った際に使用したプロトコールの名称です。

Data Management 操作によってリストアップされる実験を表示させたい場合には、以下の手順にしたがってください：

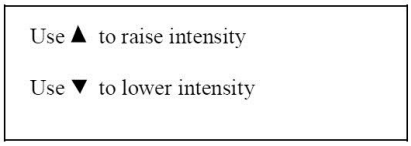
1. **Home screen から Data Mamagement を選択します。**
   上下の矢印キーを押して、Data Mamagement という項目を選択します。次に ENTER キーを押して選択内容を確定します。
2. **上下の矢印キーを押して、リストに挙げられているプロトコールを選択します。**
   重要ポイント： *Data Management* リストにある実験の名称を変更する場合には、当該の実験を選択して新たな名称を入力します。次に、ENTER キーを押して新しい名称を保存します。画面にプロンプトが表示されたら、保存する場合には「*Yes*」を押し、前の画面に戻したい場合には「*No*」を押します。
3. **以下のキーを押せば、選択した実験を表示または削除することができます：**
   - ENTER キーを押せば、選択したプロトコールを表示させることができます。

- `Delete` キーを押せば、選択したプロトコールをリストから削除することができます。
- 画面にプロンプトが表示されたら、削除する場合には「*Yes*」を押し、前の画面に戻したい場合には「*No*」を押します。

Screen Intensity オプション

画面が不明瞭な場合には、画面の輝度を調整します。画面の輝度を変更する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. `HOME screen` **から** `Screen Intensity` **を選択します。**
2. **画面の輝度を調整します。**
   上下の矢印キーを押して画面の輝度を調整し、変更後の見え方を確認します。

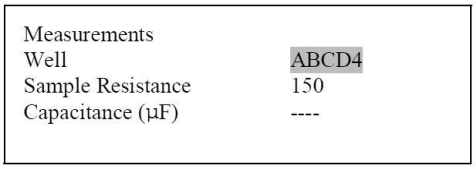


Measurements オプション

Measurements 画面を表示し、プレート内にあるバッファーのサンプル抵抗値を測定します。この機能を利用すれば、バッファーの妥当性を確認することができるほか、実験結果のトラブルシューティングを行うことができます。

備考： バッファーの抵抗値を測定するためにプレートサイズを選択する場合には、*Protocol Set-up* にアクセスしなければなりません。プレートサイズを選択したら、`HOME` *screen* に戻って以下の手順にしたがってください：

1. **HOME screen から Measurements という項目を選択します。**
2. **ウェル ID を入力すれば、当該ウェル内にあるサンプルの抵抗値を測定することができます。**
   左右の矢印キーを押して、測定したいウェルを選択します。次に `ENTER` キーを押して選択内容を確定し、もう一度 `ENTER` キーを押せば測定値を求めることができます。



プロトコールの保存

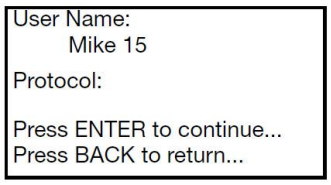
プロトコールのプログラミングやプリセット・プロトコールの変更を行った場合には、そのプロトコールを新たなユーザー・プロトコールとして保存できるというオプションが設けられています。

プロトコールをファイルとして保存する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **プロトコールのプログラミングまたは編集を行ったら、Save キーを押してプロトコールの保存を開始します。**
2. **英数字キーを使用してユーザー名を入力します。**

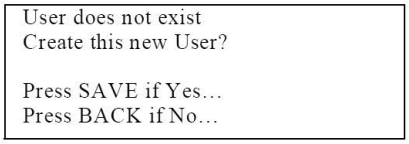
   重要ポイント： 英数字キーを使用して新たに文字を入力します。Shift キーを押せば、文字入力と数字入力を切り替えることができます。次に、ENTER キーを押して名称を保存します。消去したい場合には、Clear キーを押してください。

   以下の具体例では、Mike 15 というユーザー名を使用しています：



3. **（任意実施項目）ユーザーが存在しない場合には、新規ユーザーを作成します。**

   新規ユーザー名を入力したら、ENTER キーを押して名称を確定します。

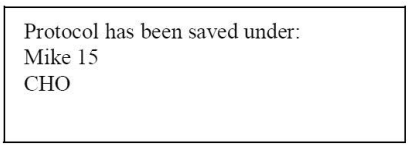


4. **英数字キーでプロトコール名を入力します。**

   重要ポイント： 英数字キーを使用して新たに文字を入力します。*Shift* キーを押せば、文字入力と数字入力を切り替えることができます。次に、ENTER キーか Save キーを押せば名称を保存することができます。消去したい場合には、Clear キーを押してください。

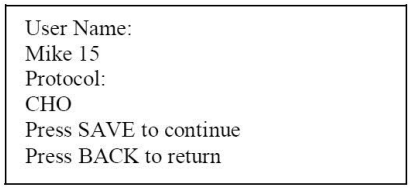
5. **Save キーを押してプロトコールを保存します。**

   新たなプロトコール名の確認画面が一時的に表示されます。



6. **続ける場合には** SAVE **キーを押し、プロトコールに戻りたい場合には** BACK **キーを押します。**

   重要ポイント： プロトコールを保存せずに別のプロトコールのプログラミングに移行したり、本システムのほかの機能を実行すると、プロトコールを保存するか削除するかの選択を求められます。



ユーザーおよびプロトコールの追加と削除

Gene Pulser MXcell システムは、ディレクトリ内のユーザー・プロトコールファイルにユーザー名を保存します。新規ユーザーを追加してからプロトコールを保存するか、プロトコールの保存と同時にユーザーを自動的に追加してください。ユーザーは削除することもできます。

備考： ユーザーディレクトリには、最大 *20* ユーザー名 × *15* プロトコールで合計 *300* 件までの入力情報を保存することができます。

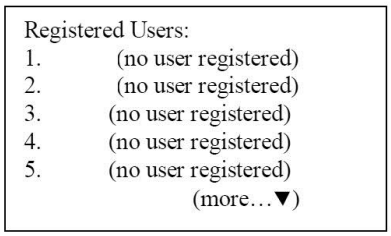
ユーザー名を追加する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **Home 画面から User Protocols を選択します。**

   ENTER キーを押して選択内容を確定します。

2. **User Directories を選択します。**

   矢印キーと *ENTER* キーを使用して、User Directories を選択します。画面には、登録ユーザーの一覧が表示されます：



   備考： 最大 *20* 名のユーザーを登録することができます；画面には、一度に *5* 名まで表示されます。

   重要ポイント： 上下の矢印キーを押したり離したりすれば、画面が進んで次のユーザー名を表示させることができます。上下の矢印キーを長押しすれば、次の画面にスクロールさせることができます。

