

Neonの使い方

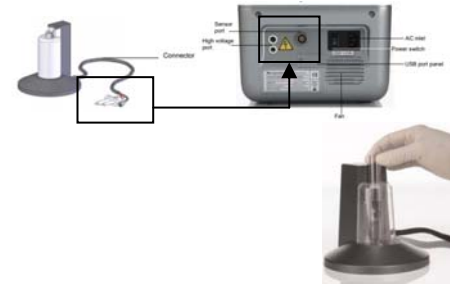
細胞へのダメージを気にする場合、**Rバッファ**溶解後は速やかに導入を実行する必要があります。
また、**比較的高濃度のDNAが必要**になりますので予め手順を確認して準備を進めることをお勧めします。

<培養容器の準備>

血清含有、抗生物質不含の培地を用意する。
表(plating medium)を参考にし、必要量の培地を分注する。
エレクトロポレーションまで37°CのCo2インキュベーター内でインキュベーションしておく。

<Neonの準備>

本体とピペットスタンドを接続する。(コネクタ2つ)
電源コードをさし、背面の電源スイッチを入れる。
立ち上がるまで待つ。
Neonチューブに**3mlのEバッファ**を入れてスタンドにセットする。
(向きを確認してカチっというまで差し込みます)
細胞懸濁液を準備する。



タッチパネルでエレクトロポレーションの電圧、時間、回数を入力する。
Neonピペットにチップを装着する。

(ピペットを強く押すと先の金属部分が開きます。この状態でチップを刺すと中の金属を掴んで引き上げます。引き上げた後、チップ樹脂部分が少し浮き気味なのでラックに押し付けて押し込みます。)

Neonピペットに細胞懸濁液を吸入する。この時、**気泡がないこと**を確認する。
Neonピペットをスタンドにセットし(カチっという音が出るまで差し込む)、Startボタンをタップする。

Completeが表示されたら導入完了です。
ピペット内の細胞懸濁液を**そのまま準備しておいた容器に撒いて**、容器を揺らして攪拌後、培養します。
(エラーが表示される場合はコネクタの接続や気泡が無いかなどをチェックしてください。)

チップは2回まで、チューブは10回まで使用できます。
細胞やDNAが違う場合は必ずチップを交換してください。

条件の入力から繰り返します。



使用が終了したら背面の電源を切ります。

<細胞懸濁液の準備>

70~90%コンフルエントの細胞を用意する。
細胞を回収し、**Ca,Mg不含PBS**で洗い、細胞数を測定する。
表(Cell No.)を参考にし、必要な細胞数分を分注、沈殿させ上清を捨てる。
沈殿した細胞をRバッファに溶解する。
(1Wellあたり10ulのRバッファが必要ですが、余裕を見て12ulくらいに溶かす方がよい)
表(DNA/siRNA)を参考にし、必要量のDNAを細胞懸濁液に溶かす。
この時、**Rバッファの10%を超えないボリュームで添加**する。
ピペティングで混合する。

Format	Cell Type	DNA (µg)	siRNA (nM)	Neon™ Tip	Vol. plating medium	Cell no.	Resuspension Buffer R or T
96-well	Adherent	0.25-0.5	10-200	10 µL	100 µL	1-2 × 10 ⁴	10 µL
	Suspension	0.5-1				2-5 × 10 ⁴	10 µL
48-well	Adherent	0.25-1	10-200	10 µL	250 µL	2.5-5 × 10 ⁴	10 µL
	Suspension	0.5-2				5-12.5 × 10 ⁴	10 µL
24-well	Adherent	0.5-2	10-200	10 µL	500 µL	0.5-1 × 10 ⁵	10 µL
	Suspension	0.5-3				1-2.5 × 10 ⁵	10 µL
12-well	Adherent	0.5-3	10-200	10 µL	1 mL	1-2 × 10 ⁵	10 µL
	Suspension	0.5-3				2-5 × 10 ⁵	10 µL
6-well	Adherent	0.5-3 (10 µL) 5-30 (100 µL)	10-200	10 µL/100 µL	2 mL	2-4 × 10 ⁵	10 µL/100 µL
	Suspension	0.5-3 (10 µL) 5-30 (100 µL)				0.4-1 × 10 ⁶	10 µL/100 µL
60 mm	Adherent	5-30	10-200	100 µL	5 mL	0.5-1 × 10 ⁶	100 µL
	Suspension	5-30				1-2.5 × 10 ⁶	100 µL
10 cm	Adherent	5-30	10-200	100 µL	10 mL	1-2 × 10 ⁶	100 µL
	Suspension	5-30				2-5 × 10 ⁶	100 µL

Recommended buffers

The Neon® Kits contain two Resuspension Buffers. Use the appropriate Resuspension Buffer based on the cell type as below. The cell-specific Neon® transfection protocols available on www.lifetechnologies.com/neon indicate the type of Resuspension buffer for use with each cell type.

Resuspension Buffer R:
Use Resuspension Buffer R with established adherent and suspension cell lines such as 3T3-L1, HEK293, Cos7, C2C12, HeLa, HCT-15, PC-12, MDCK, Raw264.7, U-2OS, CEM, HL-60, K-562, Jurkat, LCL, Ramos, U-937, as well as primary adherent cells such as neuronal cells, stem cells, hepatocytes, HUVEC, macrophage cells, dendritic cells.

Resuspension Buffer T:
Use Resuspension Buffer T with primary blood-derived suspension cells such as T-cells, B-cells, NK cells, PBMC, monocytes.

電圧等の条件はホームページ上で確認できます。
ホームページに無いものは最適化プロトコールに従って最適条件を探ってください。