

SLC Transporter 培養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、以下の SLC トランスポーターを安定発現させた培養細胞プレート製品を用いた被験化合物の取り込み、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。

SLC 培養細胞プレート

Human OATP1B1 細胞	(Cat. No. GM4002-24, or -96)
Human OATP1B3 細胞	(Cat. No. GM4006-24, or -96)
Human OATP2B1 細胞	(Cat. No. GM4007-24)
Human OAT1 細胞	(Cat. No. GM4003-24, or -96)
Human OAT3 細胞	(Cat. No. GM4004-24, or -96)
Human OCT1 細胞	(Cat. No. GM4008-24, or -96)
Human OCT2 細胞	(Cat. No. GM4005-24, or -96)
Human OCTN1 細胞	(Cat. No. GM4009-12)
Human OCTN2 細胞	(Cat. No. GM4010-12)
Human PEPT1 細胞	(Cat. No. GM4011-12)
Human PEPT2 細胞	(Cat. No. GM4012-12)
Human NTCP 細胞	(Cat. No. GM4013-24)
Human MATE1 細胞	(Cat. No. GM4014-24)
Human MATE2K 細胞	(Cat. No. GM4015-24)
Mock 細胞	(Cat. No. GM4001-12, or -24, or -96)

目次

1. はじめに.....	3
2. 培養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
4.3 緩衝液 (×2) 組成.....	4
5. 到着後の操作.....	6
6. 試験手順.....	6
7. データ解析.....	8
7.1 取り込み試験.....	8
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.....	9
9. 注意事項.....	9

1. はじめに

本培養細胞プレートは、SLC トランスポーターを安定的に発現させた細胞株を、12-、24-、96-ウェルプレートに播種した状態でお届けする Ready-to-Use キット (Single use のみ) です。本製品の細胞株は、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞を用いて作製しております。

本製品は、細胞内に取り込まれた被験化合物を測定することにより、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. 培養細胞プレートの取扱い

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。

本製品を用いて試験を行う場合、ご使用になられる被験化合物によっては、HEK293 細胞の内因性トランスポーターによる輸送や非特異的吸着などにより、バックグラウンドが高くなる場合があります。このような場合、Mock 細胞プレートとの比較測定を行うことを推奨致します。

3. 培養細胞プレート製品 (キット) 内容

- ◆ 培養細胞プレート (12 / 24 / 96 ウェルプレート × 1 枚)

・全てのウェルに SLC トランスポーター発現細胞を播種し、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。

- ◆ 細胞培養液

・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。
・無菌操作でご使用下さい。

- ◆ 緩衝液 (×2)

・組成は「4.3 緩衝液 (×2) 組成」の項目をご確認下さい。
・本製品到着後、4 °C で保存して下さい。
・ご使用前に等量の蒸留水で希釈して下さい。

- ◆ 細胞溶解液 (1M NaOH 水溶液)
- ◆ 中和液 (1M HCl 水溶液)

キット添付の溶液と容量	12 ウェル	24 ウェル	96 ウェル
細胞培養液	25 mL		
緩衝液 (×2)	50 mL		
細胞溶解液 (1M NaOH 水溶液)	5 mL		10 mL
中和液 (1M HCl 水溶液)	5 mL		10 mL

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
- ・ 細胞観察用顕微鏡
- ・ 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
- ・ サーモコイン (LivingCell 製) など
細胞プレートの温度を一定に保つための補助板として、ホットプレートと細胞プレートとの間に挟んで使用
- ・ 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

4.3 緩衝液 (×2) 組成

緩衝液 (pH)	使用細胞
pH 6.0	Human PEPT1, PEPT2 細胞
pH 7.4	Human OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OCTN1, OCTN2, NTCP 細胞
*pH 7.4 → 8.0	Human MATE1 細胞
*pH 7.4 → 8.4	Human MATE2K 細胞

*MATE1 及び MATE2K 細胞は、最初の洗浄とプレインキュベーション (37 °C) は pH 7.4 緩衝液を使用し、被験化合物や対照基質などの添加 (37 °C) と停止反応 (氷冷) では指定の緩衝液を使用します。

● pH 7.4 緩衝液 (×2) 組成

(OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OCTN1、OCTN2 及び NTCP 細胞。MATE1 及び MATE2K 細胞に関しては洗浄とプレインキュベーションで使用)

250.0	mM	NaCl
9.6	mM	KCl
11.2	mM	D-(+)-glucose
2.4	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
2.4	mM	KH ₂ PO ₄
2.4	mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
50.0	mM	HEPES-NaOH

