

TRANSPORT (G) Cells

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一時的に発現させた細胞株製品の取り扱い及び細胞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。

• TRANSPORT Cells

Human OATP1B1 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1102G)
Human OATP1B3 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1106G)
Human OAT1 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1103G)
Human OAT3 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1104G)
Human OCT1 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1108G)
Human OCT2 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1105G)
Human MATE1 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1114G)
Human MATE2K (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1115G)
Human NTCP (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1113G)
Human OATP2B1 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1107G)
Human OATP1A2 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1116G)
Human OCT3 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1118G)
Rat Ntcp (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1120G)
Rat Oatp1a4 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1121G)
Rat Oatp1b2 (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1122G)
Mock (G)	(GenoMembrane, Cat. No. GM1101G)

• Reagent Kit for TRANSPORT Cells (GenoMembrane, Cat. No. GM1050)

目次

1. はじめに	3
2. 製品内容	3
2.1 TRANSÍPORT Cells.....	3
2.2 Reagent Kit for TRANSÍPORT Cells.....	3
3. 試薬、使用機器、消耗品	4
3.1 試薬	4
3.2 機器	4
3.3 消耗品	4
4. 試験方法	5
4.1 細胞の播種	5
4.2 アッセイ	6
5. データ解析	7
5.1 取込み試験	7
5.2 阻害試験	8
6. 推奨基質及びラジオアイソトープ標識化合物	9

1. はじめに

TRANS \dot{I} PORT (G) Cells は、HEK293 細胞に SLC トランスポーターを一過性に過剰発現させた製品です。本製品を用いて細胞内に取り込まれた 1) ラジオアイソトープ標識化合物、2) 蛍光標識化合物、3) 非標識化合物の量を目的に合わせた検出器、1) 液体シンチレーションカウンター、2) 蛍光プレートリーダーあるいは 3) LC-MS などで測定することにより、SLC トランスポーターの輸送活性を評価することが可能です。

ご使用になる化合物によっては HEK293 細胞の内因性の輸送活性や非特異的な吸着などによりバックグラウンドの測定値が高くなる場合がありますので、陰性対象として Mock (Cat.No. GM1101G) を使用する事を推奨いたします。

2. 製品内容

2.1 TRANS \dot{I} PORT (G) Cells

- 9.6-14.4 × 10⁶ 個の細胞が 1 mL の凍結保存培地に保存されています。
- 液体窒素下で保存してください。

以下のプロトコールに従って試験を行った場合、1 バイアルで 24-well プレートあるいは 96-well プレート 1 枚分の試験を行う事ができます。

- 製品データシート

2.2 Reagent Kit for TRANS \dot{I} PORT Cells

- Culture Medium
- Transport Buffer (pH7.4, pH8.0, pH8.4)
 - 使用期限は購入後 3 ヶ月です。
 - 2~8 °C で保存してください。

3. 試薬、使用機器、消耗品

3.1 試薬

- ・ Reagent Kit for TRANSPORT Cells (GenoMembrane, GM1050)
- ・ 1M NaOH (ナカライテスク, 37421-05, etc.)
- ・ 1M HCl (ナカライテスク, 37314-15, etc.)
- ・ タンパク質定量用試薬 (PIERCE, 23225, etc.)

3.2 機器

- ・ CO₂ インキュベータ
- ・ 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
- ・ ホットプレート
- ・ マイクロピペット、電動ピペッターなど

3.3 消耗品

- ・ ポリリシンコート 24-well プレート (Corning, 356414, etc.)
- ・ ポリリシンコート 96-well プレート (Corning, 356461, etc.)

Note; ポリリシンコート以外のプレートをご使用になりますと、細胞が剥がれることがございます。ポリリシンコートをお使いになる事を推奨いたします。

- ・ ピペット、チップ、コンカルチューブなど

3.4 OATP1A2 用アッセイバッファー

Reagent Kit for TRANSPORT Cells には OATP1A2 のアッセイの際に必要な pH6.0 のバッファーが含まれておりませんので以下のように作製してください。

[pH 6.0]

Reagent	Final Concentration	Amount (g or mL)
10x HBSS	1x	50 mL
MES	25 mM	2.666 g
Milli-Q Water		Appropriate volume
Total Volume		500 mL

- ・ 10x HBSS (Gibco, 14068056, etc.)
- ・ MES (ナカライテスク, 02442-44, etc.)

