

MDR1 発現 LLC-PK1 細胞プレートの取り扱い 及び 試験方法

本プロトコールは、human MDR1 を安定発現させた LLC-PK1 細胞プレート製品を用いた被験化合物の双方向性輸送試験、あるいは対照基質に対する阻害活性を測定するためのプロトコールです。

MDR1 発現 LLC-PK1 細胞プレート

Human MDR1/LLC-PK1 細胞	(Cat. No. GM4016, -24)
Mock/LLC-PK1 細胞	(Cat. No. GM4017, -24)

目次

1. はじめに.....	3
2. 細胞プレートの取り扱い.....	3
3. 培養細胞プレート製品 (キット) 内容.....	3
4. 使用機器および試験材料.....	4
4.1 機器.....	4
4.2 試験材料.....	4
5. 到着後の操作.....	4
6. 試験手順.....	4
6.1 取込み試験.....	5
6.1.1. 薬液の調製.....	5
6.1.2. アッセイの手順.....	5
6.2 阻害試験.....	5
6.2.1. 薬液の調製.....	5
6.2.2. 被験化合物含有アッセイ用培地及び陽性対照阻害剤含有アッセイ用培 地の調製.....	6
6.2.3. アッセイの手順.....	6
7. データ解析.....	7
7.1 取込み試験.....	7
7.2 阻害試験.....	8
8. 推奨基質およびラジオアイソトープ標識化合物.....	8
9. 注意事項.....	8

1. はじめに

本培養細胞プレートは、human MDR1 を安定的に発現させた LLC-PK1 細胞株を、transwell plate に播種した状態でお届けする Ready-to-Use キットです。

本製品は、被験化合物の双方向性の輸送を測定することで輸送活性を評価することが可能です。また、ラジオアイソトープで標識した対照基質を用いて、それに対する被験化合物の阻害活性を評価する際にも使用することができます。

以下に本製品の取扱い方法、及び本製品を用いた試験方法を記載しております。

2. 細胞プレートの取り扱い

本製品の最適使用期間は、製品が到着した翌日から2日間となります(詳細は各データシートをご覧ください)。

本製品到着後は、本プロトコールの「5. 到着後の操作」をご参照の上、培地を交換して、ご使用日まで 37 °C の CO₂ インキュベーターにて培養して下さい。

3. 培養細胞プレート製品 (キット) 内容

◆ 細胞プレート (12 or 24 ウェルプレート)

- ・全てのインサートに細胞を播種し、本製品の到着翌日および翌々日に最適使用状態になるよう調製されております。
- ・室温でゲル化する培地を使用しております。到着後、速やかに 37 °C CO₂ インキュベーターに入れて下さい。到着当日の培地交換は必要ありません。

◆ 培養用培地

- ・本製品到着後、4 °C で保存し、使用時に 37 °C にして下さい。
- ・無菌操作でご使用下さい。

◆ アッセイ用培地

- ・本製品到着後、4 °C で保存し、使用時に 37 °C にして下さい。
- ・本細胞培養液は抗生物質を含んでおりません。
- ・必要に応じて無菌操作でご使用下さい。

4. 使用機器および試験材料

4.1 機器

- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ マイクロピペット
- ・ クリーンベンチ、もしくは安全キャビネット
- ・ ホットプレート
- ・ 液体シンチレーションカウンター