● pH 8.0 緩衝液 (×2) 組成

(MATE1 細胞の薬液と停止反応で使用)

250.0	mM	NaCl
9.6	mM	KCl
11.2	mM	D-(+)-glucose
2.4	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
2.4	mM	KH ₂ PO ₄
2.4	mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
50.0	mM	Tricine-NaOH

● pH 8.4 緩衝液 (×2) 組成

(MATE2K 細胞の薬液と停止反応で使用)

250.0	mM	NaCl
9.6	mM	KCl
11.2	mM	D-(+)-glucose
2.4	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
2.4	mM	KH ₂ PO ₄
2.4	mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
50.0	mM	Tricine-NaOH

● pH 6.0 緩衝液 (×2) 組成 (PEPT1, PEPT2 細胞)

250.0	mM	NaCl
9.6	mM	KCl
11.2	mM	D-(+)-glucose
2.4	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
2.4	mM	KH ₂ PO ₄
2.4	mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
50.0	mM	MES-NaOH

5. 到着後の操作

本製品到着後、直ちに培養細胞プレートを梱包容器より取り出し、以下のように処理して下さい。

- (1) 培養細胞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後、蓋をはずす。
- (3) <24 ウェルの場合>プレート上部を覆うシリコンキャップをはがす。
<12, 96 ウェルの場合> プレート上部を覆うシリコンラバー、及びシールをはがす。

- ・シールがプレートと強く接着していますのでご注意ください。(12, 96 ウェル)
- ・培養液がプレートから漏れていた際は、吸引等で除いた後、必要に応じてプレート周囲をエタノール等で殺菌して下さい。
- ・ウェルによっては輸送中の細胞の呼吸等により、培養液の色が若干異なる場合があります。CO₂ インキュベーターにて培養しますと、色ムラはなくなりま

- (4) 顕微鏡で細胞の接着及び形態を確認する。
仮足を広げていないものの、大多数の細胞がプレート底面に接着しています。
- (5) 数時間 37 °C の CO₂ インキュベーターで培養する。
- (6) 添付の細胞培養液 (12 ウェル→1.0 mL/well、24 ウェル→0.5 mL/well、96 ウェル→100 µL/well) を予め 37 °C で保温して、培地交換を行う。
- (7) 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

・試験条件は、各製品に添付されたデータシートを参考にして下さい

*緩衝液の pH にご注意ください。

特に **MATE1** 及び **MATE2K** では 2 種類使用します。

→ 項目 (2), (5), (7) では **pH 8.0 (MATE1)** あるいは **pH 8.4 (MATE2K)**、項目 (3), (4) では **pH 7.4** を使用します。

- ・取り込み試験中、ホットプレート、及び熱伝導率の良い補助板を使用して、細胞の温度を 37 °C に保って下さい。
- ・HEK293 細胞は、培養容器底面への接着が比較的弱い細胞です。培地や緩衝液を添加する際は、細胞に直接当たらないよう、壁面を伝わらせて静かに添加するようご注意ください。
- ・各手順にて使用する液量は下表を参照ください。

(1) 緩衝液の調製

同梱の緩衝液 (×2) を等量の蒸留水で希釈後、37 °C に保温する。

また、項目 (7) の洗浄操作で使用する緩衝液を必要量氷冷する。

(2) 薬液の調製

(i) 取込み試験の場合

被験化合物及び陽性対照基質を緩衝液で適宜調製する。試験の実施まで、37 °C に保温する。

(ii) 阻害試験の場合

① 対照基質溶液の調製

対照基質を最終濃度の2倍濃度になるように緩衝液で調製する。

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2倍濃度になるように緩衝液で調製する。

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。

- (3) 培養細胞プレートの各ウェルから培養液を除き、37 °Cに加温した緩衝液で細胞を洗浄する。
- (4) 緩衝液を除いた後、37 °Cに加温した緩衝液を加え、5分間プレインキュベートする。
- (5) プレインキュベートに使用した緩衝液を除き、(2) で用意し加温している薬液を加え、試験を開始する。
- (6) 任意の反応終了後、反応溶液を各ウェルから速やかに除く。
- (7) 氷冷した緩衝液を各ウェルへ添加後、速やかに除くことで、細胞を洗浄する。
この洗浄操作を速やかに3回行う。