3. **「no user registered」と表示されている番号を選択します；ENTER キーを押して選択内容を確定します。**

4. **英数字キーで名称を入力します。**

   Shift キーを押して離せば、文字入力から数字入力に切り替えることができます。新しいユーザー名を確定する場合には、ENTER キーを押します。

5. **Save キーを押せば、次の画面でユーザーを保存することができます。**

ユーザー名を削除する場合には、以下の手順にしたがってください：

1. **User Directory を選択して DELETE キーを押します。**
2. **画面にプロンプトが表示されたら、削除する場合には「Yes」を押し、前の画面に戻りたい場合には「No」を押してください。**

5 Pre-Set Protocol

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムには、*Bio-Rad* の研究者が開発した多数の *Pre-Set Protocol* 一式が備わっています。これらのプロトコールを利用すれば、至適化のための実験をすばやく実行することができます。

pre-set protocol の名称は、以下の原則にしたがって設定されています：それぞれ最初に *3*～*8* 文字の記述子とエレクトロポレーションプレートのタイプ（*12*、*24* または *96-well*）が記載されており、次にフォワードスラッシュと波形のタイプ（*EXP* または *SQR*）が続きます。プロトコール名の末尾には、固有のパラメータ値と略称が表示されます。

本章のリストと表では、プロトコール名とパラメータに対して以下の略語を使用しています：

- 電圧：ボルト（*V*）
- 電流：マイクロファラド（μ*F*）
- 電気抵抗：オーム（Ω）
- 通電時間：ミリ秒（*ms*）
- パルス数：それぞれのパルス数（*NP*）
- パルス間隔：各パルス間の秒数（*s*）
- `Grad`：*gradient*
- `Exp`：減衰波（*exponential wave*）
- `Sqr`：矩形波（*square wave*）

各プロトコールセットに関する詳しい情報は、表 *6*（*29* ページから）に記載されているページ数を参照してください。

表 6. Pre-Set Protocol と使用法の一覧

プロトコール名		ウェル数	どのような場合に使用するか
4 つまたは 6 つのウェルセットを用いたウェルセット用プロトコール（31 ページ）			
1.	*Opt mini 96 well/Sqr.Exp*	*24*	至適な波形と条件をすみやかに決定するために使用する。
2.	*Opt mini 96 well/Sqr*	*24*	矩形波プロトコールにおいて至適条件をすみやかに決定するために使用する。
3.	*Opt mini 96 well/Exp*	*24*	減衰波プロトコールにおいて至適条件をすみやかに決定するために使用する。
4.	*Opt 96 well/Sqr, NP, D*	*16*	特に細胞の生存率を高めて効率を向上させるために、至適な矩形波条件を決定してから使用する。
Whole plate protocols（33 ページ）			
5.	*96 well/Exp*	*96*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
6.	*24 well/Exp*	*24*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
7.	*12 well/Exp*	*12*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
8.	*96 well/Sqr*	*96*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
9.	*24 well/Sqr*	*24*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
10.	*12 well/Sqr*	*12*	多数の細胞タイプに対して、プロトコールの初期設定のために使用する。
Well set protocols（34 ページ）			
11.	*96 well/Exp, Vgrad/Cgrad*	*96*	新しい細胞系を扱い、従来の減衰波を適用する場合に使用する。このプロトコールは、条件を微調整するとともに反復実験が組み込まれている。
12.	*96 well/Sqr, Vgrad/Dgrad*	*96*	新しい細胞系を扱う場合、あるいは矩形波プロトコールを通常適用する場合に使用する。このプロトコールは、条件を微調整するとともに反復実験が組み込まれている

表 6. pre-set protocol と使用法の一覧

プロトコール名		ウェル数	どのような場合に使用するか
Mixed protocols（35 ページ）			
13.	*Opt 96 well/Exp, Sqr*	*96*	参照プロトコールがない細胞系を扱う場合に使用する。このプロトコールには、一連の平均的な開始条件が組み込まれている。
14.	*Opt 24 well/Exp, Sqr*	*24*	参照プロトコールがない細胞系を扱う場合に使用する。このプロトコールには、一連の平均的な開始条件が組み込まれている。
15.	*Opt 12 well/Exp, Sqr*	*12*	参照プロトコールがない細胞系を扱う場合に使用する。このプロトコールには、一連の平均的な開始条件が組み込まれている。
16.	*Uniform 96 well/Exp, Sqr*	*96*	同一の細胞系または異なる細胞系に対するさまざまな分子のエレクトロポレーションを比較するために、一連の規定条件を用いて使用する。
17.	*Uniform 24 well/Exp, Sqr*	*24*	同一の細胞系または異なる細胞系に対するさまざまな分子のエレクトロポレーションを比較するために、一連の規定条件を用いて使用する。
18.	*Uniform 12 well/Exp, Sqr*	*12*	同一の細胞系または異なる細胞系に対するさまざまな分子のエレクトロポレーションを比較するために、一連の規定条件を用いて使用する。
19.	*Mixed 96*	*96*	異なる波形を組み合わせる場合に使用する。減衰波（*250 V／350 µF*）と矩形波（*250 V／20 ms*）とを列ごとに交互に供給することができる。
20.	*Mixed 24*	*24*	異なる波形を組み合わせる場合に使用する。減衰波（*250 V／350 µF*）と矩形波（*250 V／20 ms*）とを列ごとに交互に供給することができる。
21.	*Mixed 12*	*12*	異なる波形を組み合わせる場合に使用する。減衰波（*250 V／350 µF*）と矩形波（*250 V／20 ms*）とを列ごとに交互に供給することができる。

Mini-Optimization Protocols

以下のプリセット・プロトコールでは、エレクトロポレーションプレートの *4* つないし *6* つのウェルセットを使用します：

Opt mini 96 well/Sqr.Exp

表 *7* に、*96* ウェルプレートのウェルセットごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています：

- **ウェルセット ABCD1〜3**：矩形波、*200V*、*2,000* μ*F*、*1,000*Ω および *20ms*
- **ウェルセット ABCD4〜6**：減衰波、*250V*、*350*〜*750* μ*F* および *1000*Ω

表 7. プレート内で異なる Opt.mini 96/Sqr.Exp 条件

	Square wave			**Exponential wave**								
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	*200 V* *2,000 µF* *20 ms*	*250 V* *2,000 µF* *20 ms*	*300 V* *2,000 µF* *20 ms*	*250 V* *350 µF* *1000 Ω*	*250 V* *500 µF* *1000 Ω*	*250 V* *750 µF* *1000 Ω*						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Opt mini 96 well/Sqr

表 *8* に、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています：

- **ウェルセット ABCD1〜3**：矩形波, *200〜300V, 2000 μF, 1000Ω, 20ms*
- **ウェルセット ABCD4〜6**：矩形波, *250V, 2000 μF, 1000Ω, 15〜25ms*

表 8. プレート内で異なる Opt mini 96well/sqr 条件

	Square wave											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	*200 V 20 ms*	*250 V 20 ms*	*300 V 20 ms*	*250 V 15 ms*	*250 V 20 ms*	*250 V 25 ms*						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Opt mini 96 well/Exp

