



iGL Cell Line

[Code No. IGL01C]

July 2, 2020

I. Product description

The iGL cell line is established to stably express the fusion protein (Insulin–GLase) of human insulin and secretory *Gaussia* luciferase (GLase) using the rat pancreatic β -cell line, INS-1E, as the parental cell line. In iGL cells, glucose-responsive insulin secretion can be measured with high sensitivity using the luminescence activity of GLase¹. Furthermore, spheroids (three-dimensional cell cultures) of iGL cells are able to synchronize insulin secretion in the same manner as isolated rat pancreatic islets, and oscillatory insulin secretion can also be analyzed in real time using bioluminescence imaging¹.

II. Warranty

Cosmo Bio warrants that product (cells) will be viable until the expiration date and is valid only if the product is stored and cultured according to the information indicated in this product data sheet. Cosmo Bio has optimized the cell culture media formulation which is ideal for the product. While other, unspecified cell culture media may also produce satisfactory results, a change in cell culture media or the absence of an additive(s) from the recommended cell culture media may affect recovery, growth and/or function of the product. If an alternative cell culture medium formulation is used to culture the product, the Cosmo Bio warranty for cell viability is no longer valid.

III. Product component

Product name	Volume	Quantity	Storage method	Warranty period
iGL cell line	1 × 10 ⁶ cells/vial	1 vial	Store in liquid nitrogen	6 months

- Store frozen cells in liquid nitrogen if they are not to be used immediately after receipt.
- Cells are cryopreserved in COS banker (Cosmo Bio Co., Ltd., Product Code: COS-CFM01).
- Cells have been verified as negative for mycoplasma infection.

IV. Recommended culture medium (sold separately)

Product name	Product no.	Volume	Storage method	Validity period
iGL Culture Medium	IGLM	500 mL	Store at –20°C (store at 4°C after thawing)	Indicated on bottle (store at –20°C) 2 weeks after thawing (store at 4°C)

Medium composition

Basal medium: RPMI1640 (containing L-glutamine, phenol red, and HEPES)

Additives: 5% fetal bovine serum, 1 mM pyruvic acid, 500 μ M monothioglycerol, and 200 μ g/mL G-418

- The product can be refrozen only once.
- After thawing, we recommend dispensing the product into smaller quantities as required, and cryopreserving the remaining product.
- Repeated freezing and thawing, or heating, of the product will lead to significant deterioration of its quality.



V. Insulin secretion assay buffer (sold separately)

Product name	Product no.	Storage method	Validity period
KRH Buffer Set for iGL cell line	IGLB	Store at -20°C (store at 4°C after thawing)	Indicated on bottle (store at -20°C) 2 weeks after thawing (store at 4°C)
Set contents	2 mM glucose KRH buffer (50 mL) 20 mM glucose KRH buffer (50 mL) 1% bovine serum albumin (BSA) solution ($\times 100$, 1 mL)		

KRH buffer composition

130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.5 mM CaCl_2 , and 10 mM HEPES (pH 7.4).

VI. Origin of cells

The subclonal iGL cell line was obtained by introducing pJNC-hINS-GLuc (Insulin-GLase expression vector; JNC Corporation, jPhoton series, Product Code: P-101) into the INS-1E cell line (derived from rat insulinoma)¹⁾.

VII. Methods of use

This product is “capable of subculturing” using the method described in the reference²⁾ for the parental INS-1E cell line. Unless otherwise specified, all procedures should be performed under aseptic conditions at room temperature.

1) Thawing/seeding of cells

The following protocol describes the procedure for cells cultured in 100-mm dishes.

Materials

- Cell culture dish of 100-mm (TPP Corporation, Product Code: 93100, or Corning Incorporated, Product Code: 353003)
- iGL Culture Medium (Cosmo Bio Co., Ltd., Product Code: IGLM) (warmed to room temperature before use)

Protocol

1. Immediately thaw frozen cells in vials with gentle stirring in a water bath at 37°C .
2. Transfer the thawed cell suspension to a 50-mL centrifuge tube containing 9 mL of iGL Culture Medium and then rinse out the vial using iGL Culture Medium to collect all the cells.
3. Centrifuge the cells at $300 \times g$ for 5 min.
4. Remove the supernatant and resuspend the cell pellet in 10 mL of iGL Culture Medium.
5. Seed the cell suspension into a 100-mm dish and culture the cells in an incubator at 37°C in the presence of 5% CO_2 .
6. The day after seeding, replace with fresh medium and subsequently at a frequency of once every 3 to 4 days.

