



PICOSPRITZER® III

*Pressure Systems for Ejection of
Picoliter Volumes in Cell Research*

【問い合わせ先】

クロダニューマティクス株式会社
マーケティング本部
Tel : 045-870-1510
e-mail : sales@kpl.parker.com
<http://www.parkerkuroda.com>



PICOSPRTIZER® III

細胞研究用ピコリットル[pℓ](マイクロ)
インジェクションシステム

操作マニュアル

I. イントロダクション

本製品をご使用になる前に、必ずこの説明書をよく読んでからお使いください。また必要なときに読めるよう大切に保管してください。この説明書は、細胞内または細胞外のインジェクションシステムとしての1チャンネル、2チャンネル、真空ローディングモデルについて記載しています。

ピコスプリッツァⅢは、再現性のある圧力パルスを供給するためのシステムです。また、ラックマウントが可能で、必要な機能がすべて備わっています。インジェクション量は、時間と圧力に比例します。

このシステムは、次の3つの方法で始動することができます。フロントパネルの押ボタン、外部信号(5V)、または押ボタン/フットペダルによる遠隔操作です。ピコスプリッツァⅢは、イオン注入法に伴う神経細胞固有の脱感作を回避する間、細胞内または細胞外の研究に合わせてピコリットル[pℓ]からナノリットル[nℓ]まで迅速、かつ再現性の有る注入を可能にするために設計されました。

細胞内への適応範囲は、小さな細胞(直径50μm)へのRNA(リボ核酸)のフェムトリットル[fℓ]インジェクションから、卵母細胞へのナノリットル[nℓ]のインジェクションまで可能です。細胞外への適応範囲は、細胞内記録中のニューロン上への希薄な向神経活性物質のピコリットル[pℓ]処理からあらゆる動物の化学的刺激の顕在化までこなすことができます。

このシステムは、高速応答バルブと必要な配管部品で構成されています(ピペットとホルダは付属されません)。また、このシステムは19インチラックに適応するように設計されています。ピコスプリッツァⅢは、出荷時に調整を行い、提供しています。次の手順でセットアップしてください。

内容

| | |
|------------------|----|
| イントロダクション | 2 |
| 製品仕様 | 3 |
| 制御及び使用方法 | 4 |
| 製品開発の背景 | 6 |
| ピコスプリッツァⅢ シリーズ形式 | 11 |

コントロールユニットを設置します。実験場所(取付用のVELCROは付属)から0.6m以内の範囲、コントロールユニットから1.8m以内の範囲でバルブボックスを設置してください。

レギュレータの継手はワンタッチ式です。チューブ端は綺麗に切断し、継手の開口部に完全に差し込んでください。O-リングによって、チューブ外径をシールします。継手からチューブを取り外すときは、必ずラインの残圧を排気して、継手のリングを押し込みながら、チューブを引き抜いてください。

フロントパネルのレギュレータからバルブボックスへの配管は、1/8インチ チューブアッセンブリ(長さ:1.8[m])を使用してください。レギュレータの接続はワンタッチ継手で、もう一方のバルブボックスは1/4インチの雄ねじになっています。継手は、必ずフェールタイプを使用してください。

バルブボックスからピペットホルダ(オプション)への接続は1/16インチ チューブアッセンブリ(長さ:0.9[m])を使用してください。

注意:バルブボックスとピペットホルダを接続する1/16インチ テフロンチューブは、緩く弛ませた状態で接続してください。チューブを緩く弛ませ、圧力パルスを吸収、減衰させることが重要です。決してチューブにストレスを与えるような配置にしないでください。

II. 製品仕様

使用圧力範囲

10~100 [PSI] (0.07~0.7 [MPa])
リリーフ式レギュレータ(低圧範囲設定可能)

最大入力圧力

150 [PSI] (1.0 [MPa])
(酸素や可燃性ガスは絶対に使用しないでください。)

パルス持続時間

2~999 [ms] (1[ms]インターバル)
0.1~99.9 [sec]
0.1~99.9 [min]

パルス始動

パネルの押ボタン、外部信号もしくは押ボタン/フットペダルによる遠隔操作

タイムマーク

チャンネル1から5V TTL

50-60 Hz.

