

CORNING

Corning® BioCoat™
腸上皮細胞分化エンバイロメント
(カタログ番号 355057)



短期培養法の特長

- フィブリラーコラーゲンをコートしたFalcon®セルカルチャーインサートと、専用のシーディング基礎培地、Entero-STIM分化培地を使用します
- 細胞を高密度で播種した後、専用の培地により細胞分化を促進し、単層形成を促します
- Entero-STIM分化培地に含まれる酪酸 (Butyric acid) が、細胞の分化促進に寄与します

Corning® BioCoat™ 腸上皮細胞分化エンバイロメント

カタログ番号：355057

コート済みインサートと培地がセットになったキットです

インサートは個別型です

- ・Corning BioCoat フィブリラーコラーゲン セルカルチャーインサート 1 μ m ポア
 - 24個のインサートがセットされた24ウェルプレート×1枚
 - 空の24ウェルプレート(353504)×1枚
- ・シーディング基礎培地 - 100 mL
- ・ENTERO-STIM分化培地 - 400 mL
- ・MITO+ シーラムイクステンダ - 1本

355057



補充用製品

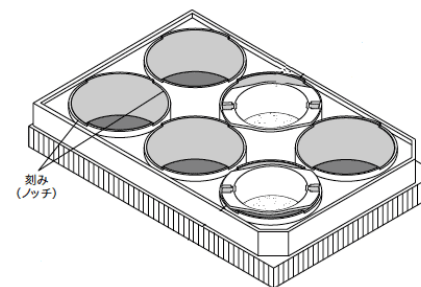
最初にキットを購入し、不足した製品を追加購入することができます

製品名		カタログ番号	構成品
腸上皮分化培地パック		355058	シーディング基礎培地 250 mL 2本 ENTERO-STIM分化培地 250 mL 2本 MITO+ シーラムイクステンダー 500mL相当 2本
ENTERO-STIM分化培地		355357	250 mL 2本
MITO+ シーラムイクステンダー		355006	培地5L相当 1本
Corning BioCoat フィブリラーコラーゲン 1.0 μ m セルカルチャーインサート	6ウェル	354472	インサート24個/6ウェルプレート 4枚 6ウェルディープウェルプレート(空) 4枚
	24ウェル	354474	インサート24個/24ウェルプレート 1枚 24ウェルプレート(空) 1枚

その他 購入・準備が必要となる備品

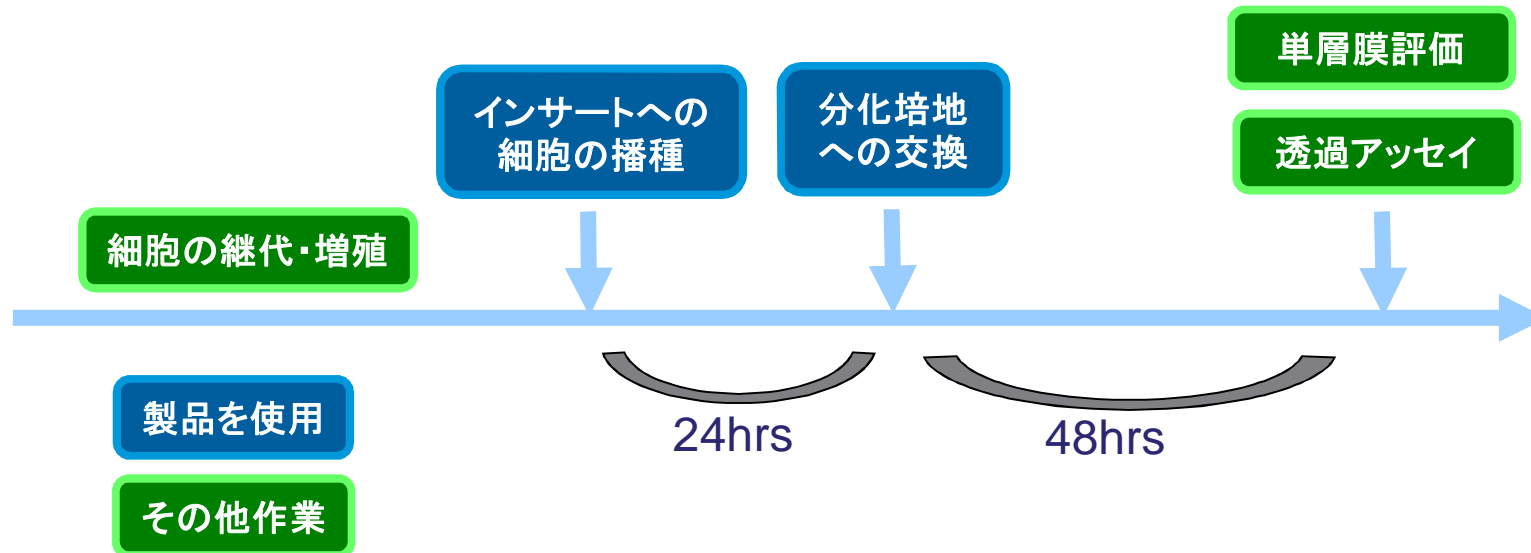
- 細胞
- 継代用培地 (*キットに含まれているのは、単層膜形成用培地です)
- 継代用培養容器 (Falcon セルカルチャーフラスコ など)
- 353502 (6ウェル)/353504 (24ウェル) コンパニオンプレート
予備プレート/透過アッセイ用プレートとして必要に応じてご準備ください
- 透過アッセイ用バッファー
- 膜抵抗値測定装置
- ピンセット など

