

## 取扱説明書

### Rat GLP-1 cell kit

Cat. No. RCPCC008

2X10<sup>7</sup>cells/vial 4本

## 保存方法

本品は細胞は冷凍状態、培地は冷蔵状態で発送されます。到着後、細胞は-80℃に、培地は4℃に保存してください。

## 特長

- ・ラット下部消化管 GLP-1 分泌初代培養細胞を含む細胞画分(純化細胞ではなく粗画分)です。
- ・8週齢のSD 雄ラットから採取した細胞です。
- ・グルコース、リノール酸、リコール酸等に応じて GLP-1 を分泌し、上清中の GLP-1 濃度は、市販の GLP-1 測定キットの検出レベルに達します。

## キット構成

1. Rat GLP-1 cell	2X10 <sup>7</sup> cells/vial 4本
2. Medium A for GLP-1	100 mL
3. Medium B for GLP-1	100 mL
4. Linoleic Acid 100 mM(100%DMSO)	500 $\mu$ L
5. Lithocholic Acid 100 mM(100%DMSO)	500 $\mu$ L
6. Assay Plate	1 plate
7. Storage Plate	1 plate

## 製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

## 使用方法

### 準備するもの

- ・本品 (Cat.No.RCPCC008)
- ・直径 100 mm 細胞培養用 dish
- ・50 mL 遠心管
- ・リザーバー
- ・T225 フラスコ

※安全キャビネット内での保温に使用します。上部が平ら、かつ直径 100 mm 細胞培養用 dish が乗る大きさのもので、保温が可能なのであれば問題ございません。

- ・37℃ ウォーターバス
  - ・口広のディスポーザブルピペット 25 mL
  - ・口広のピペットチップ 1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L
- (例:MolecuLar Bio Products 社製 ART2079G)
- ・その他、細胞培養に必要な器具・機器類

## 注意 必ずお読みください

本細胞は脆弱な細胞ですので、以下の点に注意してください。

- ・全てのピペッティング操作において、吸引・吐出はゆっくりと行ってください。1 mL/sec の速度で吐出する程度です。
- ・細胞を冷やさないように注意してください。使用する培地は必ず 37℃ にあたためておき、操作はすばやく行ってください。時間がかかったり冷えたりしてしまいますと細胞が弱り、内部の GLP-1 が漏出して化合物の評価ができなくなります。

## A. 解凍方法

- A-1. T225 フラスコに水を全満し、37℃～39℃に温めておきます。
- A-2. Medium A for GLP-1 を 10 mL ずつ 50mL 遠心管 3 本に分注し、37℃に温めておきます。
- A-3. 直径 100 mm dish に、Medium A for GLP-1 を 10 mL 入れ、37℃のインキュベーター内で温めておきます。
- A-4. 使用する口広のピペット、ピペットチップは 37℃インキュベーターなどに入れ、あらかじめ温めておきます。
- A-5. 細胞を、保存場所から 37℃ウォーターバスへ速やかに(30 秒以内)移動します。
- A-6. コンタミネーションに注意しながら 37℃のウォーターバスへ浸し、振りながら 120～150 秒間解凍させます。

※細胞は 4 本のチューブに入っていますが、4 本同時に溶解する場合にはフローターなどを使用し、できるだけ同時進行してください。

- A-7. 完全に溶ける手前でバイアルを安全キャビネット内に入れ、口広のピペットチップを使用して、A-2 で準備した Medium A for GLP-1 の入った 50 mL 遠心管へ移します。2 本以上のバイアルを解凍した場合は、細胞を 1 本にまとめてください。
- A-8. 細胞塊を軽くほぐすように口広のピペットでゆっくりピペッティングを行います。150 秒以内で実施してください。
- A-9. 200×g、4 分、室温で遠心し、上清を除去します。細胞が完全に沈殿しないため、多少上清が残っていても問題ありません。
- A-10. 細胞に A-2 で準備した Medium A for GLP-1 を 10 mL 加え、口広のピペットでゆっくりピペッティングを行います。遠心時間を含め 6 分以内で実施してください。
- A-11. 200×g、4 分、室温で遠心し、上清を除去します。細胞が完全に沈殿しないため、多少上清が残っていても問題ありません。
- A-12. 細胞に A-2 で準備した Medium A for GLP-1 を 10 mL 加え、口広のピペットでゆっくりピペッティングを行います。遠心時間を含め 6 分以内で実施してください。
- A-13. A-1 で準備した T225 フラスコを安全キャビネット内に置き、A-3 で準備した直径 100 mm dish をフラスコの上に置きます。A-12 の細胞懸濁液をディッシュ上に播種し、37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 12 時間培養します。