電源

AC90~250V、50~60Hz(ユニバーサル電源対応)

III. 制御及び使用方法

電源スイッチをON位置にすると本機が起動し、赤いパイロットランプが点灯します。
インジェクションのために必要な圧力よりも高めのドライガスを供給してください。

ラックマウントパネル右側の圧力制御ノブを時計回りに回すと、インジェクション圧力が増加します(圧力計で確認できます)。本機はリリーフ式レギュレータを採用しているため、圧力制御ノブを反時計回りに回すと、圧力は減少します。

本機の最高使用圧力は、100[PSI](0.67[MPa])です。圧力ゲージが80[PSI](0.55[MPa])を示すように、正面パネルのノブを回してください。次に、圧力供給源を遮断することで、ガス漏を確認できます。もし、徐々に圧力低下がみられる場合、バルブボックスとガス供給源との間から漏れがあります。

漏れの個所は、空気漏れ音(シューという音)を注意深く聞いたり、チューブの接続箇所に石鹼水をつけて泡がでる個所を観察することで判断できます。再現性のある結果を得るために、またガスの不必要な消費を避けるために、システム全体にわたって漏れがない接続を構築することが非常に重要となります。

インジェクション容量は、パルス幅と圧力との一次関数の関係になります(図1、3参照)。パルス幅での設定はダイナミック・レンジが広く、より精密で再現性の高い設定が可能です。日々設定を変更することは比較的少ないかもしれませんが、実験過程でのパルス幅調整は頻繁に行われます。

パルス幅設定

パルス幅は、3桁のデジタルスイッチ及びレンジスイッチ(レンジスイッチの項目を参照)によって設定します。フロントパネルの押ボタン、遠隔操作、または外部信号によって始動します。

この回路には押ボタンの機能を制限する「デバウンス」制御があるため、ボタンを連続的に押しても、1回の操作に対して、1パルスしか出力しません。デバウンスはおよそ200[ms]の間、押ボタンの連続操作を制限します。「Pulse」表示ランプは、パルスが出力されている間点灯します。

ピコスプリッツァは、「Duration」デジタルスイッチの右側にある3位置トグルスイッチによってレンジを制御します。トグルスイッチを上側に設定した場合(「MSEC」)は、2~999[ms]の範囲で選択します。中間位置に設定した場合(「SEC」)は、0.1~99.9[s]の範囲です。下側に設定した場合(「MIN」)は、0.1~99.9[min]の範囲です。

インジケータ

ピコスプリッツァⅢは、LED表示ランプを搭載しており、「ON」は電源の表示ランプです。「Pulse」表示ランプは、タイマーが作動していることを示しており、チャンネル1とチャンネル2の表示ランプは、それぞれのチャンネルが作動していることを示します。

入力トリガ

ピコスプリッツァは、外部信号からのトリガ入力を可能にするBNC端子を備えています。押ボタン操作と同様に、BNC端子への外部信号(+5V立上り電圧)をトリガに内臓タイマーが始動します。(注意)パルスをBNC端子に入力する場合、本機のパルス幅設定を入力パルスの周期より短く設定する必要があります。この設定以外では、パルス出力がスキップされます。

遠隔操作用押ボタン

ピコスプリッツァのフロントパネルには、遠隔操作用押ボタン／フットペダル(オプション)を取り付けるための端子が用意されています。この機能は、研究者が本機から離れた場所で、顕微鏡を通してインジェクションを観察することを可能にします。遠隔操作用押ボタンは、パネルの押ボタンと同様に機能します。オプションとして、フットペダルスイッチがあります。詳しくはピコスプリッツァアクセスサリをご参照ください。

外部入力

ピコスプリッツァⅢは、様々な実験方法に適用できるように外部信号によって、2チャンネルを独立して機能させることを可能にする、各チャンネル用BNC端子をフロントパネルに備えています。各端子の上にあるトグルスイッチは、使用しているチャンネルの制御信号源を決定します。

「EXTERNAL」位置では、入力信号がHighレベル(DC5[V])のとき、常にバルブに通電します、入力信号がLowレベル(GND)に戻ると非通電となります。これにより内蔵タイマーの制限を受けずにより長いパルスを出力することが可能です。「TIMER」位置では、チャンネルは内蔵タイマーに接続されます。タイマーが起動している場合には、手動、外部入力にかかわらず、常に動作します。

