



# アッセイプロトコル

免疫細胞染色

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC<sup>®</sup>

日機装株式会社

## はじめに

このたびは、”3D-RPTEC<sup>®</sup>”をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は 3D-RPTEC を用いた免疫細胞染色のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTEC を用いた評価のご参考になれば幸いです。

## 目次

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 1. 使用機器・試薬類.....  | - 3 - |
| 2. 実施方法.....      | - 3 - |
| 2-1. 事前準備.....    | - 3 - |
| 2-2. 注意事項.....    | - 3 - |
| 2-3. 実施プロトコル..... | - 4 - |
| 3. 染色後の取り扱い.....  | - 5 - |
| 4. 実施例.....       | - 5 - |
| 5. 問い合わせ先.....    | - 5 - |

## 1. 使用機器・試薬類

以下に免疫細胞染色に必要な機器や試薬の一例を示しております。各施設でのご使用に合わせて適宜改変していただければと思います。

### 測定機器

- ・ 蛍光顕微鏡

### 測定用機材

| 製品名                      | 製造  | カタログ番号    | 規格/容量                              |
|--------------------------|-----|-----------|------------------------------------|
| セルセーバーチップラック入<br>(広口チップ) | QSP | FG-FB205R | 200 $\mu$ L / 96 本 $\times$ 10 ラック |

### 試薬類

| 製品名            | 製造            | カタログ番号    | 規格/容量  |
|----------------|---------------|-----------|--------|
| Triton X       | 富士フイルム和光純薬    | 581-81705 | 500 mL |
| D-PBS(-)       | 富士フイルム和光純薬    | 045-29795 | 500 mL |
| Donkey Serum   | Sigma-Aldrich | S30-100ML | 100 mL |
| 4%パラホルムアルデヒド溶液 | 富士フイルム和光純薬    | 161-20141 | 100 mL |
| メタノール          | 富士フイルム和光純薬    | 131-01826 | 500 mL |

## 2. 実施方法

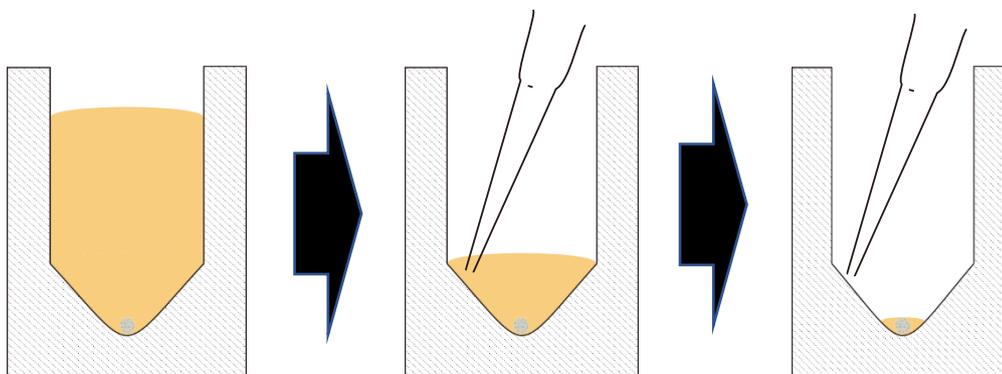
### 2-1. 事前準備

1. 500 mL の PBS(-) に 0.5 mL の Triton X を加え、0.1% PBT を調製する。
2. 100 mL の 0.1% PBT に 5 mL の Donkey Serum を加え、ブロッキング溶液 (5% Donkey serum) を調製する。アッセイに必要な分の Celltiter-Glo 3D Reagent を分注しておく。
3. 細胞は必要に応じて広口チップで指定ウェルに移動する。

### 2-2. 注意事項

- ✓ 3D-RPTEC の免疫細胞染色は培養プレート (96 well の V 底低接着プレート) 中で実施可能です。

- ✓ 洗浄作業はアスピレーター（先端に 200  $\mu$ L チップと 2  $\mu$ L チップを接続）の先端を下記図のように V 底ウェルの端部分にあてるようにして吸引除去し、ウェル底の凝集塊を吸わないようにして下さい。



- ✓ 洗浄する際は細胞塊がウェル底に沈むまで 5~10 分間ほど待ってから次の洗浄を実施して下さい（自然沈降）。細胞塊が沈みきっていない場合に洗浄作業を実施するとアスピレーターで吸引してしまう可能性があります。