Subculturing is usually required around 7 to 10 days after seeding.



2) Subculturing of cells

The following describes the protocol for subculturing cells cultured in 100-mm dishes.

Materials

- 100-mm cell culture dish
- PBS(-)
- 0.05% trypsin-EDTA solution
- iGL Culture Medium (Cosmo Bio Co., Ltd., Product Code: IGLM)

Protocol

1. Remove culture dishes containing the cells to be subcultured (see Fig. 1) from the CO₂ incubator.
2. Aspirate the cell culture medium, then add 10 mL of PBS(-) to wash the dish and aspirate the PBS(-).
3. Add 1 mL of 0.05% trypsin-EDTA solution.
4. Leave the mixture to stand in the CO₂ incubator at 37 °C for 1 to 2 min.

*Trypsin treatments damage cells; therefore, monitor the degree of detachment under a microscope, and if almost all the cells are detached, perform the next step immediately.

5. Add 10 mL of iGL Culture Medium.
6. Gently perform pipetting and collect the cell suspension into a 50-mL centrifuge tube.
7. Take a sample of the cell suspensions and count the number of cells.
8. Seed the cells into a new 100-mm cell culture dish at a density of 1 to 2 × 10⁶ cells/dish.
9. Culture the cells in an incubator at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Replace the medium with fresh culture medium 3 to 4 days after seeding and subculture the cells after 1 week.

3) Preparation of cell stock

Materials

- Subculturing reagent (described above)
- COS banker (Cosmo Bio Co., Ltd., Product Code: COS-CFM01)
- Cell freezing container (CoolCell, BioCision. Product Code: BCS-170 or equivalent)
- Cryotubes

Protocol

1. Perform procedures 1–7 in the section 2) cell subculturing, and then centrifuge the cells at 300 × g for 5 min.
2. Remove the supernatant and suspend the cell pellet in COS banker (cell freezing medium) at a density of 1–2 × 10⁶ cells/mL.
3. Dispense 1–2 mL of cell suspension into cryotubes and cryopreserve the cells at –80°C using a cell freezing container.
4. Store the cryotubes in the container at –80°C for at least one day and then transfer the cryotubes into liquid nitrogen and store until required.



4) Method for glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in iGL cells

- Secretion of insulin into the cultured medium can be determined by measuring the luminescence activity of Insulin–GLase using a luminometer.
- For example, cells were cultured for 3 days in a 6-well plate and then stimulated with high glucose for 1 h. Optimal experimental conditions for GSIS assay will vary depending on cell density, culture time, and type of culture plate.
- Due to the ability of iGL cells to easily form pancreatic islet-like spheroids, culturing in an intercellular adhesion state for 4 to 5 days or more results in reduced adhesion of the cells to the culture plate. However, glucose responsiveness and insulin secretion from spheroids will be increased (Fig. 2).
- See the reference¹⁾ for details on glucose responsiveness.

Materials

- Coated 6-well plates (BioCoat poly-D-Lysine 6-well plate, Corning Incorporated, Product Code: 354413 or BioCoat Matrigel (Thin Layer) 6-well plate, Corning Incorporated, Product Code 354603, both supplied by Cosmo Bio Co., Ltd.)
- Subculturing reagent (described above)
- KRH Buffer Set for iGL cell line (Cosmo Bio Co., Ltd., Product Code: IGLB) consisting of 2 mM glucose KRH buffer, 20 mM glucose KRH buffer, and 1% BSA solution (×100)

Note that aseptic technique is not necessary during the GSIS procedures. The glucose stimulation is performed over a short period of time of up to 1 h.

The GSIS procedures require an extensive wash with 2 mM glucose KRH buffer; therefore, it is recommended to use a coated culture plate to improve cell adhesion.

Protocol

1. Perform procedures 1–7 in the section 2) cell subculturing.
2. Seed the cells in a coated 6-well plate at a density of $4\text{--}8 \times 10^5$ cells/well and then incubate the cells for 3 days in an incubator at 37 °C in the presence of 5% CO₂.

(Replace the medium every 3 to 4 days if cells are cultured for more than 3 days.)

3. Before starting the procedures, thaw the KRH Buffer Set for iGL cell line at room temperature, and add the BSA solution (×100) to the 2 mM glucose KRH buffer and the 20 mM glucose KRH buffer.
4. Wash the cells twice with 2 mL of 2 mM glucose–KRH buffer.