表 *9* に、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています：

- **ウェルセット 1〜3**：減衰波, *200〜300V, 350 μF* および *1,000Ω*
- **ウェルセット 4〜6**：減衰波, *250V, 200〜500 μF, 1000Ω*

表 9. プレート内で異なる Opt mini 96well/exp 条件

	Square wave											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	*200 V 350 μF*	*250 V 350 μF*	*300 V 350 μF*	*250 V 200 μF*	*250 V 350 μF*	*250 V 500 μF*						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Opt 96 well/Sqr, NP, D

表 *10* に、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには *1*～*4* のウェルセットが組み込まれており、以下のパラメータが設定されています：矩形波, *250V, 2,000* μ*F, 1000*Ω, *7*～*20ms* および *1*～*3* パルス（*NP*）

表 10. プレート内で異なる Opt 96well/Sqr, NP, D 条件

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*20 ms 1 NP*	*15 ms 2 NP*	*10 ms 2 NP*	*7 ms 3 NP*								
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Whole Plate Protocols

Whole Plate Protocols は、エレクトロポレーションプレートの全ウェルに対して同一条件を設定します。以下に、各 *whole plate protocols* のプロトコール名と条件の一覧を列挙します：

- **96 wells/Exp**：減衰波, *250V, 350* μ*F* および *1,000*Ω
- **24 wells/Exp**：減衰波, *250V, 350* μ*F* および *1,000*Ω
- **12 well/Exp** ：減衰波, *250V, 350* μ*F* および *1,000*Ω
- **96 well/Sqr** ：矩形波, *250V, 2,000* μ*F, 1,000*Ω および *20ms*
- **24 well/Sqr** ：減衰波, *250V, 2,000* μ*F, 1,000*Ω および *20ms*
- **12 well/Sqr** ：減衰波, *250V, 2,000* μ*F, 1,000*Ω および *20ms*

Well Set Protocols

Well Set protocols には、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが組み込まれています。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています。

96 well/Exp, Vgrad/Cgrad

表 *11* に、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています：

- **ウェルセット ABCD1〜12：**減衰波，電圧勾配（*ΔV*）、*350 µF, 1000*Ω
- **ウェルセット EFGH1〜12：**減衰波，コンデンサー容量勾配（*ΔC*）、*250V, 1000*Ω

表 11. プレート内で異なる 96 well/Exp, Vgrad/Cgrad 条件

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*ΔV (V)*	*100*	*100*	*100*	*200*	*200*	*200*	*300*	*300*	*300*	*400*	*400*	*400*
B													
C													
D													
E	*ΔC (µF)*	*200*	*200*	*200*	*350*	*350*	*350*	*500*	*500*	*500*	*1000*	*1000*	*1000*
F													
G													
H													

96 well/Sqr, Vgrad, Dgrad

表 *12* に、*96* ウェルプレートのウェルセットごとに異なるパラメータを提示します。プロトコールには、以下のウェルセットが組み込まれています：

- **ウェルセット ABCD1〜12：**矩形波，電圧勾配（*ΔV*）、*2000 µF, 1000*Ω*, 20ms*
- **ウェルセット EFGH1〜12：**矩形波，パルス持続時間勾配（*ΔD*）、*250V, 2000 µF, 1000* Ω

表 12. プレート内で異なる 96 well/Sqr, Vgrad/Dgrad 条件

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*ΔV (V)*	*100*	*100*	*100*	*200*	*200*	*200*	*300*	*300*	*300*	*400*	*400*	*400*
B													
C													
D													
E	*ΔD (ms)*	*10*	*10*	*10*	*15*	*15*	*15*	*20*	*20*	*20*	*30*	*30*	*30*
F													
G													
H													

Mixed Protocols

以下のプロトコールには、さまざまなウェルセット、波形およびプレートサイズを用いたプロトコールの組合せが盛り込まれています。

Opt 96 well/Exp, Sqr

表 *13* に、*96* ウェルプレートのウェルセットごとに異なるパラメータを提示します。このプロトコールでは、減衰波と矩形波の開始条件が大幅に異なっています。

表 13. プレート内で異なる Opt 96 well/Exp, Sqr 条件

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXP	A	*150 V 350 µF*	*200 V 350 µF*	*250 V 350 µF*	*300 V 350 µF*	*350 V 350 µF*	*450 V 350 µF*	*250 V 200 µF*	*250 V 250 µF*	*250 V 350 µF*	*250 V 500 µF*	*250 V 750 µF*	*250 V 1000 µF*
	B												
	C												
	D												
SQR	E	*150 V 20 ms*	*200 V 20 ms*	*250 V 20 ms*	*300 V 20 ms*	*350 V 20 ms*	*450 V 20 ms*	*250 V 5 ms*	*250 V 10 ms*	*250 V 15 ms*	*250 V 20 ms*	*250 V 25 ms*	*250 V 30 ms*
	F												
	G												
	H												

Opt 24 well/Exp, Sqr

これらは、*24* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが設定されています。ウェルサイズが大きいという点を除けば、このプロトコールは *35* ページの「*Opt 96 well/Exp, Sqr*」と同一です。

Opt 12 well/Exp, Sqr

表 *14* に、*12* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。このプロトコールでは、ウェルセットに対する減衰波と矩形波の開始条件が大幅に異なっています。

表 14. プレート内で異なる Opt 12 well/Exp, Sqr 条件

	Exponential wave						Square wave					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	*200 V 350 µF*	*300 V 350 µF*	*400 V 350 µF*	*250 V 200 µF*	*250 V 350 µF*	*250 V 500 µF*	*200 V 20 ms*	*250 V 20 ms*	*300 V 20 ms*	*250 V 15 ms*	*250 V 20 ms*	*250 V 25 ms*
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Uniform 96 well/Exp, Sqr

表 *15* に、*96* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータを提示します。このプロトコールでは、ウェルセットに対する減衰波と矩形波の開始条件が異なっています：

- **ウェルセット ABCD1〜6 および EFHG1〜6** ：減衰波, *250V, 350 µF, 1000Ω*
- **ウェルセット ABCD7〜12 および EFHG7〜12**：矩形波, *250V, 20ms, 1000 µF, 1000 Ω*

表 15. プレート内で異なる Uniform 96 well/Exp 条件

	Exponential wave						Square wave					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	*250 V 350 µF*						*250 V 20ms*					
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Uniform 24 well/Exp, Sqr

これらは、*24* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが設定されています。ウェルサイズが大きいという点を除けば、このプロトコールは *36* ページの「*Uniform 96 well/Exp, Sqr*」と同一です。

Uniform 12 well/Exp, Sqr

これらは、*12* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが設定されています。ウェルサイズが大きいという点を除けば、このプロトコールは *36* ページの「*Uniform 96 well/Exp, Sqr*」と同一です。