4.2 試験材料

- ・ ピペット、チップ
- ・ 希釈、調製用の容器(チューブなど)
- ・ 液体シンチレーションカクテルおよび測定用バイアル

5. 到着後の操作

本製品到着後、直ちにプレート梱包容器より取り出し、以下のように処理して下さい。

1. プレートをクリーンベンチ、あるいは安全キャビネット内へ移す。
2. プレート側面のシールをカッター等で処理する。
3. 37 °C の CO₂ インキュベーターで培養する。
4. **翌日以降**、必要に応じて以下の手順で培地交換を行う。
 - 1) インサートの隙間から、先端にチップをつけたアスピレーティングピペットでプレートの各ウェルの培地を吸引後、インサートの培地を吸引する。インサートのメンブレンは破れやすいので、ピペット先端がウェルに接着しないよう注意する。
 - 2) インサートを持ち上げ、アスピレーティングピペットで再度残っている培地を吸引する。
 - 3) インサートに培地を 0.4 mL (12-well)、0.2 mL (24-well) 添加後、プレートの各ウェルに 1.4 mL (12-well)、0.7 mL (24-well) 添加する。インサートの培地を先に添加することにより、漏れの確認を行う。
5. 試験に使用するまで、37 °C の CO₂ インキュベーターで培養する。

6. 試験手順

試験当日、アッセイ用培地を用いて培地交換を行い、1 時間以上培養を行ってから試験を行う。

Note *Mannitol 等のパラセルラーマーカを用いてタイトジャンクションの形成を確認する。

6.1 取込み試験

6.1.1. 薬液の調製

- 1) 被験化合物溶液の調製
被験化合物及び陽性対照基質を2倍濃度になるようにアッセイ用培地で適宜調製する。
- 2) Mannitol 溶液の調製
1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ となるよう D-Mannitol, [1- ^{14}C]含有アッセイ用培地を調製する。
- 3) 1) で調製した溶液と 2) で調製した溶液を等量で混合する。試験実施まで、37 $^{\circ}\text{C}$ に保温する。

6.1.2. アッセイの手順

- 1) 【Apical to Basolateral (A to B)の輸送を検討する場合】
 - ① 培養上層を慎重に吸い取り、あらかじめ 37 $^{\circ}\text{C}$ で保温しておいた薬液を 0.4 mL (12-well)、0.2 mL (24-well)、細胞を剥がさない様に慎重に添加して反応を開始する。
 - ② CO_2 インキュベーター内で保温し、一定時間後、下層より 50 μL (12-well)、20 μL (24-well) ずつサンプリングを行う。その際、下層に 50 μL (12-well)、20 μL (24-well) の新鮮なアッセイ用培地を添加し補充する。
- 2) 【Basolateral to Apical (B to A)の輸送を検討する場合】
 - ① 培養下層を慎重に吸い取り、あらかじめ 37 $^{\circ}\text{C}$ で保温しておいた薬液を 1.4 mL (12-well)、0.7 mL (24-well)、慎重に添加して反応を開始する。
 - ② Transwell を CO_2 インキュベーター内で保温し、一定時間後、上層より 50 μL (12-well)、20 μL (24-well) ずつサンプリングを行う。その際、上層に 50 μL (12-well)、20 μL (24-well) の新鮮なアッセイ用培地を添加し補充する。
- 3) サンプリングした各試料に液体シンチレーションカクテル添加後、攪拌し、液体シンチレーションカウンターで H-dpm 値及び C-dpm 値を測定する。

6.2 阻害試験

6.2.1. 薬液の調製

- 1) 対照基質溶液の調製
対照基質を最終濃度の4倍濃度になるようにアッセイ用培地で調製する。
- 2) 被験化合物溶液及び陽性対照阻害剤溶液の調製
被験化合物及び陽性対照阻害剤を最終濃度の4倍濃度になるようにアッセイ用培地で調製する。
- 3) 1) で調製した溶液と 2) で調製した溶液を等量で混合する。
- 4) Mannitol 溶液の調製
1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ となるよう D-Mannitol, [1- ^{14}C]含有アッセイ用培地を調製する。
- 5) 3) で調製した溶液と 4) で調製した Mannitol 溶液を等量で混合する。試験実施まで、37 $^{\circ}\text{C}$ に保温する。