セカンドチャンネル

ピコスプリッツァⅢは、チャンネル毎にBNC端子とトグルスイッチを備えています。各トグルスイッチが「EXTERNAL」位置に設定されているとき、2つの外部信号によって、2つのチャンネルを独立して操作することが可能になります。トグルスイッチを「TIMER」位置に設定した場合、タイマーが起動している場合には手動、外部入力にかかわらず、常に内蔵タイマーが作動します。チャンネルが起動するのを防ぐためには、トグルスイッチを「EXTERNAL」位置に設定して、BNC端子には接続しないでください。

ピコスプリッツァⅢは2チャンネル仕様で設計されています。2チャンネルへアップグレードするためのバルブボックス及びチューブをご注文する場合は、交換／修理部品リストをご参照ください。

マーカ

タイムマークは、「アーティファクト(人工産物)」のようなイオン注入に付随した生物学的信号に関して、パルス幅の指標を提供します(チャンネル1によって制御される5[V]のTTL信号)。タイムマークはパルス幅の表示をするだけでなく、オシロスコープのトリガ用に同期信号としても利用できます。

真空ローディングボックス

この特別なバルブボックスは、両方のチャンネルの電気端子に接続します。「#1」ケーブルに接続されたチャンネルに送られる信号は、標準のピコスプリッツァのバルブボックス(正圧)のように圧力パルスを出力します。

「#2」ケーブルに接続されたチャンネルに送られる信号は、ピペット(負圧)充填に使用する真空パルスを出力します。真空は、バルブボックス内のベンチュリで発生します。その結果、真空の大きさは圧力設定及び時間設定に依存します。

バルブボックスへの空気圧接続は一般的なバルブボックスと同様です。

圧カピペット用ホルダ

標準で記録するピペットホルダは0.2mm毎で、1.0mm～2.0mmの直径のピペットに利用できます。

価格及び寸法はピコスプリッツァアクセサリリストをご参照ください。

※ ピコスプリッツァの調整はお客様ご自身で行ってください。なお詳細説明が必要な場合は、弊社までご連絡ください。

バックグラウンド

1977年、Dr.R.E McCamanと共同研究者達は高速応答バルブを利用した圧カインジェクションシステムの詳細を発表した。このバルブは精密なインジェクション量(ピコリットル範囲)及びインジェクション時間を連続的に提供するものである。

さらに、それらの調査者たちはインジェクション時、同時に細胞内記録方の為に使用される小さな先端をもつマイクロピペットを通してインジェクションを可能にするホルダを提案しました。

これらのシステムが細胞外だけでなく細胞内インジェクションにも使用されました。この圧カシステムの長所をリストアップする際、これらの研究者はインジェクションとパルスの維持もしくは加圧維持間の関係が直線になり、其々のピペットの更生が迅速で、便利、信頼のおけるものであることを強調しました(電気泳動的な技術の為のそれとは違う。)

圧カインジェクションは変化のない物質、例えばペプチド、ステロイド、酵素を流すのに最適と思われました。圧カインジェクションの解決方法は一般的に電気泳動的なインジェクションより、より希釈されたいくつかの大きさです。このようにイオン導入で一般に経験されるレセプタ脱感作を避けます。

溶質濃度によってもネットチャージによっても影響されない事実は放射性同位元素で識別されたもしくはトレーサ物質の細胞内インジェクションに最適にさせることができた。

このように、ニューロン特有のトランスミッタ合成、軸索の搬送と細胞地形を調査する為に、圧カシステムはグリコプロテインの前駆として、放射性同位元素で識別された前駆体または神経伝達物質の細胞内インジェクションとH3や糖分に使用されています。

圧カシステムで得られる生成可能で定量可能なインジェクションは、膜レセプタで、それら作用薬と薬物相互作用の神経薬理学的研究に理想的です。

ご使用のピコスプリッタで別の用途を発見した場合、他のお客様が利益を得られる可能性があるかもしれないので我々に情報をお送りください。

注意: H3 = 放射能(トリチウム)ラベル物質

引用

神経生物学、細胞生物学と生物物理学の分野で数種類の実験で圧カシステムの使用と独特の長所を記載している引用は以下の通りです:

