

実験試料・資材

品目	製品名	製造元・販売元
細胞	iCell® Hepatocytes2.0 [554-33361又は557-33351又は558-33521]	FUJIFILM Cellular Dynamics (富士フィルム和光純薬)
培地	D-MEM/Ham's F-12培地(フェノールレッド不含) [045-30665]	富士フィルム和光純薬
	NSサプリメント(50x)[146-09351]	富士フィルム和光純薬
	Dexamethasone [047-18863]	富士フィルム和光純薬
	Gentamycin [598-04531]	富士フィルム和光純薬
	Oncostatin M [153-02101]	富士フィルム和光純薬
	Geltrex	サーモフィッシュャー
培養プレート	I WAKI コラーゲンコート 6ウェルプレート	AGC
	Prime Surface 96ウェルスリットウェルプレート	住友ベークライト
観察プレート	Prime Surface 96ウェルU底プレート	住友ベークライト
細胞剥離液	Stem Pro Accutase Cell Dissociation Reagent	サーモフィッシュャー
	D-PBS(-) [045-29795]	富士フィルム和光純薬
固定液	4%PFA(パラホルムアルデヒド) -リン酸緩衝液(PBS) [161-20141]	富士フィルム和光純薬
透明化試薬	SCALEVIEW-S4 [194-18561]	富士フィルム和光純薬
	SCALEVIEW-S0 [196-18521]	富士フィルム和光純薬
	SCALEVIEW-A2 [193-18455]	富士フィルム和光純薬
	deScale Solution [041-34425]	富士フィルム和光純薬
	原素 [210-01185]	富士フィルム和光純薬
	Polyoxyethylene(10)octylphenylether (Triton X-100) [160-24751]	富士フィルム和光純薬
抗体染色	抗ABC11-ウサギポリクローナル抗体(一次抗体) [NBP1-89319]	Novus Biologicals, LLC. (富士フィルム和光純薬)
	抗ウサギIgG(H+L) FITC-conjugated (二次抗体) [521-33351]	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc (富士フィルム和光純薬)
	7.5(w/v)% アルブミン-D-PBS(-)溶液 [012-23881]	富士フィルム和光純薬

* □ 内は富士フィルム和光純薬のコード番号を示す。

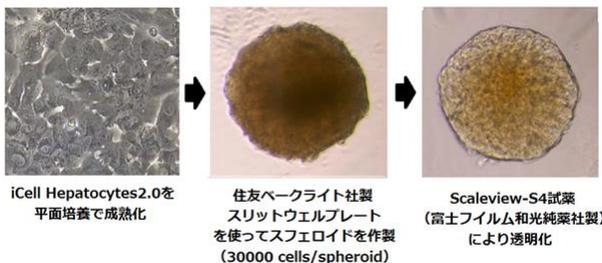
培地の調製

2次元培養(播種)用培地		
構成要素	容量 (ml)	最終濃度
DMEM/F-12 Medium, No Phenol Red	98	98%
NS Supplement, 50X	2	1X
Dexamethasone, 5 mM	0.002	0.1 μM
Gentamicin, 50 mg/ml	0.05	25 μg/ml
Oncostatin M, 10 μg/ml	0.2	20 ng/ml

スフェロイド維持用培地

構成要素	容量 (ml)	最終濃度
DMEM/F-12 Medium	98	98%
NS Supplement, 50X	2	1X
Dexamethasone, 5 mM	0.002	0.1 μM
Gentamicin, 50 mg/ml	0.05	25 μg/ml

* この他に、Geltrexを20%加えたものも調製する。



スリットウェルプレートで作製→透明化→抗体染色したスフェロイドを観察のため96ウェルU底プレートに移す。

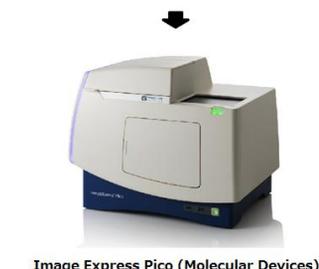
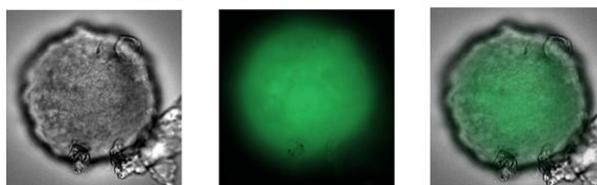