6.2.2. 被験化合物含有アッセイ用培地及び陽性対照阻害剤含有アッセイ用培地の調製

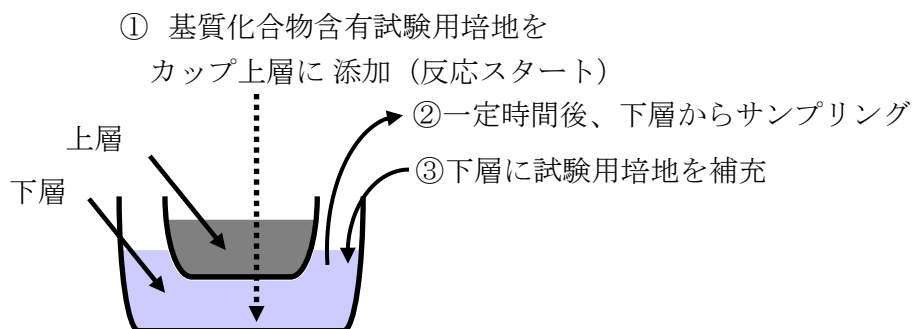
被験化合物及び陽性対照阻害剤を最終濃度になるようにアッセイ用培地で調製する。

6.2.3. アッセイの手順

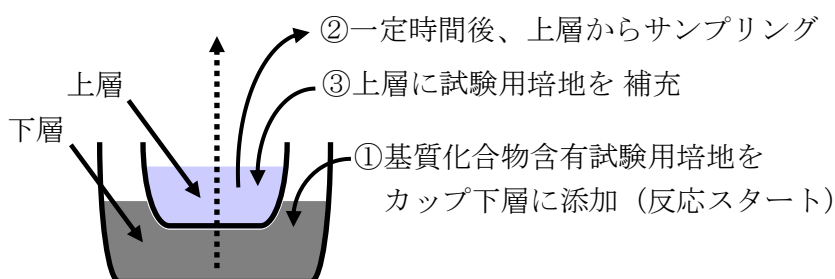
- 1) 上層、下層をピペットマンで慎重に吸い取り、あらかじめ 37 °C で保温しておいた **6.2.2. 被験化合物含有アッセイ用培地及び陽性対照阻害剤含有アッセイ用培地** を慎重に添加し、20 分間のプレインキュベーションを行う。
- 2) **【Apical to Basolateral (A to B) の輸送を検討する場合】**
 - ① 培養上層を慎重に吸い取り、あらかじめ 37 °C で保温しておいた薬液を 0.4 mL (12-well)、0.2 mL (24-well)、細胞を剥がさない様に慎重に添加して反応を開始する。
 - ② Transwell を CO₂ インキュベーター内で保温し、一定時間後、下層より 50 µL (12-well)、20 µL (24-well) ずつサンプリングを行う。その際、下層に 50 µL (12-well)、20 µL (24-well) の新鮮なアッセイ用培地を添加し補充する。
- 3) **【Basolateral to Apical (B to A) の輸送を検討する場合】**
 - ① 培養下層を慎重に吸い取り、あらかじめ 37 °C で保温しておいた薬液を 1.4 mL (12-well)、0.7 mL (24-well)、慎重に添加して反応を開始する。
 - ② Transwell を CO₂ インキュベーター内で保温し、一定時間後、上層より 50 µL (12-well)、20 µL (24-well) ずつサンプリングを行う。その際、上層に 50 µL (12-well)、20 µL (24-well) の新鮮なアッセイ用培地を添加し補充する。
- 4) サンプリングした各試料に液体シンチレーションカクテル添加後、攪拌し、液体シンチレーションカウンターで H-dpm 値及び C-dpm 値を測定する。

【薬剤輸送実験の概略】

Apical to Basolateral (A to B の場合)



Basolateral to Apical (B to A の場合)