To measure luminescence activity in the pre-culture medium, take a sample of the medium before washing and place on ice (4°C).

Carefully wash the wells so as not to detach the cells.

5. To pretreat the cells with low glucose, add 2 mL of 2 mM glucose KRH buffer and incubate the cells for 1 h in an incubator at 37 °C in the presence of 5% CO₂.
6. Wash the cells 2–3 times with 2 mL of 2 mM glucose KRH buffer.

Confirm the luminescence activity of the Insulin–GLase secreted in the pre-culture medium is sufficiently reduced by washing to optimize the amount of solution and the washing times of cell



according to the experimental conditions.

Stimulation with high glucose for ≤ 10 min should be performed while maintaining the cells and KRH buffer at 37 °C.

7. Add 2 mL of 2 mM or 20 mM glucose KRH buffer and incubate the cells for 1 h in an incubator at 37°C in the presence of 5% CO₂.
8. Collect the supernatant into a microtube after culturing, and leave it to stand on ice. The luminescence assay for Insulin-GLase should be performed using the supernatant.

To remove the detached cells, centrifuge the supernatant at $300 \times g$ at 4 °C for 5 min and perform the assay using the centrifuged supernatant.

9. To measure the luminescence activity inside of the iGL cells, add 200 μ L of 1 \times Passive Lysis Buffer (Promega Corporation, Product Code: E1941, 5 \times solution) or the lysis buffer attached to the Coelenterazine (CTZ) Luciferase assay kit (JNC Corporation, Product Code: C-001-120) to the cells after collecting the supernatant, and perform pipetting to lyse the cells. Leave the cell lysate to stand on ice.

5. Measurement of luminescence activity of Insulin-GLase

Measure the luminescence activity as soon as possible after performing the GSIS procedures.

Materials

- Samples for the luminescence assay from GSIS procedures described above
- PBS(-)
- Substrate for assay: PBS(-) solution containing coelenterazine (CTZ, final concentration: 1–5 μ g/mL) from the Coelenterazine (CTZ) Luciferase assay kit (JNC Corporation, Product Code: C-001-120) or prepared from the CTZ reagent (JNC Corporation, Product Code: S-001)
- Luminometer for a single tube measurement (Atto Corporation, Product Code: AB-2270, etc.) or for a multi-well plate measurement (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Product Code: Centro LB960, etc.)
- Single tube (transparent polystyrene tube, etc.) or multi-well plate (e.g., white or black 96-well plate) for assay.

The following protocol describes the method for a single tube measurement using a luminometer.

Protocol

1. Dispense 100 μ L of PBS(-) solution containing CTZ (5 μ g/mL) into each measurement tube.
2. Add 10 μ L of the supernatant prepared in the GSIS procedures, and immediately place the resulting mixture in the luminometer and measure the luminescence activity for 5-10 s.

If the luminescence value exceeds the measurable quantitative limit of the luminometer, use a luminometer equipped with a neutral density filter or dilute the sample with PBS(-) containing 0.01% Tween20³.



VIII. Technical information

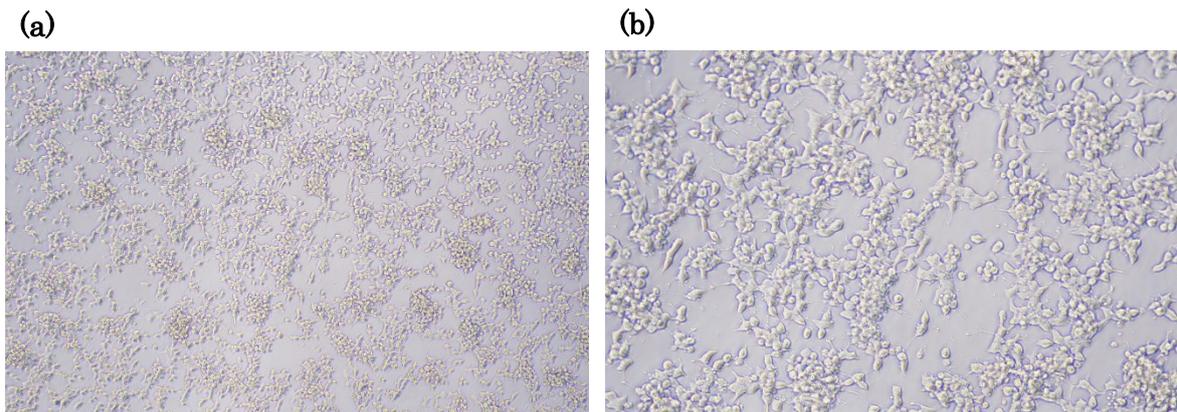


Figure 1. Phase-contrast microscopic image

Objective lens magnification: (a) $\times 10$, (b) $\times 20$. Scale bar = 100 μm .

