



アッセイプロトコル

トランスウェルプレートへの再播種及び TEER 測定

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、3D-RPTEC[®]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を用いたトランズウェルプレートへの再播種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. TW プレートへの再播種.....	- 4 -
2-3. TEER 測定.....	- 5 -
3. 問い合わせ先.....	- 5 -

1. 使用機器・試薬類

以下にトランズウェルプレート（セルカルチャーインサート）への再播種に必要な機器や試薬の一例を示しています。各施設での使用に合わせて適宜改変ください。

測定機器

- ・ Millicell ERS-2 抵抗値測定システム（Millipore 社）

必要機材

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
細胞培養インサート	Greiner	662-641	24 well plate 用
細胞培養マルチウェルプレート	Greiner	662-160	24 well plate
細胞回収用遠沈管ステムフル*	住友ベークライト	MS-90150	15mL

*：スフェロイドの紛失防止のため、低吸着遠沈管の使用を推奨しています。

試薬類

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
iMatrix-511 (silk)	富士フイルム和光 純薬（ニッピ）	387-10131	350 µg
Accumax	Innovative Cell Technologies	AM105	100 mL

2. 実施方法

2-1. 事前準備

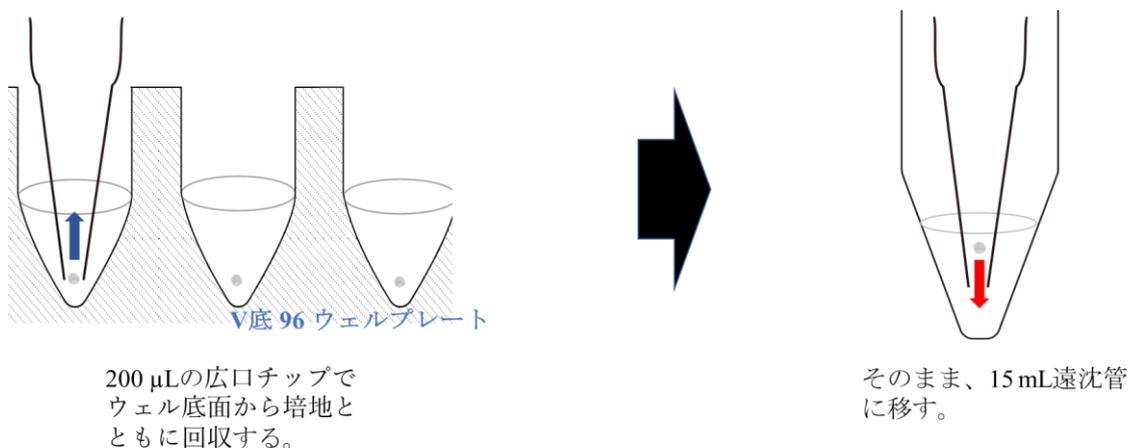
以下にラミニンを用いたインサートのコート例を示します。**実験目的や使用される培養基材に応じて最適な条件でご使用ください。**

細胞播種前日にラミニン（iMatrix-511）でコーティング

1. PBS(-)を 100 µL に対し、iMatrix-511 (0.5 µg/µL)を 1.1～3.3 µL の割合で混合して調製し、コーティング溶液とする（1 ウェルあたり 100 µL の分量で調製する）。
2. 必要数のインサートをマルチウェルプレートに設置する（TW プレート）。
3. コーティング溶液をインサートに 100 µL ずつ添加する。
4. コーティング液を添加した TW プレートを冷蔵庫（4℃）で一晩静置する。

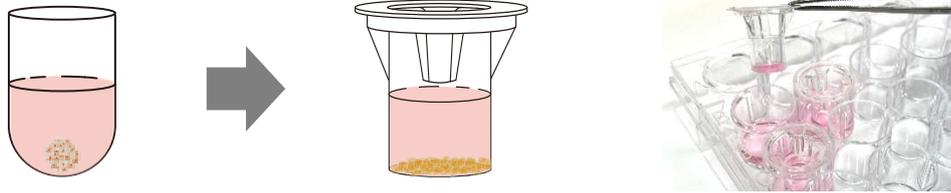
2-2. TW プレートへの再播種

1. 前日からコーティングした TW プレートを事前に 37°C インキュベーター内で 30 分以上静置する。
2. 3D-RPTEC を 15 mL 遠沈管（低吸着タイプを推奨）に回収する。
96well plate の場合の回収方法を下図に示す。6well plate の場合は培地交換時と同様にスフェロイドを手前のウェル底に沈めて回収する。



3. PBS(-)で 1~2 回洗浄後、遠沈管内に沈んだ細胞に Accumax を 1~2 mL 添加して 37°C（恒温槽）でインキュベートする。目安として、スフェロイドが 1000 個以上の場合は Accumax を 2 mL 反応させる。
4. 37°Cで 10 分インキュベーション後に P1000 ピペットでピペッティングを行う。さらに約 5 分インキュベーションする。再度ピペッティングを行うことで多くの凝集塊がシングルセルに分散する。
5. 目視にてスフェロイド（粒状）から懸濁液状態になっていることを確認する。懸濁液状態になっていない場合はインキュベーションおよびピペッティングを追加する。
6. Accumax 添加量の 4 倍以上の専用培地を混和して中和する。
7. セルカウントして必要量を分取する。24well プレートのインサートへ再播種する場合、 2×10^4 cells/well 以上の細胞を播種することでインサートの膜上に単層で培養できる。（播種密度はインサートの形状・型式や培養条件によって異なる）
8. 遠心（160g×5 分間）して細胞沈殿に必要な量の専用培地を添加して再懸濁する。インサートは 1 ウェルあたり 150 µL/well とする。
9. TW プレートのインサート内にあるラミニンコート液を吸引除去して細胞懸濁液を播種する。インサートに 150 µL/well の細胞懸濁液を、ウェル底に 600 µL/well の専用培地を添加し、インキュベーター内で培養する。

10. 再播種した TW プレートは翌日中に実験に使用することを推奨する。



2-3. TEER 測定

弊社では以下の機器を用いて TEER を測定しています。

Millicell ERS-2 抵抗値測定システム (Millipore 社)

1. 70%エタノール（水で調製）にプローブ（スティック型電極）に浸して消毒する。
2. TEER 測定機器をクリーンベンチ内に持ち込む。
3. スティック型電極を十分に乾燥させた後、インサートとウェル底に電極を設置して TEER を測定する。

3. 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/>