Mixed 96 well/Exp, Sqr

表 *16* に、*96* ウェルプレートのウェルセットごとに異なるパラメータを提示します。このプロトコールでは、ウェルセットに対する減衰波と矩形波の開始条件が大幅に異なっており、減衰波（*250V, 350 μF*）と矩形波（*250V, 20ms*）とが列ごとに交互に設定されています。

表 16. プレート内で異なる Mixed 96 well/Exp, Sqr 条件

	Exp	Sqr	Exp	Sqr	Exp	Sqr	Exp	Sqr	Exp	Sqr	Exp	Sqr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*250 V 350 μF*	*250 V 20ms*	*250 V 350 μF*	*250 V 20 ms*	*250 V 350 μF*	*250 V 20 ms*	*250 V 350 μF*	*250 V 20 ms*	*250 V 350 μF*	*250 V 20 ms*	*250 V 350 μF*	*250 V 20 ms*
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Mixed 24 well/Exp, Sqr

これらは、*24* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが設定されています。ウェルサイズが大きいという点を除けば、このプロトコールは *37* ページの「*Mixed 96 well/Exp, Sqr*」と同一です。

Mixed 12 well/Exp, Sqr

これらは、*12* ウェルプレートのウェルごとに異なるパラメータが設定されています。ウェルサイズが大きいという点を除けば、このプロトコールは *37* ページの「*Mixed 96 well/Exp, Sqr*」と同一です。

6 エレクトロポレーションに影響を与える要因

Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムは、エレクトロポレーション実験を成功に導く手助けをしてくれます。エレクトロポレーション実験の設計に役立つ情報については、本章の各セクションをお読みください：

- エレクトロポレーションに影響を与える要因（*38* ページ）
- エレクトロポレーションの原理（*42* ページ）

エレクトロポレーションに影響を与える要因

今まで扱っていない細胞系のエレクトロポレーションを検討する場合、弊社では一般にさまざまなリファレンスからプロトコールを吟味して、コンセンサスの得られた開始プロトコールを作成するよう推奨しています。扱おうとしている細胞系にリファレンスがない場合には、出発点としてよく似た細胞タイプのリファレンスをご利用いただくようお奨めします。もう一つの選択枝として、*Opt mini 96-well/Sqr, Exp* プリセット・プロトコール（*34* ページ）を選択して初期条件を確認し、諸条件を微調整するという方法もあります。

以下のセクションでは、エレクトロポレーション実験がうまくいくかどうかに影響を与える種々の要因を考察します：

- 波形（*38* ページ）
- タイムコンスタントとパルス数（*39* ページ）
- 細胞増殖（*39* ページ）
- 核酸と生体分子（*39* ページ）
- エレクトロポレーションバッファー（*40* ページ）
- 温度（*41* ページ）

波形

現在、エレクトロポレーションで最もよく使用されている *2* 種類の波形は、矩形波と減衰波です。矩形波は、蓄電された電気エネルギーがある一定の設定時間のあいだ細胞に適用されるという原理を拠り所としています。減衰波の場合はコンデンサーに蓄電され、サンプルに供給される際に供給電圧が指数関数的に減少します。電圧が初期電圧の約 *37*%に減少するまでの時間はタイムコンスタントとして知られており、(*RxC*) に等しくなります。この式で、*R* はサンプルおよびシステムの抵抗値、*C* は本機器のコンデンサー容量を示しています。

タイムコンスタントとパルス数

矩形波ではタイムコンスタントが報告されませんが、その代わりにパルスの持続時間（またはパルス幅）によって決定されます。パルスの持続時間（またはパルス幅）とは、使用機器にプログラミングされるミリ秒単位の時間です。矩形波によるエレクトロポレーションを至適化する場合、パルス持続時間を短縮ないし延長することが可能です。一般に、小刻みな増加単位が設けられています。オリジナルパルスの持続時間を *5* ミリ秒増減させてテストするとよいでしょう。また、矩形波を用いるエレクトロポレーションで、複数の短いパルスが細胞に有利に作用する可能性があることが観察されています。たとえば、至適なパルス持続時間が *20* ミリ秒である場合、パルスを *10* ミリ秒ずつ *2* 回供給すれば、さらに至適化することが可能であると考えられます。

減衰波のタイムコンスタントは、サンプル抵抗値のほか、エレクトロポレーターで使用する抵抗値設定およびエレクトロポレーターのコンデンサー容量設定と直接関連しています。サンプルの抵抗値は、サンプル容量の変化によって影響を受ける可能性があるだけでなく、使用するエレクトロポレーションバッファーのイオン強度が高い場合や低い場合にも影響を受ける可能性があります。サンプル容量の減少にほぼ比例してサンプル抵抗値が増加するため、タイムコンスタントも長くなります。

細胞増殖

哺乳類細胞の場合、対数増殖期中期にある細胞を用いると、エレクトロポレーション後にきわめて高い遺伝子発現率が得られます（*Anderson* ら*, 1991*）。状態の良い細胞は、維持管理が不良な細胞よりも容易にトランスフェクトできます。過密状態や不健康な状態に達する前に細胞をルーチンに継代培養すれば、連続継代細胞系における実験のばらつきを最小限に抑えることができます。細胞は培養中に徐々に変化する可能性があるため、規定された継代数の範囲内で細胞を使用するとともに、細胞の平板培養とトランスフェクションとの間隔に関するパラメータを含めた厳密なプロトコールを遵守すれば、実験の再現性を向上させることができます。また、細胞を健康な状態に維持し、マイコプラズマのコンタミネーションを防止することも重要です。

増殖定常期ではなく、活発に増殖と分裂を繰り返している細胞を使用すれば、エレクトロポレーション後にきわめて高い遺伝子発現率が得られます。最適な状態で細胞を回収するためには、各ウェルの細胞密度が 10^6〜10^7 *cell/mL* に収まるようにしてください。これよりも細胞密度が高いと、好ましくない細胞融合が生じる可能性があります。

核酸と生体分子

エレクトロポレーションのトランスフェクション効率は、使用する分子の濃度、純度およびサイズによって影響を受ける可能性があります。

エレクトロポレーションを行う場合、プラスミド *DNA* や *siRNA* を細胞に導入することがほとんどですが、*RNA*、タンパク質、炭水化物のほか、ヌクレオシド三リン酸や蛍光物質などの低分子など、ほぼすべてのタイプの分子をエレクトロポレーションによって細胞に導入することができます。

DNA

わずかな例外を除き、自律的に複製するプラスミドを導入する場合、スーパーコイル状のプラスミドをエレクトロポレーションで導入すれば、きわめて高いトランスフォーメーション効率を得ることができます。ただし、哺乳類細胞の安定形質転換細胞を単離する場合など、エレクトロポレーションで導入したプラスミドを宿主ゲノムに組み込む場合には通常、直鎖状のプラスミドを使用するのが最も効率的です（*Barsoum 1995*）。また、サケ精子 *DNA* やプラスミドなどの担体を加えると、一部の細胞系で遺伝子発現が増加することも確認されています（*Chu* ら *1987*；*Showe* ら *1990*）。