### 2-3. 実施プロトコル

1. 3D-RPTEC のウェル内の培地をできる限り吸引除去し、100  $\mu$ L/well の 4%パラホルムアルデヒド溶液を添加して固定する（固定時間 45 分間、室温にて静置）。  
※メタノールでも固定可能（-20 $^{\circ}$ C冷凍庫内で約 30 分間静置して固定）
2. 固定後、PBS(-)で 3 回洗浄する（この状態で 4 $^{\circ}$ C保管が可能）。
3. 100  $\mu$ L/well のブロッキング溶液を添加し、室温で 1 時間静置する。
4. 1 次抗体をブロッキング溶液で希釈する（抗体ごとに最適な希釈率で調製する）。
5. ウェル中のブロッキング溶液を吸引除去し、50~100  $\mu$ L/well の 1 次抗体を添加する。
6. 4 $^{\circ}$ C冷蔵庫中で一晩静置する。
7. 1 次抗体を除去し、100~150  $\mu$ L/well の 0.1% PBT を添加して 10 分間静置する（洗浄作業）。※洗浄作業を 3 回繰り返す。
8. 2 次抗体をブロッキング液で希釈する（抗体ごとに最適な希釈率で調製する）。
9. ウェル中のブロッキング溶液を吸引除去し、50~100  $\mu$ L/well の 2 次抗体を添加する。
10. 室温遮光下で 1 時間静置する。
11. 2 次抗体を除去し、100~150  $\mu$ L/well の 0.1% PBT を添加して 10 分静置する。※洗浄作業を 3 回繰り返す。
12. ウェル内を PBS(-)に置換する。
13. 蛍光顕微鏡で観察する。

### 3. 染色後の取り扱い

染色後の PBS 中の細胞を移動または回収する際はチップに吸着しないようご注意ください。タンパク質成分が含まれていない溶液中では細胞がチップやチューブの側面に付着することがあります。低吸着のチップおよびチューブの使用を推奨します。

### 4. 実施例

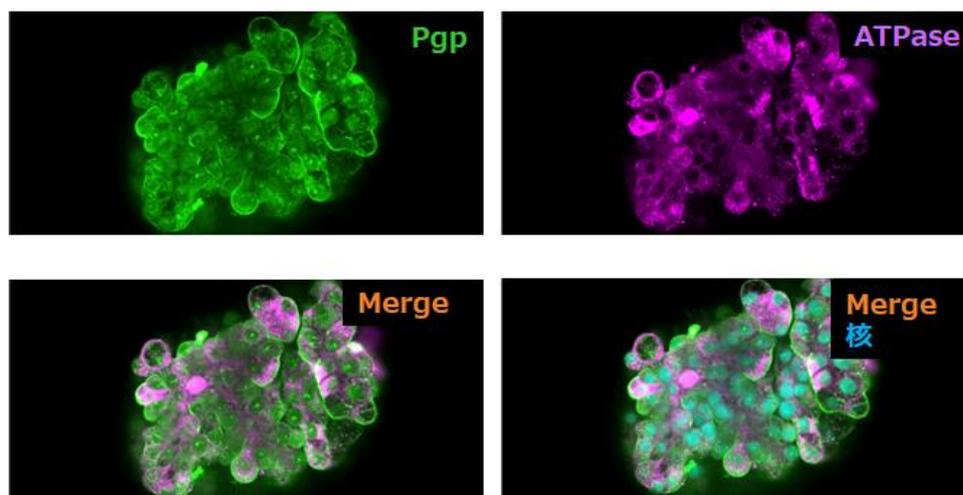
固定液：メタノール (-20°Cで 20 分間、100  $\mu$ L/well)

1 次抗体：Anti-P Glycoprotein 抗体 (Abcam、型番 ab129450、rabbit 由来、50 倍希釈)

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 抗体 (Santa Cruz、型番 SC-16041、goat 由来、50 倍希釈)

2 次抗体：anti-rabbit 抗体 (Alexa Fluor 488、Invitrogen、500 倍希釈)

anti-goat 抗体 (Alexa Fluor 647、Invitrogen、500 倍希釈)



共焦点蛍光顕微鏡で撮像した染色例

### 5. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/industrial/3drptec/>