## B. 細胞刺激方法

- B-1. T225 フラスコに水を全満し、37°C～39°Cに温めておきます
- B-2. Medium B for GLP-1 を 10 mL ずつ 50 mL 遠心管 2 本に分注し、37°Cに温めておきます。
- B-3. Assay Plate(RCPCC010)、空の 50 mL 遠心管 1 本、リザーバー、使用する口広のピペット、口広のピペットチップを 37°Cに温めておきます。
- B-4. 安全キャビネットの空気循環を止め、温めた T225 フラスコを入れます。CO<sub>2</sub> インキュベーターから 12 時間培養した細胞を出し、フラスコの上におきます。
- B-5. 口広のピペットで、B-3 で準備した空の 50 mL 遠心管に細胞を回収します。**30 秒程度で行ってください。**
- B-6. 200×g、4 分、室温で遠心し、上清を除去します。細胞が完全に沈殿しないため、多少上清が残っていても問題ありません。
- B-7. **速やかに**、B-2 で準備した Medium B for GLP-1 を 10 mL 加え、口広のピペットで 1 回ピペッティングしてください。このとき、細胞はシングルセルにはなりません。またこの段階で泡立っても構いません。細胞を完全にほぐす必要はありませんので**冷やさな**いように取り扱ってください。

**B-6～B-7 のステップは時間をかけずに、遠心時間の 4 分を含め、6 分以内で済ませてください。**

- B-8. 200×g、4 分、室温で遠心し、上清を除去します。細胞が完全に沈殿しないため、多少上清が残っていても問題ありません。
- B-9. **速やかに**、B-2 で準備した Medium B for GLP-1 を、1 vial につき 2.4 mL 加え、口広のピペットで 1 回ピペッティングしてください。
- B-10. T225 フラスコ上に B-3 で準備したリザーバーと Assay Plate を置きます。リザーバーに細胞懸濁液を移し、口広のピペットチップで Assay Plate に播種します。細胞は沈殿しやすいので、あいている手でリザーバーをゆすり、沈殿を防止しながら実施してください。

※細胞の分注は **120 秒程度**で完了してください。

※細胞播種は、細胞量の偏りが生じやすい場合があります。細胞播種時には **50 μL ずつ 2 回 (計 100 μL)** に分けて入れるなど、細胞量が均一となるよう調整してください。

- B-11. 速やかに、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 5%、37°C) に移し、20 分間培養します。
- B-12. 保温した検体 100 μL を細胞に加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 5%、37°C) にいれて 40 分処理をします。

※検体添加は **90 秒程度**で完了してください。

※ピペッティングは**できるだけ行わないでください。**

- B-13. プレートを 200×g、4 分、室温で遠心して細胞を沈殿させ、上清をアッセイに必要な量を採取してアッセイに使用してください。この時、細胞を吸引いたしますと GLP-1 が漏出してしまい、化合物評価が正確にできなくなる場合がございます。すぐに使用しない場合は Storage Plate に移し、シールして -80°C に保管してください。保管した場合でも、次の日には使用してください。

## アッセイに関する注意事項

- 矢内原のキット (GLP-1 EIA Kit Yanaihara Institute Inc (Cat.No.YK160))、和光のキット (Rat GLP-1 ELISA Kit Wako (Cat No. 291-59201)) をご使用の場合には、**サンプル使用量をキット指定の 30 μL ではなく、90 μL で行ってください。検量線はキット指示通りではなく、低濃度域で細かく濃度を振って作成することをお勧めします。**そのほかの使用手順はキット添付の使用方法に準じて行ってください。
- 細胞は穏やかかつ冷やさないうように取り扱ってください。所要時間を細かく記載していますが、できるだけ速やかに行ってください。顕微鏡観察、写真撮影などをする細胞は少量別にとり分けるなどして時間を延長しないようにお願いします。時間がかかると細胞が弱り、GLP-1 を分泌しない、あるいは細胞内 GLP-1 が漏出してしまい、化合物評価が正確にできなくなる場合がございます。
- 細胞はほぐすことは必要ですが、シングルセルにしないようにしてください。無理にシングルセルにしようとしますと、細胞が弱り、GLP-1 を分泌しないあるいは細胞内 GLP-1 が漏出してしまい、化合物評価が正確にできなくなる場合がございます。
- 本細胞は未刺激の上清原液で GLP-1 濃度が矢内原製キットの検出感度付近となります。LINCO のキットを使用する際には適正値になるように予め希釈倍率の予備検討を行ってください。
- 本プロトコルでは、細胞の処理時間を**前処理 20 分-処理 40 分、計 60 分**としております。化合物の毒性や物性などを考慮してこの時間を変更することは可能ですが、処理時間は合計 2 時間を限界として実施してください。

株式会社リプロセル

<http://www.reprocell.com>

E-mail: info\_repro@reprocell.com