ほとんどの細胞タイプのトランスフォーメーションは、さまざまな手法で単離したプラスミド *DNA* を使用して行われていますが、サンプルの純度はトランスフォーメーション効率に影響を与えます。精製されたプラスミド *DNA* ではなく未精製のプラスミド *DNA* を用いると、トランスフォーメーション効率が著しく低下します。シリカマトリックスを使用して生成したプラスミドは、哺乳類細胞のトランスフォーメーション用に塩化セシウム（*CsCl*）法で精製されたプラスミドと同等の効率を有しています。ただし、エレクトロポレーションに使用するプラスミドが同一の手順ですべて調製されていても、導入しようとしている遺伝子の転写や翻訳の差によって発現レベルが異なります。プラスミド *DNA* を用いるエレクトロポレーションの濃度範囲は一般に *5〜40* μ*g/mL* であり、使用する細胞タイプによって異なります。

siRNA

siRNA の品質は、*siRNA* トランスフェクションと *RNAi* 実験の結果に著しい影響を与えます。*siRNA* は、合成時の余分な試薬が含まない状態でなければなりません。また、約 *30 bp* を超える *dsRNA* の混入が細胞毒性の原因になります。さらに、精製度の高い *siRNA* を使用すれば、好ましくないオフターゲット効果を回避することができます。

至適な *siRNA* 濃度とその遺伝子サイレンシング能は、*mRNA* の局在、安定性および豊富さを含めた標的遺伝子の特性や標的タンパク質の安定性と豊富さによって部分的に影響を受けます。エレクトロポレーションできわめて多量の *siRNA* を使用する場合、毒性が生じる可能性があります。逆に、トランスフェクトする *siRNA* があまりにも少ないと、標的遺伝子の発現が抑制されて検出できない場合があります。制限範囲内で *siRNA* 量を変化させることにより、経験に基づいて至適量を決定しなければなりません。弊社では、*10〜100 nM* の濃度で *siRNA* を使用するよう推奨しています。

siRNA を用いる実験は主として不死化した細胞系に限定されていますが、その理由は、これらの細胞の増殖、維持およびトランスフェクトが比較的容易だからです。ただし、不死化した細胞系よりも *in vivo* 細胞によく類似しているという理由から、多くの場合、初代培養細胞は遺伝子機能の研究に適したモデルです。エレクトロポレーションは、初代培養細胞に *siRNA* を直接導入するための効率のよい手法の一つです。

siRNA オリゴヌクレオチド調製物に含まれる不純物は、*siRNA* の力価と導入効率を低下させ、遺伝子サイレンシング実験での毒性リスクを増加させる可能性があります。高品質の二本鎖 *siRNA* である *siLentMer*™ *Dicer-Substrate siRNA duplexes* を使用すれば、遺伝子サイレンシング実験の成功率と再現性の向上につながります。

エレクトロポレーションバッファー

エレクトロポレーションメディウムは、さまざまな点で細胞の生存性とトランスフェクション効率に影響を与えます。エレクトロポレーションバッファーの浸透バランス、塩の選択および特異的イオンの必要性はすべて、エレクトロポレーションにおいて何らかの役割を果たします。一般に、*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファーのような、天然の細胞質組成によく似たメディウムが推奨されます。

エレクトロポレーションで哺乳類細胞に使用するバッファーは、タイムコンスタントに直接影響を与えます。これは、サンプル抵抗値（*R*）が主にバッファーのイオン強度に左右されるためです。また、バッファーの組成成分も、トランスフェクション効率と細胞の生存性に影響を与えます。従来より、大コンデンサー容量で哺乳類細胞のエレクトロポレーションを行う場合には、*PBS* などのイオン強度の高い（抵抗の低い）バッファーが用いられます。このほかにも、エレクトロポレーションでは無血清増殖培地もルーチンに使用されています。エレクトロポレーションウェルの液量／バッファー量はサンプルの抵抗値に大きな影響を与え、使用するバッファー量と反比例します。

Gene Pulser エレクトロポレーションバッファーは汎用性が高く、初代培養細胞を含む大半の細胞系に使用することができます。このバッファーは、*siRNA* とプラスミド *DNA* の双方をうまく処理することができ、トランスフェクション効率を高めて細胞全体の健康状態と生存性を維持できる成分を含んでいます。

Gene Pulser エレクトロポレーションバッファーは *PBS* よりもイオン強度が低いため（抵抗値が高い）、従来の抵抗の低いバッファーを使用するプロトコールから別のプロトコールに移行する場合には調整を行う必要があります。至適化を行うための出発点として、規定されているコンデンサー容量を *50*%減少させることをお奨めします。もう一つの選択肢として、その他のパラメータ定数をすべて維持したまま、エレクトロポレーターの抵抗値設定をオリジナルプロトコールの *20*%に減少させるという方法もあります。

温度

ある種の細胞タイプを用いてエレクトロポレーションを行う場合、*0*～*4*℃で高い効率が得られると報告されている場合もあれば、室温でよりよい結果が得られる場合もあります。温度は細胞膜の物理学的特性に影響を与えると考えられるほか、膜の透過性が高い状態が持続されている時間にも影響を及ぼします。低温が維持されれば、エレクトロポレーション後の細胞は数時間にわたり透過できる状態になります。*0*℃で細胞を維持すると透過性が失われにくくなりますが、*0*℃でエレクトロポレーションを行った細胞をその後 *37*℃でインキュベートすると、ほんの数分以内に透過性が失われます。

以下のさまざまな理由から、エレクトロポレーション実行中に細胞を維持する温度は、エレクトロポレーション処理効率に対して何らかの役割を果たすと考えられます：

- 細胞に電気パルスを与えると発熱するため、パルス供給中に細胞を低温で維持すれば加熱を抑えることができ、結果的に細胞の生存性が増加すると考えられます。
- エレクトロポレーションによって細胞膜に一時的に孔が形成されるため、パルス供給後に低温で細胞を維持すれば、穿孔が形成されたままの状態を延長することができ、長時間にわたってメディウム中の *DNA* を細胞に移入させることができるようになります。また、温度が高ければ、穿孔の閉鎖速度が増し、細胞の生存性が高まります。
- 溶液の温度が変わると伝導率が変化します。温度上昇とともにメディウムの伝導率が増加するため、メディウム抵抗の減少とタイムコンスタントの低下がもたらされます。
- 拡散速度は温度によって大きく左右されるため、細胞を低温に保てば、分子が細胞膜を透過して拡散するのを抑えることができると考えられます。実際には、エレクトロポレーションを行う細胞に最も有効な温度は、経験に基づいて決定しなければなりません。

ほとんどの哺乳類細胞は、パルスの供給前と供給後に室温で細胞を維持すると最も効率よくエレクトロポレーションを行うことができますが（*Chu* ら *1987*）、ある種の細胞タイプは低温で効率よく形質転換させることができます（*Potter* ら *1984*）。

