

膜融合 (Membrane Fusion) は、哺乳類細胞の中にさまざまな分子や粒子を導入する新しい非常に優れた方法であり、機能研究や治療的アプローチのための強力な戦略になります。特別なリポソーム担体が物理化学的な原理によって、細胞の形質膜に結合し、速やかに融合することができます。

このメカニズムを効率よく利用したのが本製品 Fuse-It であり、哺乳類細胞の表面に接触するとすぐに融合します。したがって、この新しい技術は、エンドサイトーシスやピノサイトーシス、特別な受容体への結合といった生理的プロセスとは異なる経路で分子を導入します。

概要

Fuse-It-Color は、広範囲の哺乳類細胞で、数分以内に、安定、かつ生理活性を保った状態で細胞膜を蛍光ラベルするために、独自に開発した試薬です。本試薬は、浮遊細胞のみならず、接着細胞にも使用でき、細胞培養液の状態を選びません。加えて、ラベリングは少なくとも 24 時間は安定なので、融合後すぐに、細胞を次の解析に使用できます。

仕様

組成	独自開発の脂質
濃度	3 mM
輸送温度	室温
保存温度	-20℃
使用期限	バイアルに記載

蛍光特性

Ex.max/Em.max (最大励起波長/最大蛍光波長)	Fuse-It ^{green} (緑)	484 / 501nm
	Fuse-It ^{red} (赤)	549 / 565nm
	Fuse-It ^{drad} (暗赤)	644 / 665nm
	Fuse-It ^{IR} (赤外)	750 / 780nm

その他必要なもの

超音波水槽 (周波数 35kHz、出力 100 ~ 800W、~ 20 分間)
の設定が可能なもの

重要なガイドライン

- Fuse-It-Color は低張バッファー (20 mM HEPES, pH7.4) に溶解してあります。開封後は、本試薬自体は 4℃で 2 ヶ月間、-20℃で 6 ヶ月間安定です。凍結融解の繰り返しを避けるために、本試薬を分注して凍結して下さい。
- 初めての融合実験の際には、最適な融合効率の条件を決めるために、試薬の細胞との反応時間と濃度を検討することを推奨します。
- 融合効率は、融合後に直接、確認することができます。また、適切な高感度カメラと検出器を使用すればフローサイトメトリーで確認できます (詳細は仕様をお読み下さい)。
- 最高のイメージングの結果を得るためには、高品質で薄底の細胞培養器具をお使い下さい (例えば、当社 (ibidi 社) の μ -Slide (マイクロスライド) や μ -Dish (マイクロディッシュ))。

⚠ 注意点

Fuse-It-Colorは、迅速かつ高い効果を持つ生細胞染色試薬です。反応時間は数分と短いですが、十分に高い効果を得られませんが、したがって反応時間を長くしても融合効率を向上させることはなく、むしろ細胞に悪影響を及ぼすことがありますので注意下さい。

プロトコール

本プロトコールは、1枚の μ -Dish^{35mm, high} (高ウェル壁) (培養量1 ml, 培養エリア3.5 cm²) での細胞との融合のプロトコールです。

接着細胞の準備

融合の前日に、1枚の μ -Dish (培養液1 ml) に50~90%の細胞密度になるように細胞をまいて下さい。

接着細胞との融合

追加事項

トリプシン処理をした細胞を、浮遊細胞との融合プロトコールを用いて使用することも出来ます。

1. Fuse-It-Colorを、通常の超音波水槽 (周波数35kHz, 出力100 ~ 800Wの範囲で設定) で、室温かそれ以下の温度で10~20分間ソニケーションして下さい。

⚠ 注意点

ソニケーションの間は常にウォーターバスの温度が25℃以下を保つようにして下さい! 必要に応じて氷を加えて下さい。

2. 1の膜融合混合液5 μ l* を500 μ lの1×PBSに添加し、30秒間ボルテックスして下さい。

⚠ 注意点

すべての器具類と溶液が室温以下を保つようにして下さい。

3. 2の希釈液を、通常の超音波水槽 (周波数35kHz, 出力100 ~ 800Wの範囲で設定) で、室温かそれ以下の温度で5分間ソニケーションして下さい。

⚠ 注意点

ソニケーションの間は常にウォーターバスの温度が25℃以下を保つようにして下さい! 必要に応じて氷を加えて下さい。

4. 細胞の培養液を 3 の希釈した膜融合混合液に交換して下さい。
5. 37℃で2分間*反応させて下さい。
6. 膜融合混合液を新しい細胞培養液に交換し、融合を止めてください。
7. 融合後、細胞はすぐに次の実験に使用できます。