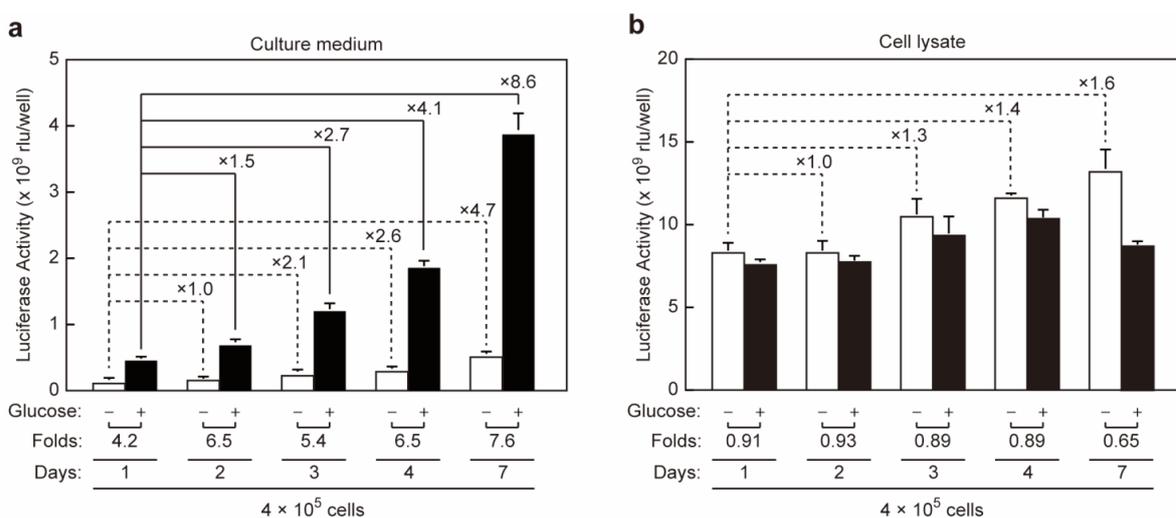


Figure 2. Example of results from GSIS assay using a luminometer (cited from Fig. 4 in reference¹⁾)

Luminescence activity was measured using a luminometer (Atto AB-2200) in the supernatant (a) and cell lysate (b) of iGL cells seeded at a density of 4×10^5 cells in 6-well plates (BioCoat poly-D-Lysine 6-well plate, Corning) and cultured* for 1–7 days. Cells preincubated with low-glucose (2 mM) KRH buffer for 1 h then incubated with either low-glucose (2 mM: white bar, □) or high-glucose (20 mM: black bar, ■) KRH buffer for 1 h. (The vertical axis represents the I_{max} value per well.) The results show high glucose responsiveness around fourfold that of the first day after seeding, and an increase in glucose responsiveness and insulin secretion over time.

The culture medium used in this experiment contained 50 μM of 2-mercaptoethanol as an additive, but did not contain monothioglycerol or G-418.



IX. References

- 1) T. Suzuki, T. Kanamori, and S. Inouye. Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) 486: 886-892 (Open Access CC BY 4.0).
- 2) A. Merglen *et al.* Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinol.* (2004) 145: 667-678.
- 3) S. Inouye. Single-step purification of recombinant *Gaussia* luciferase from serum-containing culture medium of mammalian cells. *Protein Expr. Purif.* (2018) 141: 32-38.