> 備考：　*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファーを使用する場合には、室温でエレクトロポレーションを行ってください。

エレクトロポレーションの原理

エレクトロポレーションは、細胞が高電圧の電場に曝露されることにより細胞膜が一時的に再構成される物理学的なプロセスです。これによって細胞の透過性が高まり、周囲環境から核酸、タンパク質、炭水化物および低分子などの溶質を取り込むことができます。エレクトロポレーションの過程で細胞の透過性が増す理由を明らかにするために多数の研究が行われてきましたが､膜が変化するという見解は未だに仮説にとどまっています（*Chang* ら *1992*）。

エレクトロポレーションによって細胞に与えられる変化を表示する機器パラメータは二つあります。このうちの一つは電場強度 *E* で、*V/cm* と表し、エレクトロポレーションチャンバー（プレートチャンバー）の電気環境を表します。エレクトロポレーションで使用する標準的な電極は、一定距離 *d*（*cm*）を隔てた *2* 本の並行な極板で構成されています；したがって *E=V/d* という式で表すことができます。この式で、*V* は適用される電圧値、*d* は電極間の距離になります。実際には、機器の電圧値を変更したり電極間距離を変化させることによって、電場強度を操作します。細胞質の電気伝導力は細胞膜よりも大幅に高いため、電場に細胞を置けば、細胞膜に電圧電位が生じます。電場強度が増加すると細胞膜内外の電圧差が高まり、脂質二重層が破壊されて膜に孔が形成される確度が増大するため、分子が細胞外から細胞内に移行できるようになります（*Hui 1995*；*Neumann* ら *2000*）。

細胞膜に影響を与えるもう一つのパラメータは、電場に曝露される時間の長さです。減衰波の場合、機器のコンデンサー容量と回路内の抵抗値によって制御されます。矩形波の場合、パルス幅は細胞が電場に曝露される時間の設定によって直接制御されます。これらの各パルスについては、以下で考察します。

Gene Pulser MXcell システムは *1* 枚のプレートに設けられた *24* ウェルセットに対して異なるプロトコールを適用することができ、かつ減衰波と矩形波（*42* ページ）の双方を供給できる唯一のエレクトロポレーション装置す。本システムは、パルス発生装置（パワーモジュール）、プレートチャンバーおよび電極が内蔵されたエレクトロポレーションプレートで構成されています（*5* ページ）。*Gene Pulser MXcell* システムの *PULSE* ボタンを作動させると、ユニットのコンデンサーが高電圧になります。次に、本システムのコンデンサーからエレクトロポレーションプレートのサンプルに電流が流れます。充電されたコンデンサーからサンプルに放電され、減衰波か矩形波のいずれか一方が発生します。

減衰波（Exponential Decay Pulse）

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムの減衰波回路は、コンデンサーの放電によって電気パルスを発生させます。コンデンサーからサンプルに放電されると、電極の電圧が最高電圧にまですみやかに上昇した後、時間 *t* の経過とともに下降し、次式にしたがって減衰波（*44* ページの図 *11*）が供給されます：

$$V_t = V_0^{[e-(t/RC)]}$$

この式で、V_0 はコンデンサーの初期電圧、V_t はパルス供給後の *t* 時点（ミリ秒）における電圧、*e* は自然対数の底、*R* は回路の抵抗値（Ω）、*C* はコンデンサー容量（*μF*）を示しています。初期電圧が V_0/e にまで低下するのに要する時間はタイムコンスタント T と呼ばれており、便宜的にパルス幅（ミリ秒）で表します。$t = T = R \times C$ の場合、電圧は初期値 V_0 の *1/e*（約 *37*%）にまで低下しています（$V_T = V_0 / e$）。

本機器のコンデンサーや回路の抵抗値を変化させると、タイムコンスタントがすみやかに変化します。並列接続した抵抗器の場合、次式から回路全体の抵抗値を求めることができます：

$$R_T = (R_{sample} * R_{PC}) / (R_{sample} + R_{PC})$$

サンプル抵抗値が *PC* モジュールの並列抵抗器よりもきわめて大きい場合には（$R_{sample} >> R_{PC}$）、後者が回路の抵抗値を主に決定づけることになり、$R_T \cong R_{PC}$ という式で表

すことができます。したがって、並列抵抗によって回路の抵抗値が低下するため、結果として回路のタイムコンスタントが減少します。

抵抗の低いメディウム（*PBS* やほとんどの哺乳類細胞に使用される増殖培地などのイオン強度の高いメディウムなど）を使用する場合、*Gene Pulser MXcell* システムの適切なコンデンサーを選択すれば、タイムコンスタントを容易に操作することができます。また、キュベット内の低抵抗メディウムの容量を変更すれば、回路の抵抗値が変化します（抵抗値は容量に反比例します）。

矩形波（Square Wave Pulse）

コンデンサーからサンプルに放電されたパルスをトランケーションすることにより、矩形波が発生します。理想的な矩形波は、パルス開始時と終了時に同じ電圧がかかります（*44* ページの図 *11*）。ただし、（市販されているすべてのエレクトロポレーション装置がそうであるように）充電されたコンデンサーを使用して矩形波を発生させる場合、パルス終了時の電圧 V_t はパルス開始時の電圧 V_0 よりも常に低くなります。これは、スイッチを入れて充電されたコンデンサーの両端をつなぐと、瞬時に最大電流が回路を流れ、次第にゼロに近づくためです。矩形波を発生させるためには、コンデンサー放電後のある時点 *t* でパルスを中断します。この時間（*t*）をパルス幅と呼びます。パルス幅が長いほど、パルス開始時と終了時の電圧差が大きくなります。この電圧の減衰は、次式から求めることができます：

$$ln\ (V_0 / V_t) = t / (RC)$$

矩形波に伴う電圧の低下は、機器のコンデンサー容量およびサンプルの抵抗値と逆相関します。パルス終了時の電圧の低下は *droop* と呼ばれています。このパルス終了時の電圧低下量は、次式から求めることができます：

パルス終了時の電圧低下量（*% droop*）$= (V_0 - V_t) / V_0$

上の二つの式を一つにまとめると、以下の式が得られます：

$$ln\ [1 / (1 - \%\ droop)] = t / (RC)$$

パルスを正しい矩形波にできる限り近づけるためには、*droop* を最小限に抑えなければなりません（$V_t = V_0$ および $V_0 - V_t = 0$ になるようにする）。実験では、*R* と *C* に最も高い数値を指定することによって達成されています。任意のサンプルでは、*R* が定数になると考えられます。また、選択したそれぞれのプロトコールでは、*C* も定数になると考えられます。このため、同一サンプルの場合、パルス幅が増加すれば *droop* も増加します。ただし、どのような任意のパルス幅であっても、サンプルの抵抗値が増加すれば *droop* は低下します。サンプル抵抗値の増加は、以下の条件によって達成することができます：

