

Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを用いた MDCK 細胞の 3次元培養と蛍光免疫染色法

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子細胞情報学

松本 真司、藤原 誠、岡本 健吾、菊池 章

イントロダクション

Corning マトリゲル基底膜マトリックスは細胞外基質 (ECM) タンパク質を豊富に含んでおり、室温で重合して細胞基底膜と似た生物活性のあるマトリックスとなることから、細胞の3次元培養が可能となる。マトリゲル基底膜マトリックスは基底膜の3次元モデルとして多様な細胞、特に上皮、内皮、筋、および神経細胞において細胞の成長や発達、および分化を特徴づける生理的な環境を提供し得る。イヌ腎臓から樹立された Madrin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞は極性が発達した形態を示す典型的な上皮細胞として細胞接着や極性の解析に繁用されている。特に、細胞外マトリックス内で3次元培養することで内腔を有する球状の Cyst と呼ばれる特徴的な構造を形成することが知られている。今回はマトリゲル基底膜マトリックスを用いた MDCK 細胞の3次元培養法と、形成された Cyst の蛍光免疫染色法を紹介する。

準備

- 細胞株 -

MDCK 細胞 (strain II)

- 試薬・機器 -

Corning マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト (GFR) (カタログ番号: 356230) (Corning Incorporated, USA)、仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、トリプシン (GIBCO, USA)、パラフォルム アルデヒド (TAAB, UK)、ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, USA)、抗 β カテニン抗体 (カタログ番号: 610154) (Corning Incorporated, USA)、Alexa Fluor 標識抗マウス IgG 抗体、ファロイジン (Molecular probes, USA)、Propidium iodide 溶液 (同仁化学, 熊本)、76 × 26 mm スライドガラス、18 mm 四方カバーガラス (MATSUNAMI, 大阪)、ビニールテープ 0.2 mm 厚 (NICHIBAN, 東京)

- 培養器具 -

Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ (カタログ番号: 353003)、Falcon® 24 ウェルマルチウェルプレート (カタログ番号: 353047) (Corning Incorporated, USA)、15 mm 丸カバーガラス (MATSUNAMI, 大阪)

- 実験装置 -

倒立顕微鏡 Axiovert 200M、共焦点顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Germany)

The logo consists of the word "CORNING" in white, uppercase, sans-serif font, centered within a solid orange square background.

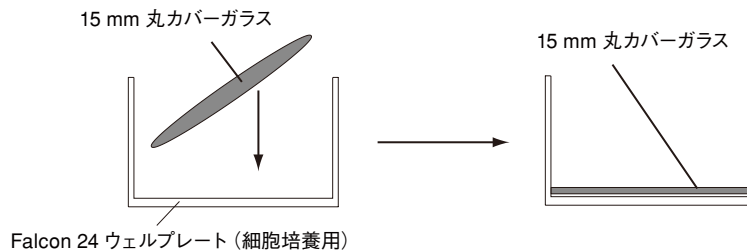
方法

－細胞の準備－

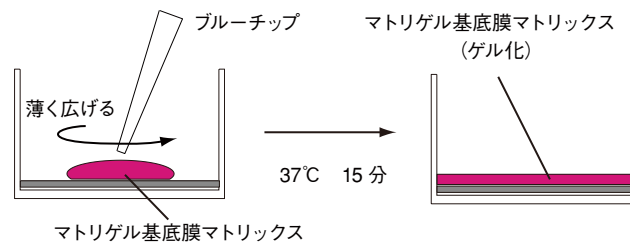
MDCK 細胞 (strain II) を 100 mm カルチャーディッシュを用いて 10% FBS 含有 DMEM で培養する。コンフルエントになるまで増殖させた後、細胞を 3 mM EDTA 含有 PBS にて 15 分間処理する。細胞間接着が分離していることを確認後、0.02% EDTA 含有 0.25% トリプシンで細胞をカルチャーディッシュ上から剥離させ、 5×10^4 個/ml に細胞数を調整する。

－マトリゲル基底膜マトリックス内培養－

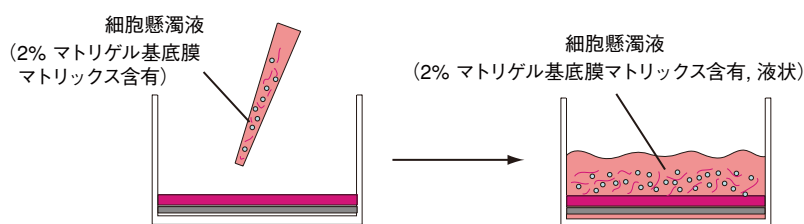
- ① 24 ウェルマルチプレートウェル内に火炎滅菌した 15 mm 丸カバーガラス 1 枚を入れる。プレートは使用するまで 4℃ で冷却しておく。



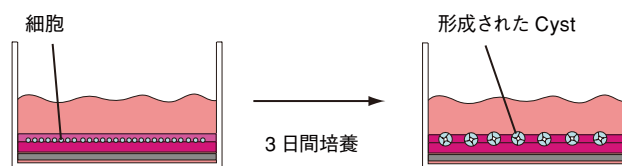
- ② 50 μ l のマトリゲル基底膜マトリックスをカバーガラス上に置き、ブルーチップで手早く底面全体へ広げる。
- ③ プレートを 37℃ にて 15 分間静置し、マトリゲル基底膜マトリックスを重合させる。