1. McCaman, R.E., Mc Kenna, D.G. and Ono, J.K. "A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes." *Brian Research* 136:141 (1977).
2. Sakaki, M., Sakai, H and Woody, C.D. "Intracellular staining of cortical neurons by pressure micro-injection of horseradish peroxidase and recovery by core biopsy." *Exp. Neurol.* 58:138 (1978)
3. Sakai, M. Swartz, B.E. and Woody, C.D. "Controlled micro release of pharmacological agents: measurements of volume ejected in vitro through fine tipped glass microelectrodes by pressure." *Neuropharmacol.* 18:209 (1979)
4. Dufy, B. Vincent J-D. Fluery, H., Pasquier, P., Gourджи, D., and Tixler-Vidal, A. "Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells." *Science.* 204:509 (1979)
5. Tauc, L., Hoffman, A., Tsuji, S., Hinzen, D. and Faille, L. "Transmission abolished in a cholinergic synapse after injection of acetylcholinesterase into the presynaptic neuron." *Nature*, 250, 496 (1974)
6. Chang, J.J., Gelperin, A., and Johnson, F.H. "Intracellularly injected aequorin detects transmembrane calcium flux during action potentials in an identified neuron from the terrestrial slug." *Brain Research* 77:431 (1974)
7. Krnjevic, K., Mitchell, J.F., and Szerb, J.C. "Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes." *J.Physiol.* 165:421 (1963)
8. Zieglgansberger, W., Southmann, G., and Herz, A. "Iontophoretic release of substances from micropipettes in vitro." *Neuropharmacol.* 13:417 (1974)
9. Kuffler, S. and Yoshikami, D. "The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse." *J. Physiol.* 251:465 (1975)
10. Eisenstadt, M., Goldman, J.E., Kandel, E.R., Koike, H., Koester, J. and Schwartz, J. "Intrasomatic injection of radioactive precursors

for studying transmitter synthesis in identified neurons of Aplysia." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70:3371 (1973)

11. Schwartz, J.H. "Synthesis, axonal transport and release of acetylcholine by identified neurons of Aplysia." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70:3371 (1973)
12. Thompson, E.B., Schwartz, J.H. and Kandel, E.R. "A radio autographic analysis in the light and electron microscope of identified Aplysia neurons and their processes after intrasomatic injection of L-H3-Fucose." *Brain Research.* 112:251 (1976)
13. Baux, G., Simonneau, M. Tauc, L. "Transmitter release, Ruthenium red used to demonstrate a possible role of sialic acid containing substrates." *J. Physiol.* 291, 161-178 (1979)
14. Sakai, M., Sakai, H., and Woody, C.D. "Sampling distribution of morphologically identified neurons of coronal-pericruciate cortex of awake cats following intracellular injection of HRP." *Brain Research.* 152: 329-333 (1978)
15. Amaral, D.G. and Price, J.L. "An air pressure system for the injection of tracer substances into the brain." *Jrnl. Neuroscience Methods.* 9:35-34 (1983)

図1
液滴較正表

| (4/3) 4.2 x r ³ DIAM. | RADIUS | PICOLITER VOL(F1) |
|--|--------|----------------------|
| 10 μm | 5 | .52 |
| 20 | 10 | 4.2 |
| 30 | 15 | 14.2 |
| 40 | 20 | 33.6 |
| 50 | 25 | 65.6 |
| 60 | 30 | 113 |
| 65 | 32.5 | 144 |
| 70 | 35 | 180 |
| 75 | 37.5 | 221 |
| 80 | 40 | 269 |
| 90 | 45 | 383 |
| 100 | 50 | 525 |
| 110 | 55 | 699 |
| 120 | 60 | 907 |
| 125 | 62.5 | 1025 |
| 140 | 70 | 1441 |
| 150 | 75 | 1772 |
| 160 | 80 | 2150 |
| 170 | 85 | 2579 |
| 175 | 87.5 | 2814 |
| 180 | 90 | 3062 |
| 200 | 100 | 4200 |
| 225 | 112.5 | 5900 |
| 250 | 125 | 8203 |
| 275 | 137.5 | 11037 |
| 300 | 150 | 14175 |
| 325 | 162.5 | 18022 |
| 350 | 175 | 22509 |
| 375 | 187.5 | 27685 |
| 400 | 200 | 33600 |
| 450 | 225 | 47840 |
| 500 | 250 | 65625 |
| 600 | 306 | 113,000 |
| 625 | 312.5 | 128,000 |
| 750 | 375 | 221,480 |