Image Express Pico (モレキュラーデバイス社製) による観察



明視野

FITC

明視野+FITC

* BSEP抗体+二次抗体

細胞の播種

- iCell Hepatocytes2.0の凍結バイアルを37℃, 3分で解凍し, 37℃にした10mLの播種用培地に入ったチューブに注ぐ。
- 1mLの播種用培地でバイアルチューブを洗い, 細胞の入ったチューブに入れる。
- 細胞入りチューブを遠心する。(200xg or 1000rpm, 3分, 室温)
- 上清を除き, 2mLの37℃播種用培地をゆっくり加えて細胞を懸濁する。
- 細胞数を数えて適当な2D (コラーゲンIコート) プレートに播種する。
(細胞密度は 3×10^5 viable cells/cm²)
- 3~4時間, 37℃ 5%CO₂のインキュベーターに静置し, その後ゆっくりと静かにピペッターを使って(播種用培地で)培地交換する。
- 毎日培地交換し, 5日間培養する。

3Dプレートへの播種

- 適量の維持用培地とD-PBSを室温に戻しておく。
→Application Protocol参照のこと
- 2Dプレートから古い培地を除き, 適量のD-PBSで洗う。
- 適量のAccutaseを加えて, 剥れ具合を顕微鏡で観察しながら2~4分室温に置く。
- (細胞が剥れたら) Accutaseを希釈するため適量の維持用培地を加える。
→細胞を十分に回収するためウェルの周辺を優しくピペティングする。
→剥れた細胞は無理に単一化しない。
- 細胞をチューブに回収し, 遠心で集める。(200xg or 1000rpm, 3分, 室温)
- 上清を注意深く取り除き, 適量の維持用培地で再懸濁する。
* 今回の場合, 70μL/1ウェル (96ウェル) で, 1ウェルに 3×10^4 cells になるよう播種した。細胞は維持用培地で懸濁した後に ECM (20%Geltrex)入り維持用培地とミックスしてから, スフェロイド用プレートに播種するので, 最終の細胞数の倍濃度になるよう懸濁した。
- 20%Geltrex入りスフェロイド維持用培地を調製し, リザーバー等で細胞懸濁液とミックスする。
- 140μL/ウェルを播種し, 室温で遠心する。(200xg or 1000rpm, 2分)
- 播種して2日でスフェロイドは形成されるが, 長期培養したい場合は2日おきにウェルの半量ずつ新しい培地に交換する。交換後は遠心する。

スフェロイドの透明化と抗体染色

- スリットウェルプレートから(ある程度)培地を抜き, 各ウェルを200μLのD-PBS(-)で2回洗う。
- D-PBS(-)を抜き, 今度は200μLの4%PFA/PBS溶液で2回洗う。
- 3回に加えた200μLの4%PFA/PBS溶液で3日間, 4℃で置く。
4%PFA/PBS溶液は1日ごとに交換する。[固定]
- その後SCALEVIEW-S0液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で4時間, 37℃で置く。[前処理1]
- その後SCALEVIEW-A2液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で4時間, 37℃で置く。[透過処理1]
- その後8M Urea溶液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で12時間, 37℃で置く。[透過処理2]
- その後SCALEVIEW-A2液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で4時間, 37℃で置く。[透過処理3]
- その後deScale Solution液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で6時間, 4℃で置く。[洗浄]
- その後1%アルブミン-D-PBS(-)溶液 (200μL) で2回洗った後, 3回目の溶液で2時間, 室温で置く。[ブロッキング]
- その後ブロッキング液をできるだけ抜き, 7.5%アルブミン-D-PBS(-)溶液で1/1000に希釈した1次抗体液を (200μL) 加え, 12時間程度, 37℃で置く。[1次抗体染色]
- その後1次抗体液を抜いてから, D-PBS(-)溶液 (200μL) で3回洗って7.5%アルブミン-D-PBS(-)溶液で1/5000に希釈した2次抗体液を (200μL) 加え, 2時間程度, 室温で置く。[2次抗体染色]
- その後2次抗体液を抜いてから, AbScale Solution溶液 (200μL) で2回洗って, 3回目の溶液で2時間, 室温で置く。その後溶液を1度抜き, 新たに加えて1時間, 室温で置く。[洗浄] [AbScale Solution: 0.33M Urea, 0.1%(w/v)Triton X-100 in PBS(-)]
- その後4%PFA/PBS溶液に置き換え1時間, 室温で置く。[再固定]
- その後deScale Solution溶液に置き換え3時間, 4℃に置く。[洗浄]
- その後SCALEVIEW-S4溶液に置き換え4時間, 37℃に置く。[透明化]
(この時スフェロイドがSCALEVIEW-S4溶液に浮き易くなるので, 180xgで2分間ぐらい遠心する。)
- 透明化-抗体染色が完了したスフェロイドは, 観察のため通常のU底プレート (96穴) に移す。

スリットウェルプレート(住友ベークライト社)

