

Human renal proximal tubular epithelial cells の播種方法

本プロトコールは、Human renal proximal tubular epithelial cells (以下、RPTC) 凍結 vial 製品を用いた播種のためのプロトコールです。

RPTC 凍結 vial

Cryopreserved Human Renal Proximal Tubular Epithelial cells (Cat. No. RPT101)

RPTC 用添加剤

Additives for renal cell thawing medium, for 100 mL (Cat. No. ADD582C)

Additives for renal cell culture medium, for 100 mL (Cat. No. ADD583C)

目次

1. はじめに.....	3
2. 製品の内容.....	3
2. 使用機器, 消耗品, 試薬.....	3
2.1 機器.....	3
2.2 消耗品.....	3
2.3 試薬.....	3
3. 播種方法.....	4
3.1 Insert のコラーゲンコート.....	4
3.2 培地調製.....	4
3.3 細胞の播種.....	4
4. 注意事項.....	5

1. はじめに

BIOPREDIC 社 (フランス ; BPI) が単離したヒト腎近位尿細管上皮細胞(Renal Proximal Tubular Epithelial Cells; RPTC) です。近位尿細管細胞は、腎毒性や腎臓における薬物輸送機能研究の評価に用いられています。以下に本製品の取扱い方法を記載しております。

2. 製品の内容

● RPTC 凍結 vial

- ・ 5×10^5 個以上の細胞が 1 mL の凍結保存培地に保存されています。
- ・ 本製品到着後、液体窒素下で保存してください。

- Additives for renal cell thawing medium, for 100 mL
- Additives for renal cell culture medium, for 100 mL

- ・ 本製品到着後、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存してください。

2. 使用機器, 消耗品, 試薬

2.1 機器

- ・ CO_2 インキュベーター
- ・ クリーンベンチ、もしくは安全キャビネット
- ・ ウォーターバス
- ・ バキュームポンプ
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ 遠心機
- ・ マイクロピペット、電動ピペッターなど

2.2 消耗品

- ・ Transwell 24 well $0.4\text{ }\mu\text{m}$ Pore Polycarbonate Membrane Insert (Corning, 3413)
- ・ トップシリンジ 5 mL (トップ, 00933)
- ・ Millex-GS Syringe Filter Unit, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, SLGSR33SS)

2.3 試薬

- ・ DMEM/F-12, GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, 10565018)
- ・ Collagen type IV (SIGMA, C5533-5MG)
- ・ 0.4w/v% トリパンプルー溶液 (富士フイルム和光純薬, 20717081)

3. 播種方法

すべての操作を安全キャビネット内で行ってください。

3.1 Insert のコラーゲンコート

- (1) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、ろ過滅菌した Collagen type IV を 100 μL ずつ各 insert に添加する。
- (2) 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間以上インキュベートする。
- (3) 2 時間後、膜に注意しながら溶液を吸引し、200 μL の滅菌水で 1 度リンスする。

使用期限：コーティング後 1 ヶ月 (4 $^{\circ}\text{C}$)

3.2 培地調製

• Thawing Medium の調製

RPTC 用培地 100 mL に融解した Additives for renal cell thawing medium (ADD582C) を 1 本混合する。

使用期限：混合後 1 ヶ月 (4 $^{\circ}\text{C}$)

• Culture Medium の調製

RPTC 用培地 100 mL に融解した Additives for renal cell culture medium (ADD582C) を 1 本混合する。

使用期限：混合後 1 ヶ月 (4 $^{\circ}\text{C}$)

3.3 細胞の播種

- (1) **Thawing Medium** と **Culture Medium** を 37 $^{\circ}\text{C}$ に温める。
- (2) 15 mL のコニカルチューブに温めた 9 mL の **Thawing Medium** を入れる。
- (3) バイアルをウォーターバスへ入れ、~90 % 程度が溶ける (バイアルには小さい塊が残る程度) まで解凍する。
- (4) 9 mL の **Thawing Medium** を入れた 15 mL のコニカルチューブにバイアル中の融解した細胞懸濁液を入れる。
- (5) (4) の細胞懸濁液 1 mL でバイアルを洗い、再度、15 mL のコニカルチューブへ戻す。
- (6) やさしく数回、転倒混和する。
- (7) 220 $\times g$ で 5 分間遠心する。
- (8) 上清を取り除く。
- (9) 細胞ペレットを 1 mL の **Culture Medium** に懸濁する。
- (10) 細胞懸濁液 20 μL に、0.05 % トリパンブルー液 180 μL を加え、細胞数と生存率を確認する。
- (11) 2.5×10^5 cells/mL となるよう、**Culture Medium** で懸濁する。
- (12) 0.6 mL の **Culture Medium** をプレートウェルに添加する。
- (13) Insert に細胞懸濁液 100 μL を添加する。
- (14) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 条件下で培養する。
- (15) 2~3 日の頻度で培地交換する (プレートウェルの培地も交換する)。
TEER が 150 $\Omega \times \text{cm}^2$ に達してから 3~4 日以内に Permeability Study を実行してください。

4. 注意事項

本製品の使用方法に関してご不明な点がございましたら、下記までお問合せ下さい。

株式会社ジェノメンブレン

〒230-0052

神奈川県横浜市鶴見区生麦 2-3-18

イシカワ EMC 研究所ビル 3 階

TEL: 045-508-2326

FAX: 045-716-8884

URL: <http://www.genomembrane.com/>

E-mail: info@genomembrane.com