この表はCalifornia State University、生物化学部Joyce K. Ono博士の好意により提供されました。

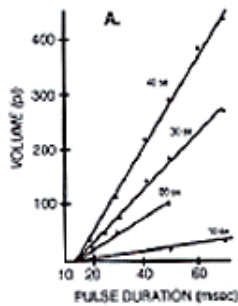
図2

圧カインジェクションシステムの特徴

空気中に吐出される液滴の直径は、解剖顕微鏡の接眼マイクロメータにより測定しました。様々な圧力、パルス幅条件で生成された液滴の容積は計算されています。

図2A:

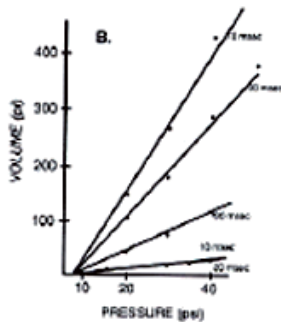
一定の圧力下でパルス幅を変化させたときの吐出量



Xインターセプト(7.5PSI)とは、インジェクションに必要な最低の圧力を意味します。(ピペットの特性)

図2B:

一定のパルス幅で圧力を変化させたときの吐出量



Xインターセプト(7.5PSI)とは、インジェクションに必要な最低の圧力を意味します。(ピペットの特性)

図2C:

吐出量によるH3スタンダードのリニアリティ

このグラフの点は放射性溶液の特異的活性(6.5X106CPM/mL)と非常に相関しています。(R=0.97)

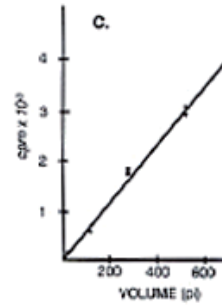
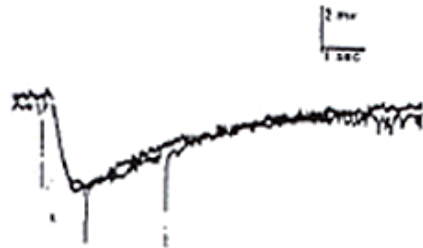


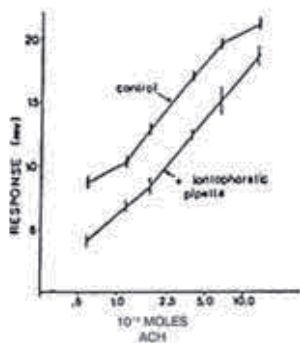
図3A

カリフォルニアアメフラシ神経細胞へのイオン注入と合成物の比較



電気泳動パルス(1 μアンペア、80MSEC)と圧カパルス(40PSI、60MSEC、10-3 M Achの60 μ m寸法水滴)によって運ばれたAchにアフリシア類側ニューロンの重畳は反応します。圧力の人口物(このケースの負の四角パルス)の振幅と両極性は操作することができます。

図3B:

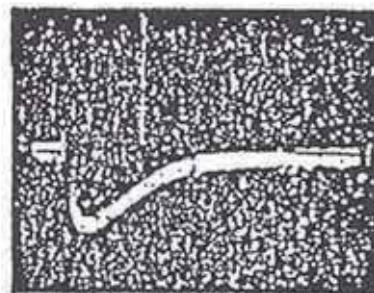


圧力の反応比較は不在(コントロール)と1M Achを含んでいる電気泳動ピペット(70MEGOHMS)の存在でアフリシアニューロンにアセチルコリン(Ach)をインジェクションします。

服用に反応するカーブは電気泳動ピペットから漏れているAchから脱感作の為に右に移されます。各々の点は、平均の平均反応+標準誤差です。

ピペットが通常、電気泳動ピペットの 10^{-6} ~ $10^{-3}M$ の混合割合の作用液で満たされている時から、脱感作の問題は圧力ピペットで回避されることが出来ます。制動流れは圧力ピペットに必要なではありません。このように、物質の矛盾しているインジェクションをさけます。