353502



単層膜形成実験の流れ

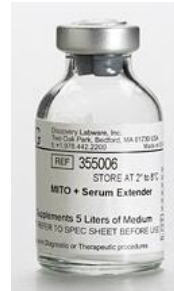
基本の使用方法



*3日法には、応用法があります
応用法は、後のスライドでご紹介します

培地の調整

MITO+ シーラムエクステンダー



- MITO+ シーラムエクステンダーのバイアルを70%エタノールで消毒します
- 滅菌精製水500 μ lを加えて調製します

100 μ l

400 μ l

シーディング基礎培地(125mlボトル)にMITO+ シーラムエクステンダーを100 μ l 添加します

シーディング基礎培地
(125mlボトル)



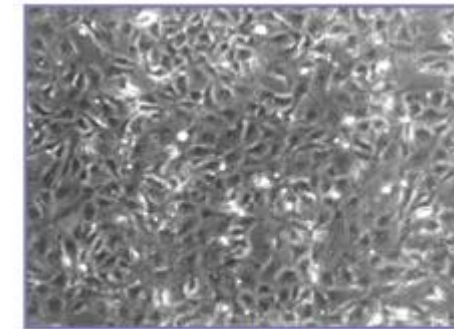
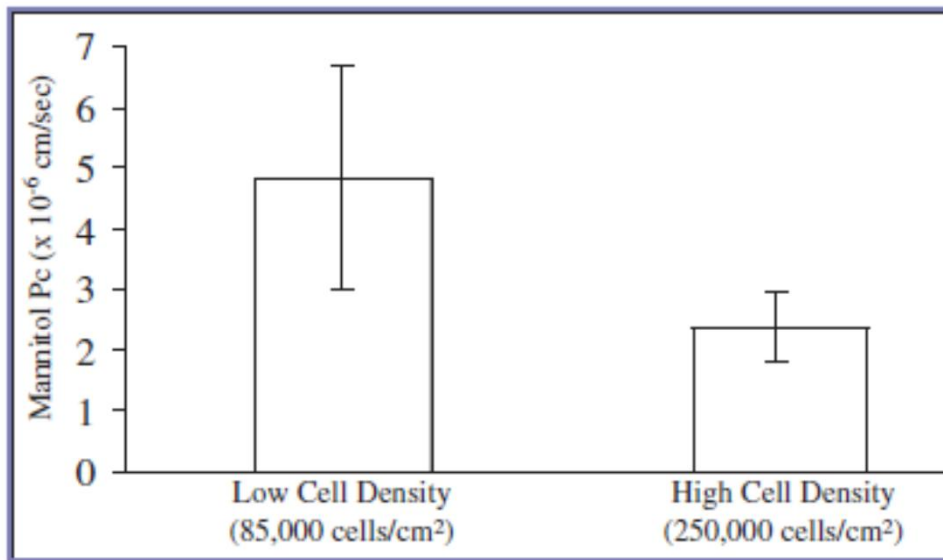
腸上皮細胞分化培地(500mLボトル)にMITO+ シーラムエクステンダーを400 μ l添加します