- サンプルの温度を低下させる。
- 溶液のイオン濃度を低下させる。
- 抵抗の低いメディウムの場合、エレクトロポレーションキュベットの液量を減少させる。

表 *17* に、*Gene Pulser MXcell* システムの高電圧域および低電圧域において、パルス幅とさまざまなサンプル抵抗値とを組み合わせた場合のパルス終了時の電圧低下量（% *droop*）を列挙します。たとえば、低電圧域で抵抗値 *200*Ω のサンプルにパルス幅 *33.4* ミリ秒でパルスを供給する場合、パルス終了時の電圧低下量は *5*%になります。

表 17. パルス幅別にみたパルス終了時の電圧低下量（% droop）

低電圧回路			
パルス終了時の 電圧低下量 （% *droop*）	*5*	*10*	*20*
サンプル			
抵抗（Ω）		パルス幅（*ms*）	
20	*3.34*	*7.14*	*14.6*
200	*33.4*	*71.4*	*146*
1000	*167*	*357*	*730*
3500	*585*	*1249*	*2556*

図 *11* に、コンデンサー放電による減衰波形を示しました。初期電圧 V_0 まで充電されたコンデンサーが細胞に放電される際、細胞にかかる電圧は指数関数曲線を描いて時間の経過とともに低下するため、任意時点 *t* における電圧 *V* は、$V=V_0e^{-(t/RC)}$ という式から求めることができます。*t=CR* という特殊な場合には V_0/e になり、*CR* の数値は電圧減衰のタイムコンスタントとして知られています。タイムコンスタントが短いほど減衰が速くなります。

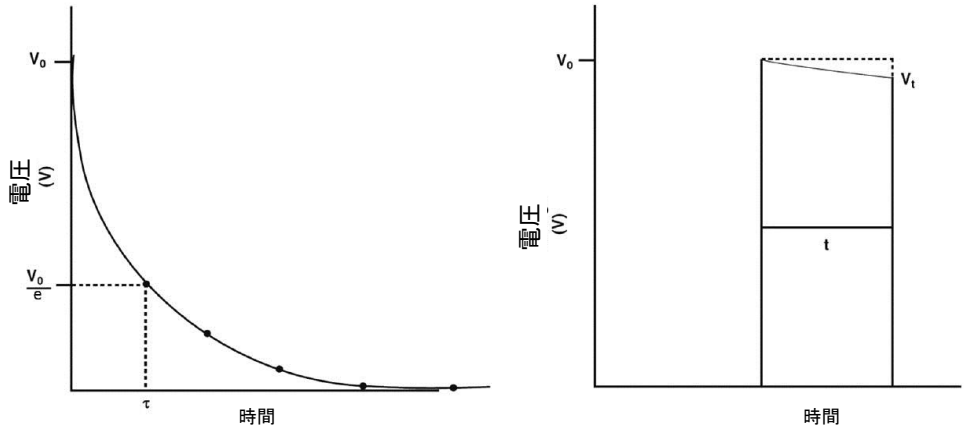


図 11. 減衰波（exponential decay pulse）と矩形波（square wave pulse）

また、図 *11* にコンデンサー放電による矩形波も示しました。パルス幅は、細胞に放電される時間です。減衰波と同様に、矩形波の場合もパルス供給中に電圧が再度指数関数的に減衰するため、パルス終了時には開始時よりも電圧が低くなります。この電圧の低下はパルスの「*droop*」と呼ばれており、初期電圧に対するパーセンテージとして測定します。

抵抗器のパルス変調

Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムは、並列抵抗を制御するための新しい機構を採用しています。この新機構には *Gene Pulser Xcell PC* モジュールに備わっている機能が搭載されていますが、*Gene Pulser MXcell* パワーモジュールではさらに小さなスペースに収められています。この新機構（*"resistor pulse modulation"*を略して *RPM* と呼ばれています）は、並列抵抗が *Gene Pulser MXcell* システムの出力端子に接続される時間を高頻度に変化させます。この接続時間のデューティサイクルを変更することにより、並列抵抗の有効値を変更することができます。選択された抵抗器は、結果的にパルス変調した抵抗値として平均化されます。このアプローチは、ごく少数のコンポーネントのみを必要とし、使用スペースも小さく、幅広い抵抗域（*50*〜*1,500*Ω）を得ることができ、*Gene Pulser MXcell* システムのフレキシビリティを高めることができます。

付録 A：Pulse Trac™ システム

最適な細胞のトランスフォーメーションを可能にする最も正確な減衰波を発生させるため、*Gene Pulser MXcell*™ エレクトロポレーションシステムでは *Pulse Trac* 波形供給システムを採用しています。*Pulse Trac* は、サンプルに実際に供給されるパルスに基づいて、タイムコンスタントと各パルスの振幅を正確に算出します。さらに重要なことは、*Pulse Trac* システムがサンプル抵抗値の差によって生じる振幅の変化を補正し、低電圧コンデンサーの精度を高めるという点です。このシステムには、以下の機能が備わっています：

- サンプルの伝導率測定とパルス出力の統合により、抵抗値 *10*〜*1000*Ω のサンプルに対して正しい波形を供給することができます。
- 内部キャリブレーションと回路モニタリングプログラムにより、ユニットの耐用期間を通じて正確なパルスを供給することができます。
- タイムコンスタントと電圧振幅の測定により、パルス供給を検証することができます。

Gene Pulser MXcell システムの起動と同時に、*Pulse Trac* テストアルゴリズムが作動します。

Pulse Trac システムの解説

Pulse Trac システムは、電流を制限するために使用するシステムの内部抵抗やウェル内のサンプル抵抗値をモニタリングし、調整を行います。サンプルの抵抗値は、伝導率、ウェルの電極間距離およびウェル内のメディウム量によって左右されます。*Pulse Trac* 回路はサンプルの抵抗値をモニタリングし、サンプルの容量や伝導率にかかわらず適切な電圧を供給します。*Pulse Trac* システムでエレクトロポレーションを至適化すると、高い精度で電気変数が制御されるため、実験デザインの生物学的変数のみが結果に反映されます。この *Pulse Trac* 診断アルゴリズムは電気回路全体を検査し、最も正確で再現性のあるパルスを供給できる適切なコンデンサーの組合せを電子制御によって選択するため、ユニットの耐用期間を通じて最適な状態で安定したエレクトロポレーションを行うことができます。

Pulse Trac 診断アルゴリズム

Pulse Trac 診断アルゴリズムは、*25*～*2,475* μ*F* の範囲内で *Gene Pulser MXcell* パワーモジュールの最適なコンデンサー回路を検査し、選択決定します。これは、低電圧／大コンデンサー容量の正確なパルス供給に使用される重要なコンデンサーバンクです。診断アルゴリズムによって、すでに厳しく設定されているコンデンサーの許容誤差が *200*～*1,075* μ*F* の範囲内で±*20*%から±*10*%に狭められます（ほかのユニット設計では、コンデンサーに±*40*%ものばらつきが認められる場合があります）。*Gene Pulser MXcell* ユニットの高電圧コンデンサーは診断アルゴリズムが提供する数値と同じ *10*%の許容誤差にあらかじめ設定されているため、この機構には組み込まれていません。