凍結株化細胞製品

iGL 細胞株

【iGL Cell Line, Code No.IGL01C】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2019年12月10日改訂

I. 製品概要

iGL 細胞は、ラット膵 β 細胞株 INS-1E を親株として、ヒトインスリンと分泌型ガウシアルシフェラーゼ (*Gaussia Luciferase*, GLase)との融合タンパク質 (Insulin-GLase)を定常発現する細胞株として樹立されました。この iGL 細胞は、GLase の発光反応を利用して、グルコース応答性のインスリン分泌を簡便かつ高感度に測定することができます¹⁾。さらに、iGL 細胞のスフェロイド (3 次元培養細胞)は、ラット単離膵島と同様に細胞塊で同調したインスリン分泌能を有しているため、生物発光イメージングにより周期性インスリン分泌をリアルタイムで解析することも可能です¹⁾。

II. 使用前注意事項

- 本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。
- 本製品はすべて【無菌操作】で実施してください。
- 本製品の培養には別売の専用メディウムをご使用ください。
- 本製品は営利法人の方が購入される場合はライセンス契約が必要です。

III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。
保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。
メディウムや使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. ライセンスについて

本細胞株は学校法人愛知学院と当社で実施許諾契約を締結し販売しています。生物発光技術は JNC 株式会社から当社が実施許諾を受け使用しています。本細胞株ならびにその派生物 (以下「本細胞株等」) の使用はご購入者の自施設内における研究目的に限ります。ヒトへは使用できません。本細胞株等ならびにその使用权の第三者への譲渡、配布、再販はできません。商業目的で使用する場合は別途商業目的に関する契約を締結する必要があります。

V. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	保証期限
iGL 細胞株	1 × 10 ⁶ cells/vial	1 本	液体窒素保存	6 ヶ月

- ※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください。
- ※細胞は COS banker (コスモ・バイオ社 製品コード COS-CFM01)で凍結保存されています。
- ※細胞はマイコプラズマ陰性確認済。

VI. 専用メディアウム(別売)

品名	品番	容量	保存方法	有効期限
iGL 細胞株用 培養メディアウム	IGLM	500 mL	-20 °C 保存 (解凍後は 4 °C 保存)	ボトル記載(-20 °C 保存) 解凍後 2 週間(4 °C 保存)

【培地組成】

基礎培地: RPMI1640 (L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES 含有)

添加物: 5% fetal bovine serum、1 mM ピルビン酸、500 μM モノチオグリセロール、200 μg/mL G-418

- ※製品の再凍結は 1 回まで可能です。
- ※解凍後は数回で使い切れる量に分注し凍結保存することをお勧め致します。
- ※本製品は凍結融解または加温を繰り返し行った場合、製品の品質が著しく低下する恐れがあります。

VII. インスリン応答性アッセイ用バッファー(別売)

品名	品番	保存方法	有効期限
iGL 用 KRH バッファーセット	IGLB	-20 °C 保存 (解凍後は 4 °C 保存)	ボトル記載(-20 °C 保存) 6 ヶ月(4 °C 保存)
セット内容	2 mM グルコース-KRH バッファー (50 mL) 20 mM グルコース-KRH バッファー (50 mL) 1% BSA 溶液(×100, 1 mL)		

【KRH バッファー組成】

130 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、1.5 mM CaCl₂、10 mM HEPES (pH7.4)

VIII. 細胞の由来

INS-1E (Rat Insulinoma 由来) に pJNC-hINS-GLuc (Insulin-GLase 発現ベクター; JNC 社 jPhoton シリーズ 製品コード P-101) を遺伝子導入してサブクローニングした細胞株¹⁾

IX. 操作方法

本製品は【継代可能】です。継代方法は、親株の INS-1E 細胞株に準じますので参考文献²⁾をご確認ください。指定がない限り操作は室温で無菌的に行います。

細胞解凍・播種

※下記は、100 mm ディッシュで培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用 100 mm ディッシュ (TPP 社 製品コード 93100:BM 機器取扱、あるいは Corning 社 製品コード 353003)
- ・ iGL 細胞株用培養メディウム (使用分を直前に室温にする)。

【プロトコール】

1. 凍結細胞のバイアルを、37 °C 温水にて穏やかに攪拌しながら速やかに解凍する。
2. 解凍した細胞液は、予め培養メディウム 9 mL を入れた 50 mL 遠沈管に移し混和した後、バイアルを共洗いして細胞液を回収する。
3. 50 mL 遠沈管を 300 × g で 5 分間遠心する。
4. 上清を除去し、培養メディウムを 10 mL 添加し再懸濁する。
5. 細胞懸濁液を全量、細胞培養用 100 mm ディッシュ 1 枚に播種し、5% CO₂ 存在下の 37 °C インキュベーターで培養する。
6. メディウム交換は、播種後翌日に 1 回、その後は 3~4 日に 1 回の頻度で行う。