- ④ 10% FBS 添加 DMEM 細胞懸濁液 1 ml (5×10^4 個細胞を含む) に 20 μ l のマトリゲル基底膜マトリックスを加えて十分に攪拌後 (終濃度 2% マトリゲル基底膜マトリックス)、全量をウェル内へ入れる。



- ⑤ 37℃ で 3 日間培養する (培養時間は適宜延長、短縮可能)。



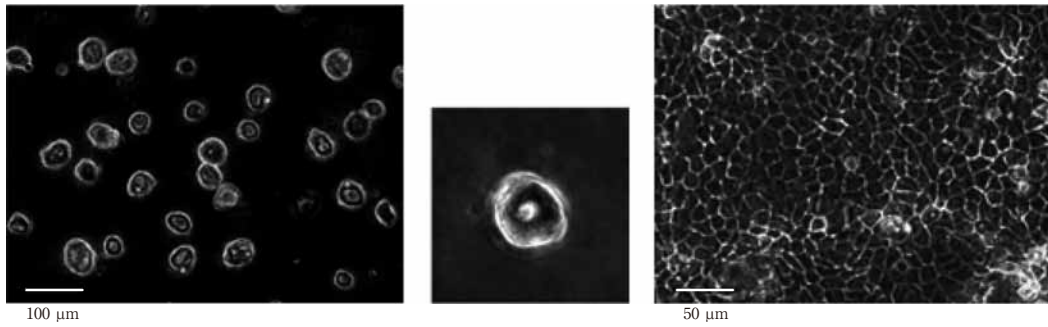


写真 1 : MDCK 細胞をマトリゲル基底膜マトリックス内で 3 日間培養して形成された Cyst とディッシュ上で単層培養した際の光学顕微鏡像

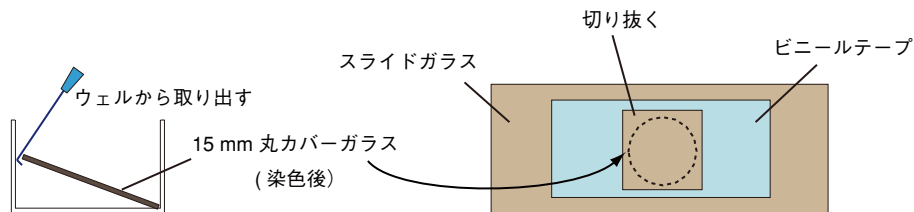
— 蛍光免疫染色 —

核染色および頂端部マーカーとしてアクチン、側底部マーカーとして β カテニンを染色する。

① 試薬の調整 :

- ・ 4% パラフォルムアルデヒド含有 PBS (pH 7.4)
- ・ 浸透化・ブロッキング溶液 (4% BSA、0.5% Triton-X100、0.04% NaN₃ 含有 PBS)

- ② 固定: PBS 1 ml にて緩やかに洗浄後、4% パラフォルムアルデヒド含有 PBS (pH 7.4) で 30 分間、室温で固定する。
- ③ 浸透化、ブロッキング: 固定後、PBS にて洗浄し、浸透化・ブロッキング溶液を 1 ml 加えて、30 分間、室温で静置。
- ④ 一次抗体反応: 浸透化・ブロッキング溶液に 100 倍希釈した抗 β カテニン抗体 250 μ l を加えて、室温で 3 時間静置。
- ⑤ 洗浄: 浸透化・ブロッキング溶液にて洗浄する。
- ⑥ 二次抗体反応: 浸透化・ブロッキング溶液に 250 倍希釈した Alexa Fluor 標識抗マウス IgG 抗体およびファロイジン 250 μ l を加えて、室温で 2 時間静置。
- ⑦ 洗浄: 浸透化・ブロッキング溶液、次いで PBS にて洗浄する。



- ⑧ 標本作製: スライドガラスにビニールテープを 1 枚はり、15 mm 四方をカッターで切り抜く。プレートから染色後の丸カバーガラスを取り出し (先端を曲げた 30G 注射針とピンセットなど用いるとよい)、切り抜いた窪みに置く。50% グリセロール含有 PBS にて 500 倍希釈した PI 溶液 40 μ l を滴下する。18 mm 四方カバーガラスを上からかぶせて封入する。余分な封入剤を拭き取り、周囲をマニキュア等で固めて完成。

- ⑨ 共焦点顕微鏡にて標本を観察。

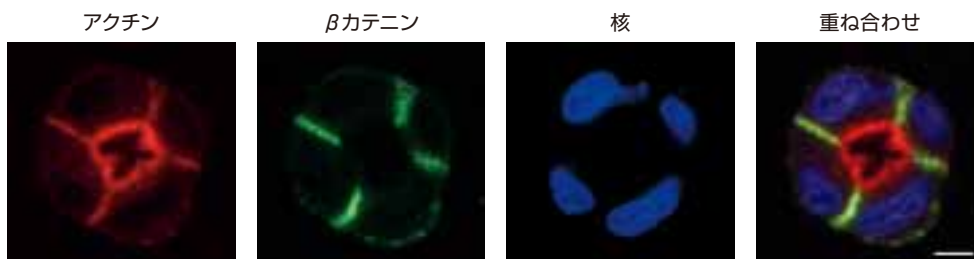


写真 2 : Cyst の蛍光免疫染色像 スケールバー : 5 μ m

Corning® は CORNING Incorporated の登録商標です。
商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit www.corning.com/discoverylabware.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks.

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

**コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部**

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

© 2012, 2013 Corning Incorporated
CLS-034-00