付録 B：トラブルシューティング

トラブルシューティングについては、以下の事項にしたがってください：

1. トランスフェクションまたは細胞の生存性がきわめて不良な場合

- **ウェルセットをチェックしてください。**ウェルセットの全ウェルには、サンプルかサンプルバッファーのいずれかを満たさなければなりません。たとえば、*6* つのウェルに対してエレクトロポレーションを行いたいのであれば、ウェルセットを構成している *4* つのウェル（たとえば *ABCD1*）すべてにサンプルを満たし、次のウェルセットのうち二つのウェル（たとえば *AB2*）にもサンプルを満たします。最後に必ず、二つ目のウェルセットの残り二つのウェル（たとえば *CD2*）にサンプルバッファーを満たしてください。
- **コンデンサー容量をチェックしてください（矩形波プロトコールの場合）。**矩形波には、大きいコンデンサー容量が必要です矩形波プロトコールでトランスフェクションできない場合には、*2000 μF* を使用してください。
- **サンプルの容量をチェックしてください。***96* ウェルプレートに対して下限値の *100 μL* で作業をしている場合には、サンプルの容量を増量してください。サンプルを増量すると、細胞の生存性とトランスフェクション効率が高まる傾向があります。

2. Gene Pulser MXcell™ エレクトロポレーションシステムがストールまたはハング（途中停止や異常停止）する場合

- **サンプルの容量をチェックしてください。**ウェル内の液量が少なすぎると、*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーションシステムはアークを検出することができません。装置がストールするため、レポートを作成することができません。このような場合には、いったんユニットの電源を切ってからもう一度電源を入れ直し、*Gene Pulser MXcell* エレクトロポレーターをリセットしなければなりません。

  備考：　ユニットをリセットする前に、どのウェルセットに対して装置がストールしたのかを確認してください。この確認を行わずに *Gene Pulser MXcell* をリセットすると、データレポートが失われることになります。ストールが生じる前のウェルはいずれも正常なエレクトロポレーションが行われているはずですが、ストール後はすべてのウェルに対して適切なエレクトロポレーションが行われているとは限りません。
- **設定をチェックしてください。**電気的に強い条件を設定すると、アーク放電が生じる可能性が高くなります。たとえば、パルス *3* 回と持続時間（*20ms* 超）という設定などが相当します。

付録 C：引用文献

Anderson, M.L.M., Spandidos, D.A., and Coggins, J.R., Electroporation of lymphoid cells: factors affecting the efficiency of transfection, J. Biochem. Biophys. Meth., 22, 207 (1991)

Barsoum, J., "Stable integration of vectors at high copy number for high-level expression in animal cells," in Methods in Molecular Biology, vol. 48, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 225 (1995)

Change, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (eds.) Guide to Electroporation and Electrofusion, Academic Press, Inc., San Diego (1992)

Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P., Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA, Nuc. Acids Res. 15, 1311 (1987)

Cregg, J.M. and Russell, K.A., "Transformation," in Methods in Molecular Biology, vol. 103, Higgins, D.R. and Cregg, J.M. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, 27 (1998)

Hui, S.W., "Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency," in Methods in Molecular Biology, vol. 48, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 195 (1995)

Neumann, E., Kakorin, S., and Toensing, K., "Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules," in Methods in Molecular Medicine vol 37, Jaroszeski, M.J., Heller, R., and Gilbert, R. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, 1 (2000)

付録 D：仕様と製品情報

以下の表に、操作仕様とカタログ番号を含めた *Gene Pulser MXcell™* エレクトロポレーションシステムの仕様と製品情報を提示します。

製品仕様

表 *18* に、パワーモジュールとプレートチャンバーを含むシステム全体の仕様を列挙します：

表 18. Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムの装置仕様

波形	**減衰波または矩形波**
電圧	*10～500 V*（*2V* 刻み）
コンデンサー容量	*25～2475 μF*（*25 μF* 刻み）
抵抗値（並列）	*50～1,500Ω*（*50Ω* 刻み）+∞
サンプルの抵抗値	最小 *10Ω*（*10～500V*）；*125Ω*（*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファー）
矩形波の時間設定	*10～500V*：パルス幅 *0.05～9999.95* ミリ秒、パルス数 *1～3* 回
	パルス間隔 *0.1～10* 秒

表 *19* に、システム全体の一般仕様を列挙します。

表 19. Gene Pulser MXcell エレクトロポレーションシステムの一般仕様

区分	**仕様**
入力電圧	*100～120 VAC* または *220～240 VAC, 50/60Hz*
消費電力	最大 *240W*（短時間充電の場合）
使用環境	温度 *0～35*℃、湿度 *0～95*%（結露なきこと）
規格	安全性 *EN61010*、*EMC EN61326 Class A*
寸法	パワーモジュール *31x30x14 cm*、重量 *6.62 kg*

製品情報

表 *20* に、本システムと付属品のカタログ番号と内容を列挙します。

表 20. Gene Pulser MXcell システムのカタログ番号

カタログ番号	内容
165-2670JA	*Gene Pulser MXcell* システム 梱包内容：*Gene Pulser MXcell Main Unit*、*Gene Pulser MXcell Plate* チャンバー、*Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *96well 1* 枚、取扱説明書
165-2670JB	*Gene Pulser MXcell* システム *Single Shock Pod* 付 梱包内容：*Gene Pulser MXcell Main Unit*、*Gene Pulser MXcell Plate* チャンバー、*Single Shock Pod* 、*Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *96well 1* 枚、取扱説明書、
165-2671	*'Gene Pulser MXcell Main Unit*
165-2672	*Gene Pulser MXcell Plate* チャンバー
165-2673	*Gene Pulser MXcell* 用 *Single Shock Pod*
165-2681 *165-2681B05*	*Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *96well 1* 枚 *Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *96well 5* 枚
165-2682 *165-2682B05*	*Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *24well 1* 枚 *Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *24well 5* 枚
165-2683 *165-2683B05*	*Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *12well 1* 枚 *Gene Pulser MXcell* 用 エレクトロポレーションプレート *12well 5* 枚
165-2676	*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファー*1.8ml×10*
165-2677	*Gene Pulser* エレクトロポレーションバッファー*30 ml*

バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社

本　　社　〒140-0002　東京都品川区東品川 2-2-24　TEL 03-6361-7000　FAX 03-5463-8480
大阪営業所　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11　TEL 06-6308-6568　FAX 06-6308-3064
福岡営業所　〒812-0093　福岡市博多区博多駅東 2-5-28　TEL 092-475-4856　FAX 092-475-4858

＊学術および修理・メンテナンスのお問い合わせは　TEL 03-6404-0331 FAX 03-6404-0334
E-Mail : Life_ps_jp@bio-rad.com

MNL1652670 B