*融合プロセスの最適化については、4ページをお読みください。

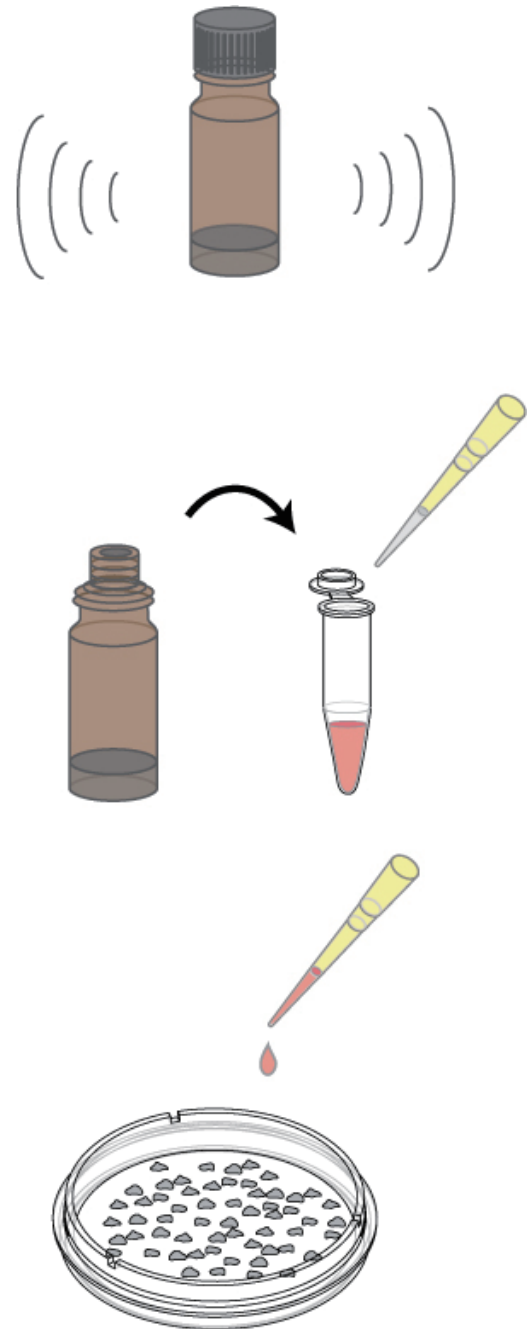


図 1 : Fuse-It-Color システムを接着細胞に使用

浮遊細胞の準備

融合当日に $1 \sim 3 \times 10^5$ 細胞数/ml (1枚の μ -Dishあたり) の細胞を準備して下さい (1回の融合につき、細胞数は 6×10^6 まで増やすことができます)。