※播種してから 約 1 週間~10 日後に継代可能となる。

細胞継代

※下記は、100 mm ディッシュで継代する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・ 細胞培養用 100 mm ディッシュ
- ・ PBS(-)
- ・ 0.05% トリプシン-EDTA 溶液
- ・ iGL 細胞株用培養メディウム

【プロトコール】

1. 継代する細胞 (参照: 図 1) を CO₂ インキュベーターから取り出す。
2. 上清を吸引除去し、PBS(-) を 10 mL 添加してディッシュを洗浄する。
3. 0.05% トリプシン-EDTA 溶液を 1 mL 添加する。
4. 37 °C の CO₂ インキュベーターに約 1~2 分静置する。

※トリプシンは細胞を損傷するため、剥離度合いを顕微鏡下で観察し、ほぼ全ての細胞が剥離したら速やかに次の処理を行う。

5. 培養メディウムを 10 mL 添加する。

6. 穏やかにピペッティングを行った後、細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収する。
7. 細胞懸濁液を少量分取し、細胞数を計測する。
8. 細胞密度が $1\sim 2 \times 10^6$ cells/dish の細胞数になるように新しい培養容器に播種する。
9. 5% CO₂ 存在下の 37 °C インキュベーターで培養する。播種してから、3~4 日後にメディアウム交換を行い、1週間後に継代を行う。

凍結ストックの調製

【準備するもの】

- ・ 上記継代用試薬
- ・ COS banker
- ・ 細胞凍結用コンテナ (BM 機器社 製品コード BCS-136 または 同等品)
- ・ 凍結保存用チューブ

【プロトコール】

1. 細胞継代方法の 1~7 を行い、50 mL 遠沈管を 300 × g で 5 分間遠心する。
2. 上清を除去後、COS banker を $1\sim 2 \times 10^6$ cells/mL になる様に加えて細胞を懸濁する。
3. 凍結保存用チューブに 1~2 mL 分注し、細胞凍結用コンテナを用いて -80 °C で凍結保存する。
4. 1 日以上 -80 °C にて静置後、液体窒素中に移して保存する。

実験例: グルコース刺激によるインスリン応答性アッセイ (Glucose-Stimulated Insulin Secretion Assay: GSIS アッセイ)

※ルミノメーターを用いた発光活性測定により Insulin-GLase の分泌を定量します。

※実験の一例として、6 ウェルプレートで 3 日間培養した細胞を高グルコースで 1 時間刺激する場合のプロトコールになります。培養容器のサイズ(底面積)と培養日数に合わせて播種する細胞数と溶液量を増減してください(高密度での 6 日以上の培養は細胞にダメージを与える場合がありますので、実験の目的に合わせて細胞密度と培養日数を調整してください)。

※臍島様スフェロイドを形成しやすい性質上、細胞間接着状態での 4~5 日以上の培養は、細胞の培養プレートへの接着性が低下します(グルコース応答性とインスリン分泌量は増大します: 図 2)。

※グルコース応答性の詳細は参考文献¹⁾をご参照ください。

【準備するもの】

- ・ 継代可能な細胞
 - ・ コーティング処理された 6 ウェルプレート (BioCoat poly-D-Lysine 6-well plate, Corning 社 製品コード 354413 あるいは BioCoat Matrigel (Thin Layer) 6-well plate, Corning 社 製品コード 354603: いずれもコスモ・バイオ取扱)
 - ・ 上記継代用試薬
 - ・ iGL 用 KRH バッファーセット (コスモ・バイオ社 製品コード IGLB)
- ※ 1 時間程度までの短時間のグルコース刺激用試薬であり、本試薬を用いた無菌操作は必要ありません。
- ※ GSIS アッセイでは複数回の細胞洗浄処理を行う必要があり、細胞の剥離を防ぐためには、細胞接着性を高めるコーティング処理を行った培養容器のご使用により操作性が向上します。



【プロトコール】

1. 細胞継代方法の1~7を行う。
2. $4\sim 8 \times 10^5$ cells/well の細胞数になるようにコーティング処理された6ウェルプレートに播種し、5% CO₂ 存在下の 37 °C インキュベーターで3日間培養する。

※3日間以上培養する場合は、3~4日毎にメディアウム交換を行う。

3. アッセイを開始する前に iGL 用 KRH バッファーセットを常温で解凍し、2 mM グルコース-KRH バッファー及び 20 mM グルコース-KRH バッファーに BSA 溶液(×100)を添加する。
4. 2 mM グルコース-KRH バッファー 2 mL で細胞を2回洗浄する。