4. 試験方法

Note; HEK293 細胞は、培養容器底面への接着が比較的弱い細胞です。Culture Medium や Transport Buffer 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。

4.1 細胞の播種

すべての操作を安全キャビネット内で行ってください。

- (1) Culture Medium を 37 °C に温める。
- (2) 50 mL のコニカルチューブに温めた 9 mL の Culture Medium を入れる。
- (3) バイアルをウォーターバスへ入れ、~50 %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 Culture Medium を入れた 50 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、50 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 × 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 15 mL の Culture Medium に懸濁する。

* 遠心操作を行わずに播種する事も可能です。その場合は(2)~(9)の代わりに以下の操作を行ってください。

- i 50 mL のコニカルチューブに温めた 14 mL の Culture Medium を入れる。
 - ii バイアルをウォーターバスへ入れ、~50 %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。
 - iii 14 mL の Culture Medium を入れた 50 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。
 - iv iii の細胞懸濁液 1 mL でバイアルを洗い、再度、50 mL のコニカルチューブへ戻す。
 - v ピペットでよく懸濁する。
- (10) ポリリシンコート 24-well プレートの場合は 500 μL ずつ、あるいはポリリシンコート 96-well プレートの場合は 125 μL ずつ播種する。

Note; ポリリシンコート以外のプレートをご使用になりますと、細胞が剥がれることがございます。ポリリシンコートをお使いになる事を推奨いたします。

- (11) やさしく揺すり、細胞をウェル内に均一にする。
- (12) 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養する。
- (13) 3~4 時間後、培地交換を行う。
- (14) CO₂ インキュベータに戻し、アッセイを行うまで 18~30 時間培養する。

4.2 アッセイ

Note;

- 取り込み試験中はホットプレート、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。
- **Transport Buffer の pH** にご注意ください。
以下のトランスポーターでは2種類のバッファーを使用します。
 - * いずれのトランスポーターもプレインキュベーション; 項目(2), (3) では **pH 7.4** を使用します。
 - * 薬液; 項目 (1), (4), (6) では下記に記載のバッファーをご使用ください。
 - **MATE1 (GM1114G) : pH 8.0**
 - **MATE2K(GM1115G) : pH 8.4**
 - **OATP1A2 (GM1116G) : pH 6.0** (* Reagent Kit には含まれておりません)

(1) 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 **Transport Buffer** で適宜調製する。試験の実施まで、37 °C で保温する。

(ii) 阻害試験の場合

① 典型基質溶液の調製

典型基質を最終濃度の2倍濃度になるように **Transport Buffer** 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 **Transport Buffer** 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し、試験実施まで、37 °C で保温する。

Note; 化合物の溶解に有機溶媒を用いる場合には最終濃度に気を付けてください。
DMSO を用いる場合には0.5%まではアッセイに影響がありません。

- (2) 細胞を播種したプレートの各ウェルから **Culture Medium** を除き、37 °C に加温した **Transport Buffer** (24-well plate: 500 µL, 96-well plate: 200 µL) で細胞を洗浄する。
- (3) **Transport Buffer** を除いた後、37 °C に加温した **Transport Buffer** (24-well plate: 500 µL, 96-well plate: 200 µL) を加え、5~10 分間プレインキュベーションする。
 - プレインキュベーションの時間が活性に影響を及ぼすことがありますので、時間はできるだけ揃えて試験を行ってください。
- (4) プレインキュベーションに使用した **Transport Buffer** を除き、(1) で用意し加温している薬液 (24-well plate: 250 µL, 96-well plate: 100 µL) を加え、試験を開始する。
- (5) 任意の反応終了後、薬液を各ウェルから速やかに除く。
- (6) 氷冷した **Transport Buffer** (24-well plate: 500 µL, 96-well plate: 200 µL) 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 **Transport Buffer** を当てないようにご注意ください。
 - 操作 (5) 及び (6) を可能な限り速やかに行うことがポイントです。

(7) 細胞溶解試料中の化合物量を必要に応じて前処理して、定量する。

(参考例)

【液体シンチレーションカウンターで測定する場合】

- a. **1M NaOH** (24-well plate: 150 μ L, 96-well plate: 75 μ L) を加え 15 分以上静置し、細胞を溶解させる。
 - 顕微鏡で細胞の溶解を確認してください。
- b. 溶解した細胞液に **1M HCl** (24-well plate: 150 μ L, 96-well plate: 75 μ L) を加える。
* 細胞溶解試料の一部はタンパク質定量にご使用下さい。50~200 μ g/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。