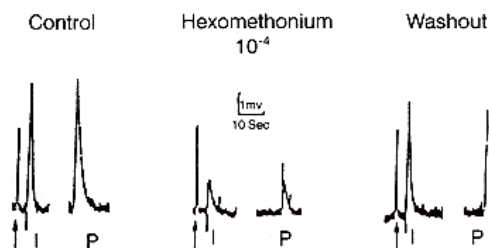
図3C:



アセチルコリン(ACh)への12の連続した反応の再現はアフリシア(シーヘアー)ニューロンへの圧力パルスによって運ばれます。5MSECの22PSIから10PL(Achの=1フェムトモル)であると推測される滴を生成する為に、 $10^{-4}M$ 溶液はインジェクションされます。

校正: 2mV、0.02秒

図3D:



薬研究において、電気泳動(I)と圧力(P)への反応の比較はAChに適用されました。たとえ圧力ピペットの中のAChが通常の人口海水の滴でインジェクションされるとしても、両方の反応はヘグザメソニウムによって等しく対比されます。類似した結果は、代用実験でも得られます。矢印のポイントは入力抵抗テストのパルスを示しています。

ピコスプリッタIII型式
シングルチャンネルユニット

P/N 051-0500-900
0-100 PSI regulator
P/N 051-0560-900
0-60 PSI regulator →現在は廃盤です
P/N 051-0530-900
0-30 PSI regulator
P/N 051-0510-900 →現在は廃盤です
0-10 PSI regulator

2チャンネルユニット

P/N 052-0500-900 0-100 PSI regulator
4つのレギュレータアッセンブルに付属しています。

真空ローディングユニット

P/N 052-0400-900 →現在は廃盤です
0-100 PSI regulator
4つのレギュレータアッセンブルに付属しています。

ピコスプリッタ置き換え/スペアパーツ

アップグレードキット(シングルチャンネル)
P/N 052-0100-010-1
2番目のバルブボックスとシングルチャンネルから
2チャンネルにする為のチューブアッセンブリが含ま
れています。

レギュレータ&ゲージアッセンブリ

P/N 050-0010-400-1 0-100 PSI
P/N 050-0010-420-1 0-60 PSI
P/N 050-0010-430-1 0-30 PSI
P/N 050-0010-440-1 0-10 PSI

バルブボックス&ケーブルアッセンブリ

P/N 051-0009-401-1
(9-82-902 valve)
P/N 051-0009-402-1 (9-65-902 valve)
P/N 052-0401-402-1 (Vacuum loading)

供給空気チューブ&継ぎ手

P/N 033-0250-170-1
Nylon tubing, . inch OD
P/N 011-0054-040-1
Quick disconnect fitting for . inch OD tubing to . NPT
male thread.

テフロンチューブアッセンブリ

P/N 039-0125-062-72
1/8 inch OD tubing, 6 feet long, nut & ferrule on one end.
P/N 035-0125-062-72
1/8 inch OD tubing, 6 feet long, nut & ferrule on both ends.
P/N 035-0062-032-36
1/16 inch OD tubing, 3 feet long, nut & ferrule on both ends.

ピペットホルダ用置き換えガスケット

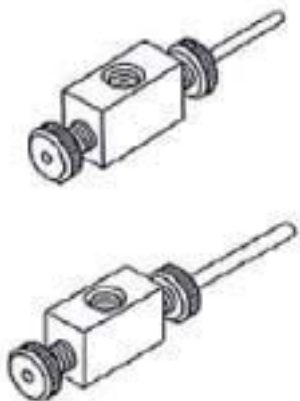
P/N 50-00XX-GSK-001 *
ピペットホルダ(とガスケット)は1.0mm~2.0mm(0.2mmの
増加、プラス1.5mm)のピペットで使用可能です。