7. データ解析

7.1 取込み試験

1) 累積透過量 Q_N [dpm/well] の計算

① Apical to Basolateral (A to B)

$$\begin{aligned} Q_N \text{ (A to B) [dpm/well]} \\ &= C_N / X \text{ [dpm/}\mu\text{L]} \times V_B \text{ [}\mu\text{L/well]} + C_{N-1} + C_{N-2} + C_{N-3} + \dots \\ &= C_N / X \text{ [dpm/}\mu\text{L]} \times V_B \text{ [}\mu\text{L/well]} + \Sigma C_{N(N=1 \sim N-1)} \end{aligned}$$

② Basolateral to Apical (B to A)

$$\begin{aligned} Q_N \text{ (B to A) [dpm/well]} \\ &= C_N / X \text{ [dpm/}\mu\text{L]} \times V_A \text{ [}\mu\text{L/well]} + C_{N-1} + C_{N-2} + C_{N-3} + \dots \\ &= C_N / X \text{ [dpm/}\mu\text{L]} \times V_A \text{ [}\mu\text{L/well]} + \Sigma C_{N(N=1 \sim N-1)} \end{aligned}$$

C_N : 各測定値 [dpm/X μ L]
 N : サンプルングの回数
 X : サンプルングした量 (μ L)
 V_B : Basal の Volume (μ L)
 V_A : Apical の Volume (μ L)

2) Flux ratio = Q_N (B to A) / Q_N (A to B)

Note; Flux ratio は各時点でのデータを線形回帰分析した計算である。

3) Net flux ratio = Flux ratio (MDR1) / Flux ratio (Mock)

4) 透過性 [pmol/cm²] の計算

$$\begin{aligned} \text{Permeability [pmol/cm}^2\text{]} \\ &= Q_N \text{ [dpm/well]} / (2,220,000 \text{ [dpm/}\mu\text{Ci]} \times SA \text{ [}\mu\text{Ci/nmol]} \times 10^{-3}) / A \text{ [cm}^2\text{/well]} \end{aligned}$$

SA : 比活性

A : 培養面積 (12-well plate; 0.9 cm², 24 well plate; 0.3 cm²)

5) 透過係数 (cm/sec) の計算

$$\begin{aligned} \text{Permeability coefficient [cm/sec]} \\ &= \text{Permeability [pmol/cm}^2\text{]} \times 10^3 / t \text{ (sec)} / \text{基質の初濃度 (}\mu\text{M or pmol/}\mu\text{L)} \end{aligned}$$

7.2 阻害試験

被験化合物 (阻害剤) 非存在下での見かけの透過性 (pmol/cm²) を 100 % として被験化合物 (阻害剤) 存在下での見かけの透過性より % of Control を算出し、横軸に被験化合物 (阻害剤) の濃度、縦軸に % of Control を片対数グラフにプロットする。

$$\% \text{ of Control} = \frac{\text{被験化合物 (阻害剤) 存在下での } P_{\text{app}}}{\text{化合物 (阻害剤) 非存在下での } P_{\text{app}}} \times 100$$

P_{app} : 見かけの透過性

得られたグラフを最小二乗法の回帰式を用いて、50 % 阻害率 (IC₅₀) を算出する。別途求めた K_m 値から、以下の式で阻害定数 (K_i) が求められる。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S] / K_m} \quad \begin{array}{l} K_m : \text{ミカエリス定数} \\ [S] : \text{対照基質の濃度} \end{array}$$

*通常、阻害試験における対照基質の濃度は K_m の 1/10 以下で行いますが、その条件下では $K_i \approx IC_{50}$ となります。

8. 推奨基質およびラジオアイソトープ標識化合物

トランスポーター名	基質	ラジオアイソトープ標識化合物
hMDR1	Digoxin	Digoxin, [3H(G)]- (Perkinelmer, #NET-222), etc.

*当社推奨の RI-ラベル体および非ラベル体基質の各濃度は製品添付のデータシートに記載しております。

*上記は、当社で使用している RI 化合物のメーカーおよび Cat.No. を記載しております。

9. 注意事項

本製品の用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