腸上皮細胞分化培地
(500mLボトル)

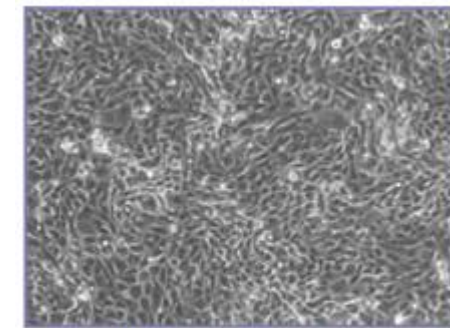
MITO+ シーラムエクステンダー添加後の培地は、2~8 $^{\circ}$ Cで保存した場合、21日間安定です

単層膜形成用の細胞増殖

単層膜形成に対する 事前培養での細胞密度の影響



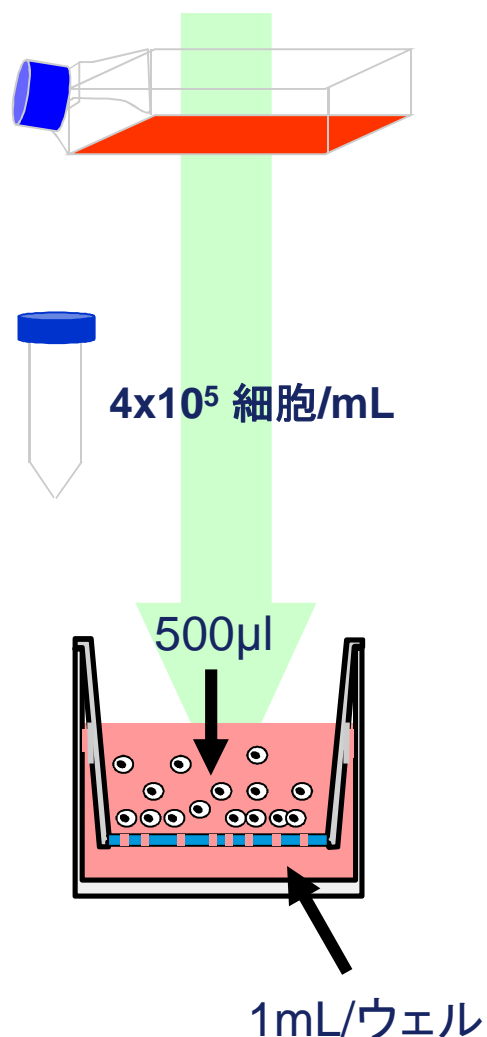
(a) Low Cell Density
(85,000 cells/cm²)



(b) High Cell Density
(250,000 cells/cm²)

- 単層膜形成を行う直前は、通常の継代とは異なり細胞を高密度まで増殖させます (250,000 cells/cm²)
- 密度が上がりきらないときは、コンフルエントになるよう培養してください

細胞の播種(24ウェルの場合)

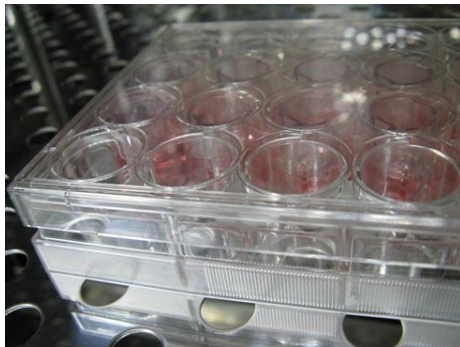


1. Caco-2細胞を、高密度になるまで増殖させます
2. トリプシン/EDTA溶液を用いて培養フラスコからCaco-2細胞を剥します
3. トリプシン/EDTAを除去または中和後、予め37°Cに加熱したMITO+シーラムイクステンダー添加シーディング基礎培地に4x10⁵ 細胞/mlの濃度で浮遊させます
4. MITO+シーラムイクステンダー添加シーディング基礎培地(37°C) を、下部プレートに1m加えます
5. インサートをピンセットでプレートのウェルにセットし、細胞浮遊液をそれぞれのインサートに500µl加えます
 - 細胞の播種数は、200,000細胞/インサートとなります
6. 37°C、5%CO₂、湿度100%の環境下で、24時間培養します