※前培養液中の発光活性も測定する場合は、洗浄前に一部を分取して氷上(4 °C)に置く。

※細胞が剥離しないように注意してバッファーの添加と吸引を行う。

5. 低グルコースで細胞を前処理するために、2 mM グルコース-KRH バッファーを 2 mL 添加し、5% CO₂ 存在下の 37 °C インキュベーターで1時間培養する。
6. 2 mM グルコース-KRH バッファー 2 mL で細胞を2~3回洗浄する。

※洗浄により、前培養で分泌された Insulin-GLase の発光活性が十分に低下していることを確認し、実験条件によって細胞洗浄の溶液量と回数を最適化する。

※高グルコース刺激を数分~10分間行う場合など、細胞刺激を厳密に行う場合は、細胞と KRH バッファーを 37 °C で加温しながら操作する。

7. 2 mM または 20 mM グルコース-KRH バッファーを 2 mL 添加し、5% CO₂ 存在下の 37 °C インキュベーターで1時間培養する。

8. 培養後の上清はマイクロチューブ等に回収し、氷上に静置する。この上清を用いて GSIS アッセイを行う。

※剥離した細胞を除去する必要があるときは、4 °C、300 × g で5分間遠心し、遠心後の上清でアッセイを行う。

9. iGL 細胞内の発光活性も測定したい場合は、上記の上清回収後の細胞に 1 × Passive Lysis Buffer (Promega 社 製品コード E1941 :5×溶液)、または Coelenterazine (CTZ) Luciferase assay kit (JNC 社 製品コード C-001-120) 付属の溶解液を 200 μL 添加し、軽くピペッティングして細胞を溶解する。細胞溶解液は氷上に静置する。

実験例:インスリン-ルシフェラーゼの発光活性測定

※発光活性の測定は、GSIS アッセイ後、出来るだけ速やかに行ってください。

【準備するもの】

- ・上記 GSIS アッセイのサンプル
- ・PBS(-)
- ・Coelenterazine (CTZ) Luciferase assay kit (JNC 社 製品コード C-001-120) または CTZ 試薬 (JNC 社 製品コード S-001) から用時調製した、CTZ (終濃度 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む PBS(-) 溶液
- ・シングルチューブ測定用ルミノメーター (アトー社 製品コード AB-2270 等) またはマルチウェル用ルミノメーター (ベルトールド社 製品コード Centro LB960 等)
- ・ルミノメーター用測定チューブ (透明ポリスチレンチューブ等) もしくはマルチウェル用測定プレート (白色あるいは黒色 96 ウェルプレート等)

※以下の測定プロトコールは、シングルチューブ測定用ルミノメーターを用いた実験例です。

【プロトコール】

1. CTZ を含む PBS(-) 溶液を 100 μL ずつ測定用チューブに分注する。
2. GSIS アッセイで調製したサンプル 10 μL をマイクロピペットで添加し、ルミノメーターにセットして 5~10 秒間測定する。

※発光値がルミノメーターの測定可能な定量範囲を超える場合、Neutral Density フィルター (ND フィルター) を備えたルミノメーターを使用するか、Coelenterazine (CTZ) Luciferase assay kit (JNC 社 製品コード C-001-120) に含まれるセレンテラジンアッセイバッファーでサンプルを希釈してください。