ピコスプリッタアクセサリ

プッシュボタン&ケーブルアッセンブリ
P/N 050-0000-800-1
フットスイッチ&ケーブルアッセンブリ
P/N 050-0000-801-1

ピペットホルダ

細胞研究にピコボリュームのインジェクションの
為の圧カシステム



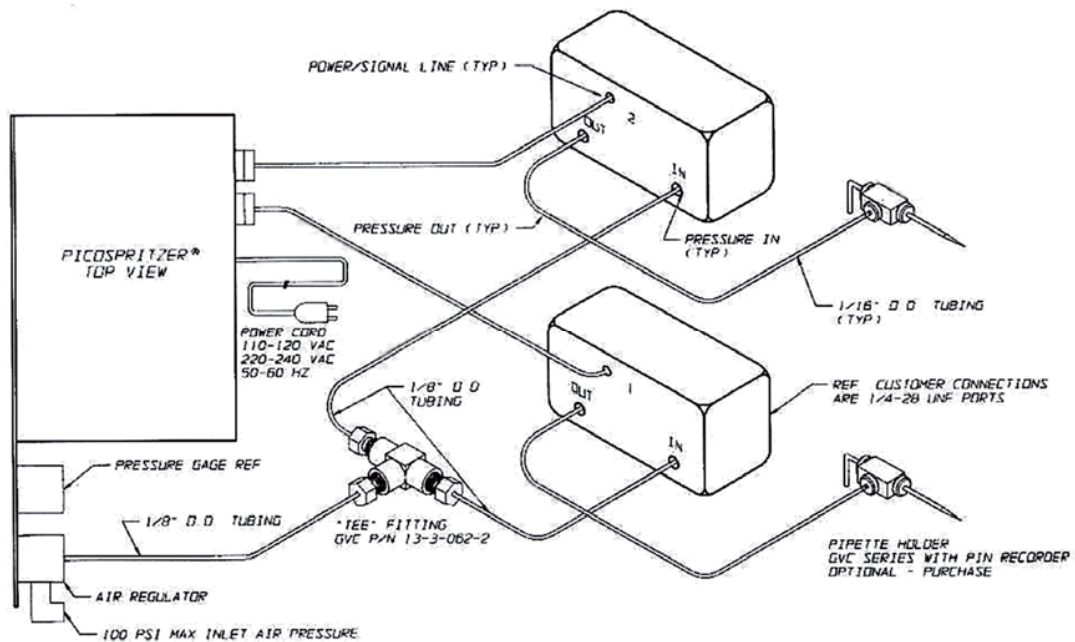
P/N 050-00XX-110-1*

1.5インチ長さの取り付けロッドの0.08インチ径の標準
の直線ホルダ

P/N 50-00XX-130-1*

3.5インチ長さの取り付けロッドで0.186インチ径の標
準直線ホルダ

ピコスプリッタIII 空気圧回路アセンブリ



注意: シングルチャンネルと真空ローディングモデルは一つのパルプボックスで「T」継ぎ手は省かれます。

- A. シングルチャンネル (基本モデル): ピコスプリッタIII はピペットとピペットホルダを除いたセットで供給されます。フロントパネルに設置されたレギュレータとピペットホルダに接続が必要なチューブと同様に、一つのパルプボックスとケーブルが供給されます。レギュレータアセンブリと圧縮ガス元 (最大150psig) の間の接続させるために、12フィートのインチ外径チューブが供給されます。2つ目のパルプボックス拡張用の機能が盛り込まれています。
- B. 2つのチャンネル: このピコスプリッタは1つのチャンネルと同じ電気シャーシを使用しますが、フロントパネルレギュレータとピペットホルダ (ピペットとピペットホルダーは含まれません) に接続する2つのパルプボックスとチューブアセンブリが含まれています。
- C. 真空ローディングピコスプリッタ: このモデルはシャーシの裏に両方のチャンネルジャックに接続している特別なパルプボックスを使用します。バルブ1のトリガー信号を与えた場合 (内部もしくは外部的に) 標準の圧力パルスが伝達されます。バルブ2のトリガー信号を与えた場合には真空パルスが伝達されます。発生される真空レベルはパルプボックス、パルスの持続性ピペットからのガス流れに供給される圧力の機能です。

どのような2つのチャンネルのピコスプリッタIII (もともとシングルチャンネルであろうと2つのチャンネルであろうと) 真空ローディングバルブ (型式052-0401-402-1) を購入いただければ真空ローディングモデルとして使用できます。このパルプボックスは両方のユニットのチャンネルに使用するので他の添付されるパルプボックスを同時使用はできません。