細胞の分化(分化培地の添加)



1. プレートのウェル(インサートより下側)およびインサートの内側(インサートの上側)から培地を注意深く取り除きます
 - 細胞を傷つけないよう気をつけてください
 - アスピレーションが強すぎると、コーティングや細胞が取れることがあります



2. 培地を取り除いたプレートにあらかじめ37°Cに温めておいたMITO+シーラムイクステンダー添加腸上皮細胞分化培地を1mL加えます
3. インサート内には500μl加えます
4. 37°C、5% CO₂、湿度100% の環境下で約48時間培養します

応用法の紹介

変更ポイント

1. 播種用の培地の変更
2. 分化培地の交換頻度を上げる
3. 培養期間の変更

応用法は、基本の培養プロトコールに従って実験を行っても、希望条件が満たされなかったときに行います

例) アッセイを予定していたP-糖タンパク質活性が低い
TEERの上昇が不十分
ルシファーイエローのリークが見られる など

応用法

1. 播種用の培地の変更

- シーディング基礎培地の代わりに、継代培養で使用している血清入りの培地を用います



血清が入ることで、より細胞の定着を向上させます

2. 分化培地の交換頻度を上げる

- 分化培地に交換後、毎日培地交換を行います



培地交換頻度を高くすることで、細胞をより良い状態で培養します

応用法

3. 培養期間の変更

- シーディング基礎培地での培養期間を延長します(最長3日まで)



より細胞の定着を向上させます

週末をまたぐ培養にも利用可能です

(アッセイスケジュールの調整用)

*培地が黄色くなる前に培地を交換してください

応用法

3. 培養期間の変更

- 分化培地での培養期間を延長します
(3日程度まで)



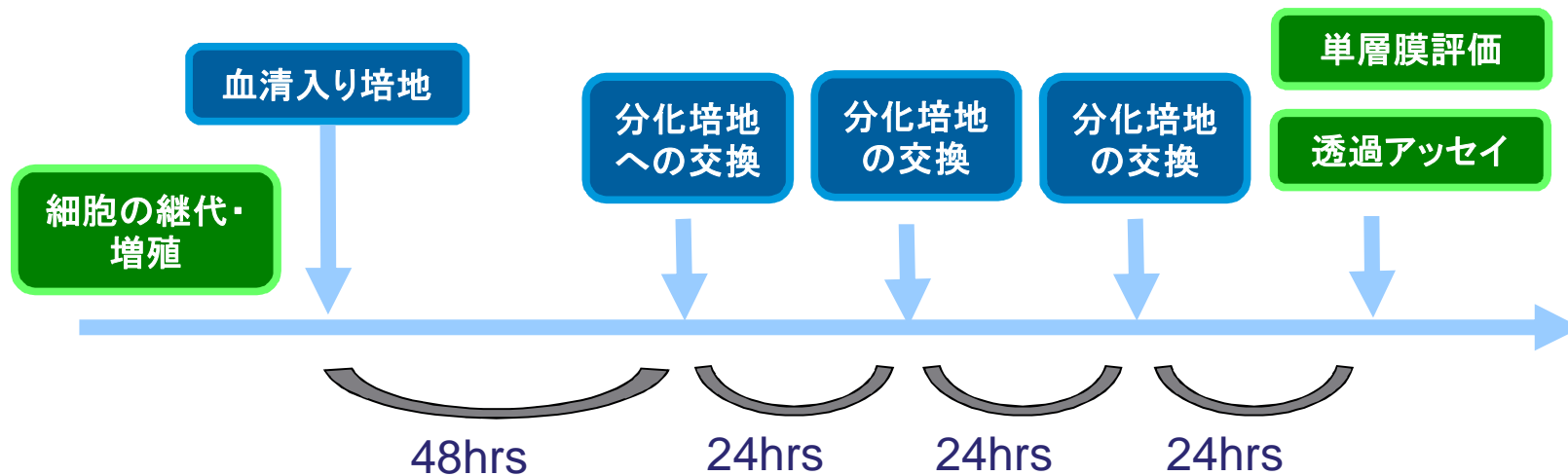
より緊密な単層膜の形成を促します

* 分化培地で長く培養しすぎると単層膜が脆弱になることがありますので、必ず、事前にどの程度まで培養延長が可能かを検討してください。

応用法

- 応用法は、組み合わせて行うこともできます

例) 血清入り培地で播種 + 培養期間の延長 + 毎日培地交換



参考資料:

New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system.