浮遊細胞との融合

1. Fuse-It-Colorを、通常の超音波水槽 (周波数35kHz、出力100～800Wの範囲で設定) で、室温かそれ以下の温度で10～20分間ソニケーションして下さい。

⚠ 注意点

ソニケーションの間は常にウォーターバスの温度が25℃以下を保つようにして下さい! 必要に応じて氷を加えて下さい。

2. 1の膜融合混合液5 μ l* を500 μ lの1×PBSに添加し、30秒間ボルテックスして下さい。

⚠ 注意点

すべての器具類と溶液が室温以下を保つようにして下さい。

3. その希釈液を、通常の超音波水槽 (周波数35kHz、出力100～800Wの範囲で設定) で、室温かそれ以下の温度で5分間ソニケーションして下さい。

⚠ 注意点

ソニケーションの間は常にウォーターバスの温度が25℃以下を保つようにして下さい! 必要に応じて氷を加えて下さい。

4. 細胞を遠心して上清を捨てて下さい。

5. 細胞のペレットを3の希釈した膜融合混合液に再懸濁して下さい。

6. 細胞懸濁液を37℃で1～3分間*反応させて下さい。

7. 1 mlの1×PBSを加えて融合を止めてください。

8. 細胞を通常よりも速い速度で遠心して下さい (600～800×g)。

⚠ 注意点

リポソーム融合の影響により、通常の遠心速度では細胞はほとんどが上清に残ってしまいます。

9. 遠心後、1×PBSで細胞を1回洗うか、直接、新しい培養液に懸濁して下さい。

10. 融合後、細胞はすぐに次の実験に使用できます。

*融合プロセスの最適化については、4ページをお読みください。

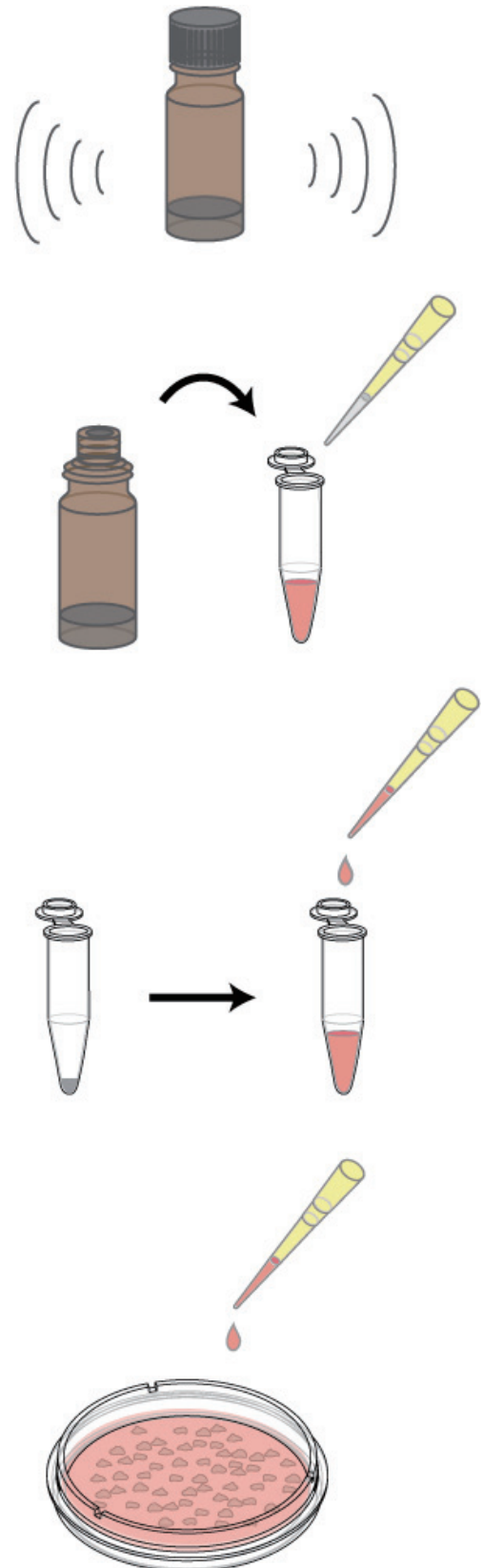


図 2 : Fuse-It-Color システムを浮遊細胞に使用

融合プロセスの最適化

- 細胞の種類によって、結果はある程度変化します。必要に応じて反応時間と膜融合混合液の量をさらに調整して下さい。
 - 500 μ l の 1 \times PBS に希釈する膜融合混合液の量を 5 ~ 10 μ l の間で検討して下さい。
 - 膜融合混合液が細胞と反応する時間を 1 ~ 10 分の間で検討して下さい。
- 反応中に、緩やかに揺らすと融合効率が上がります。
- 膜融合混合液を希釈するのに、1 \times PBS の代わりに細胞培養液を使用することも出来ます。
- 融合中に 37°C の温度であることが非常に重要です。
- 融合が成功するために必要な Fuse-It-Color の量が、細胞の種類と継代数に依存してある程度異なります。
- 高い細胞密度は融合の助けにはなりますが、必須ではありません。
- 細胞の種類によっては、融合後は接着がある程度遅くなる場合があります。必要な場合は、接着細胞用のプロトコルをご使用下さい。

Fuse-It-Color

Cat.No.	ラベル	蛍光 (最大励起波長/最大放出波長)	容量
ib60200	Fuse-It ^{green} (緑)	484/501nm	100 μ l
ib60201	Fuse-It ^{green} (緑)	484/501nm	400 μ l
ib60202	Fuse-It ^{red} (赤)	549/565nm	100 μ l
ib60203	Fuse-It ^{red} (赤)	549/565nm	400 μ l
ib60204	Fuse-It ^{dred} (暗赤)	644/665nm	100 μ l
ib60205	Fuse-It ^{dred} (暗赤)	644/665nm	400 μ l
ib60206	Fuse-It ^{IR} (赤外)	750/780nm	100 μ l
ib60207	Fuse-It ^{IR} (赤外)	750/780nm	400 μ l

μ -Dish^{35mm,high} (マイクロディッシュ、35mm、高ウェル壁)

Cat.No.	処理、コーティング	特徴
ib81156	ibiTreat、組織培養用処理済、滅菌済	親水性、組織培養用処理済
ib81158	ガラス底、滅菌済	ガラスカバースリップ、No. 1.5H

研究目的のみにご使用下さい



禁転載。ここに記載されている商標はbeniag有限会社が権利を所有しています。ドイツ、チューリッヒ総合研究機構からライセンスを受けています。

お問い合わせ先

日本総代理店



日本ジェネティクス株式会社 <http://www.n-genetics.com>

本社：〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18F Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962
 西日本営業所：〒604-8277 京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィナーネ御池3F Tel. 075 (257) 5421 Fax. 075 (257) 5422