【LCMS で測定する場合】

24-well

- a. 各ウェルに超純水 100~200 μ L を加える
- b. セルスクレーパーを用いて細胞を掻き取る。
- c. 全量をマイクロチューブに回収する。
- d. ソニケーターを用いて細胞を氷上で破碎する。
- e. 細胞破碎液の一部を新しいマイクロチューブに分取し、等量のアセトニトリルを加えてよく混合する。(残りの細胞破碎液を用いてタンパク質定量をする)
- f. 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで 10 分遠心する。
- g. 上清を LC-MS/MS にて分析する。

96-well

- a. 各ウェルに 50% アセトニトリル 150 μ L を加えて室温で 20 分静置する。
- b. 550 \times g、4 $^{\circ}$ Cで 10 分遠心する。
- c. 上清を LC-MS/MS にて分析する。
* タンパク質定量用のウェルを用意するかアセトニトリルの影響が出なくなるまで細胞溶解液を希釈した後にタンパク質定量を実施してください。

5. データ解析

5.1 取込み試験

細胞内に取り込まれた被験化合物量 (pmol/well) を、用いたタンパク質量 (mg/well) 及び反応時間 (min) で割ることにより、被験化合物の取込み速度 (pmol/min/mg protein) 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 (μ mol/L) で除することにより取込み容量 (CL_{uptake} : μ L/min/mg protein) が算出されます。

また K_m (ミカエリス・メンテン定数)、 V_{max} (最大反応速度) は、以下の計算式より求めることができます。

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad [S]: \text{基質の濃度}$$

5.2 阻害試験

IC₅₀ (50 %阻害濃度) は以下の計算式より求めることができます。

$$CL_{\text{uptake (+Inhibitor)}} = \frac{CL_{\text{uptake (control)}}}{1 + [I]/IC_{50}} \quad [I]: \text{阻害剤の濃度}$$

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。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_m}$$

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 ≒ IC₅₀ となります。

6. 推奨基質

トランスポーター名	基質	Cat.No.
hOATP1B1 hOATP1B3	Estradiol-17 β -D-glucuronide	<ul style="list-style-type: none"> • Estradiol-17β-D-glucuronide, [Estradiol-6,7-³H(N)]- (American Radiolabeled Chemicals Inc., #ART1320), etc. • β-Estradiol 17-(β-D-glucuronide) sodium salt (Sigma, #E1127), etc.
hOAT3 hOAT4 hOATP2B1 hOATP1A2	Estrone-3-sulfate	<ul style="list-style-type: none"> • Estrone Sulfate, Ammonium Salt, [6, 7-³H(N)]- (PerkinElmer, #NET-203), etc. • Estrone 3-sulfate potassium salt (Sigma, #E9145), etc.
hOAT1	<i>p</i> -aminohippuric acid	<ul style="list-style-type: none"> • Aminohippuric acid, <i>p</i>-[Glycyl-2-³H]- (PerkinElmer, #NET-053), etc. • <i>p</i>-Amino hippuric acid (Sigma, #A1422), etc.
hOCT2 hMATE1 hMATE2K	Metformin	<ul style="list-style-type: none"> • Metformin hydrochloride [biguanido-¹⁴C] (1,1-Dimethylguanide hydrochloride ¹⁴C) (American Radiolabeled Chemicals Inc., #ARC1738), etc. • Metformin hydrochloride (Sigma, #D5035), etc.
hOCT1	Tetraethylammonium	<ul style="list-style-type: none"> • Tetraethylammonium Bromide, [ethyl 1-¹⁴C]- (American Radiolabeled Chemicals Inc., #ARC0577), etc. • Tetraethylammonium Chloride (Sigma, #T2265), etc.
hNTCP rNtcp rOatp1a4 rOatp1b2	Taurocholic acid	<ul style="list-style-type: none"> • Taurocholic acid, [³H(G)] (PerkinElmer, #NET-322), etc. • Taurocholic acid sodium salt hydrate (Sigma, #T4009), etc.
hOCT3	ASP (4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium)	<ul style="list-style-type: none"> • 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium (Sigma, #D3418), etc.

*上記は、当社で使用している化合物の Cat.No.を記載しております。