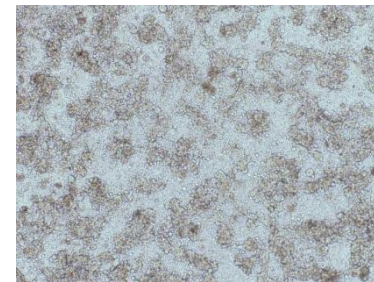
Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, Taki Y, Sakane T, Sezaki H, Furuyama Y.

J Pharm Sci. 91, pp669 2002

単層膜の評価

- **Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER)**
 - 膜抵抗値の測定
- **Paracellular Markersの透過測定**
 - Lucifer yellow - mw 487
 - Mannitol - mw 182
 - Polyethylene Glycol (PEG) (400 - 4000) - mw 400 - 4000
- **Visualization (*判断が難しいため推奨していません)**
 - 顕微鏡観察 — 分化があまり進んでいないときは粒形の細胞塊などがみえますが、分化が進むと、細胞の視認はさらに難しくなります。
 - 細胞の染色 — 細胞の固定や染色が必要となるため、余分なウェルを用意して行ってください。

*培養3日目
(分化培地2日目)



膜抵抗測定器による測定 Trans epithelial Electrical Resistance (TEER)

$$\text{TEER} = (\text{Rm} - \text{Rb}) \times \text{A}$$

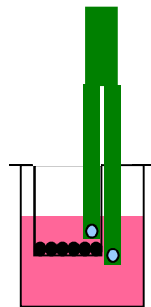
TEER transepithelial electrical resistance [Wcm²]

Rm 細胞単層膜を形成したインサートの抵抗値 [W]

Rb 細胞の無いインサートの抵抗値 [W]

A セルカルチャーインサートメンブレンの面積 [cm²]

Note: アッセイ系の構築の際、単層膜形成に必要な最低TEER を定めるようにしてください



*測定器のプローブ(先端電極)が細胞層を傷つけないよう注意してください。透過物質の漏出の原因となります。



測定装置は、株式会社フィジオテック、日本ミリポア株式会社等より販売されています

単層膜の評価

Lucifer yellowの透過アッセイ

- Lucifer Yellow Flux (% LY Flux)

$$\% \text{ LY Flux} = 100 \times ((\text{LY}_{\text{BL}} \times \text{Vol}_{\text{BL}}) / (\text{LY}_{\text{AP}} \times \text{Vol}_{\text{AP}}))$$

LY_{BL} レシーバープレートチャンバーのLucifer yellowの濃度 [μM]

Vol_{BL} レシーバープレートチャンバーの容量[cm³]

LY_{AP} ドナーチャンバーのLucifer yellowの濃度[μM]

Vol_{AP} ドナーチャンバーの容量[cm³]

Note: Lucifer Yellow の透過レンジは、おおよそ 0.3 to 2%になります。2% 以上の値を示す場合は、単層膜の形成が不十分な恐れがあります。

- アッセイに関する資料

Drug Transport Assay for Falcon® 24-Multiwell Insert Systems

薬剤透過アッセイ

- アッセイに関する資料

Drug Transport Assay for Falcon® 24-Multiwell Insert Systems

Transport Buffer

HBSS (with Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) + 10 mM HEPES, pH 7.0 – 7.4

Ca⁺⁺ /Mg⁺⁺ は、細胞間接着に影響しますので、両イオンを含まないバッファーを使用すると、バリア機能が弱くなります

トランスポーターの中には、pH依存性のものがありますので、必要に応じpHを調整してください (apical pH 6.4, basal pH 7.4 など)

Temperature

37°Cに保つことで細胞の活動が保たれ、transcellular transportやactive transportが行われます

お問い合わせ先

何かご不明な点がございましたら、以下の連作先にお問い合わせください。

03-3586-1268
ScientificSupportJP@corning.com