* 細胞に直接緩衝液を当てないようにご注意ください。

* 操作(6)及び(7)を可能な限り速やかに行うことがポイントです。

- (8) 細胞溶解液を加え15分以上静置し、細胞を溶解させる。

* 顕微鏡で確認して細胞の溶解を確認してください。

- (9) 溶解した細胞液に中和液を加える。

- (10) 細胞溶解試料中の被験化合物を必要に応じて前処理して、定量する。

* 細胞溶解試料の一部はタンパク質定量にご使用下さい。12 ウェルは 150~350 µg/well、24 ウェルは 50~200 µg/well、96 ウェルは 10~50 µg/well 程度となります。タンパク質定量用のキットまたは試薬の添付書に従い、反応を行なってください。

1 ウェルに使用する試薬添加量

	12 ウェル	24 ウェル	96 ウェル
(3) 洗浄 (37 °C 緩衝液)	1.0 mL/well	0.5 mL/well	100 µL/well
(4) プレインキュベーション (37 °C 緩衝液)	1.0 mL/well	0.5 mL/well	100 µL/well
(5) 反応(37 °C 薬液)	0.5 mL/well	0.25 mL/well	50 µL/well
(7) 洗浄×3回 (4 °C 緩衝液)	1.0 mL/well	0.5 mL/well	100 µL/well
(8) 細胞溶解液	300 µL/well	150 µL/well	75 µL/well
(9) 中和液	300 µL/well	150 µL/well	75 µL/well

7. データ解析

7.1 取り込み試験

細胞内に取り込まれた被験化合物量 (mol) を、用いたタンパク質量 (mg) および反応時間 (min) で割ることにより、被験化合物の取り込み速度 (mol/mg/min) を算出します。被験化合物の取込み速度を被験化合物の濃度 (mol/L) で除することにより取込み容量 (L/mg/min) が算出されます。

また K_m 、 V_{max} は、被験化合物の濃度希釈系列の時間依存性取り込み曲線 (タイムコース) から求めた各濃度における初速度を縦軸に、横軸に被験化合物濃度をプロットし、ミカエリス・メンテン式から算出します。

7.2 阻害試験

被験化合物 (阻害剤) 非存在下での対照基質の取り込み量 (mol/mg/min) を 100% として、被験化合物 (阻害剤) 存在下での輸送活性残存率 (% of Control) を算出し、横軸に被験化合物 (阻害剤) の濃度、縦軸に輸送活性残存率 (% of Control) を片対数グラフにプロットします。

$$\text{輸送活性残存率 (\% of Control)} = \frac{\text{被験化合物 (阻害剤) 存在下での対照基質の取込み量}}{\text{被験化合物 (阻害剤) 非存在下での対照基質の取込み量}} \times 100$$

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 (IC_{50}) を算出します。

また、別途求めた K_m 値から、以下の式で阻害定数 (K_i) が求められます。

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

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

SLC 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
hOATP1B1 hOATP1B3	Estradiol-17 β -D-glucuronide	Estradiol-17 β -D-glucuronide, [Estradiol-6,7-3H(N)]- (American Radiolabeled Chemicals Inc., #ART1320), etc
hOATP2B1 hOAT3	Estrone-3-sulfate	Estrone Sulfate, Ammonium Salt, [6, 7- ³ H(N)]- (PerkinElmer, #NET-203), etc
hOAT1	<i>p</i> -aminohippuric acid	Aminohippuric acid, <i>p</i> -[Glycyl-2- ³ H]- (PerkinElmer, #NET-053), etc
hOCT1 hOCT2	Metformin	Metformin hydrochloride [biguanido- ¹⁴ C] (1,1-Dimethylguanide hydrochloride ¹⁴ C) (American Radiolabeled Chemicals Inc., #ARC1738), etc
hOCTN1 hOCTN2 hMATE1 hMATE2K	Tetraethylammonium	Tetraethylammonium Bromide, [ethyl 1- ¹⁴ C]- (ARC, #ARC0577), etc
hPEPT1 hPEPT2	Glycylsarcosine	Glycylsarcosine, [³ H] (Moravek, #MT-1545), etc
hNTCP	Taurocholic acid	Taurocholic acid, [³ H(G)] (PerkinElmer, #NET-322), 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

本製品の使用に当たっては、あらかじめ弊社と「培養細胞プレート売買に関する覚書」を締結していただく必要がございます。詳細に関しましては、弊社(下記)までお問い合わせ下さい。なお、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
TEL: 045-508-2326
FAX: 045-716-8884
URL: <http://www.genomembrane.com/>
E-mail: info@genomembrane.com