※測定プロトコールの詳細は、[参考資料^{3\)}](#)をご参照ください。

X. 技術情報

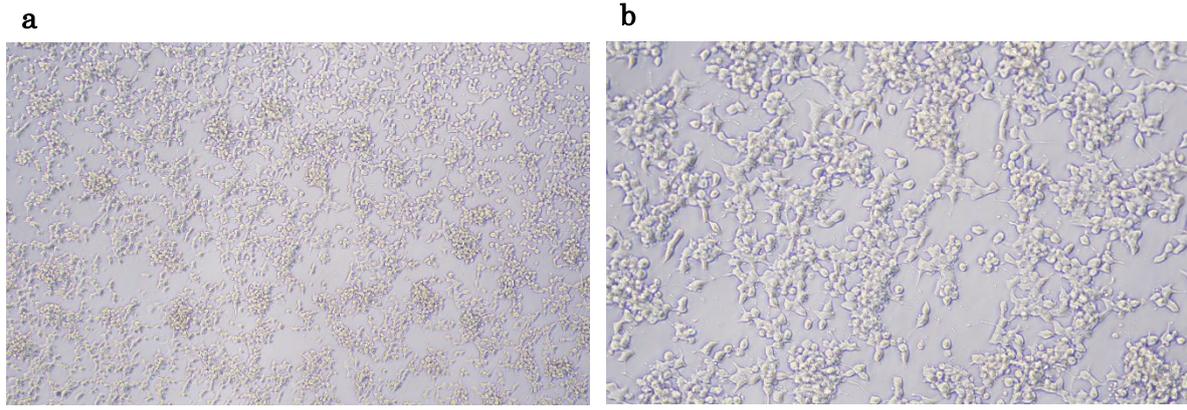


図1. 位相差顕微鏡画像

対物レンズ倍率: **a.** 10 倍、**b.** 20 倍。Scale bar=100 μm。

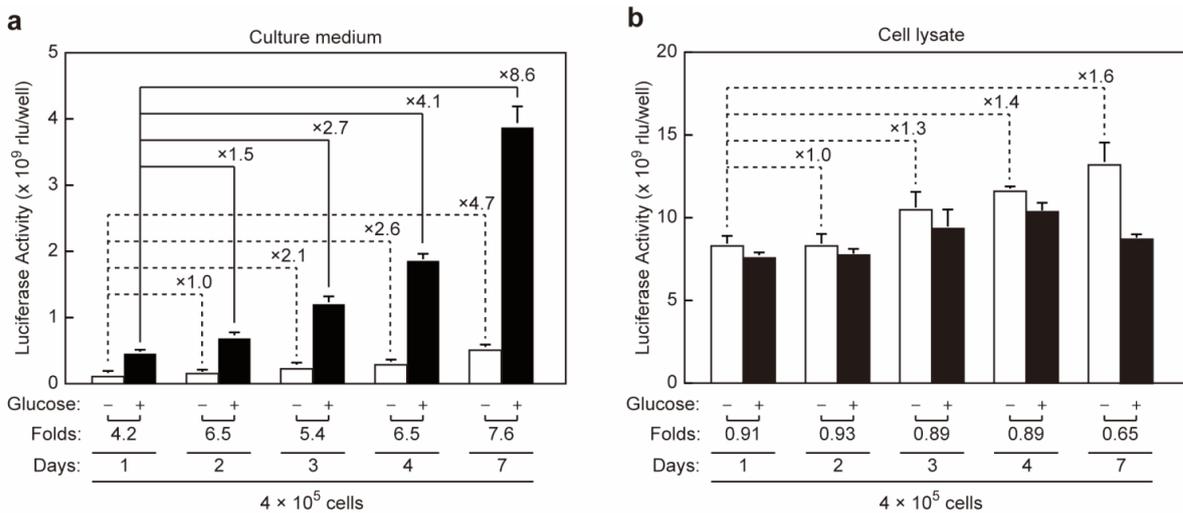


図2. ルミノメーターを用いた GSIS アッセイの例(参考文献1 Fig. 4 から引用)

iGL 細胞 (4×10^5 cells) を 6 ウェルプレート (BioCoat poly-D-Lysine 6-well plate, Corning) に播種して 1~7 日間培養^{*}し、低グルコース (2 mM) の KRH バッファーで 1 時間前処理した後、低グルコース (2 mM: □) または高グルコース (20 mM: ■) の KRH バッファーで 1 時間処理した細胞の上清 (a) と細胞溶解液 (b) に含まれる発光活性をルミノメーター (アトー AB-2200) で測定した (縦軸はウェルあたりの I_{max} 値)。播種後 1 日目から 4 倍程度の高グルコース応答性を示し、培養日数の増加に伴いグルコース応答性とインスリン分泌量の増大が観察された。

^{*}本実験の培養メディアムは、添加物として 50 μM 2-メルカプトエタノールを使用し、モノチオグリセロールと G-418 を含んでいない。



XI. 参考文献・参考資料

- 4) T. Suzuki, T. Kanamori, and S. Inouye. Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) 486: 886-892 (Open Access CC BY 4.0).
- 5) A. Merglen *et al.* Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinol.* (2004) 145: 667-678.
- 6) JNC 社 セレンテラジン系ルンフェラーゼアッセイキット測定プロトコール
https://www.jnc-corp.co.jp/rd/labo/jPhoton_Collection/Assaykit/pdf/20180314_Coelenterazine_Luciferase_Assay-kit_Measurement-protocol_for-web.pdf.