

凍結株化細胞製品

iGL 細胞株

【iGL Cell Line, Code No.IGL02C】

本製品は研究目的にのみご使用になります。

2019年4月8日作成

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ア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、専用メディア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。

当社、製品サポート(メール:primarycell@cosmobio.co.jp)までご連絡ください。

保証期限は【製品お受け取りから 6ヶ月以内】です。

メディア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権の第三者への譲渡、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なった場合、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ア(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 温水にて穩やかに搅拌しながら速やかに解凍する。
2. 解凍した細胞液は、予め培養メディア 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、培養メディアを 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ア

【プロトコール】

1. 繙代する細胞(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. 培養メディアを 10 mL 添加する。

6. 穏やかにピ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 $300 \times g$ 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)。

※膵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】

- ・ 繙代可能な細胞
- ・ 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ます、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 µg/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(アト一社 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。

※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

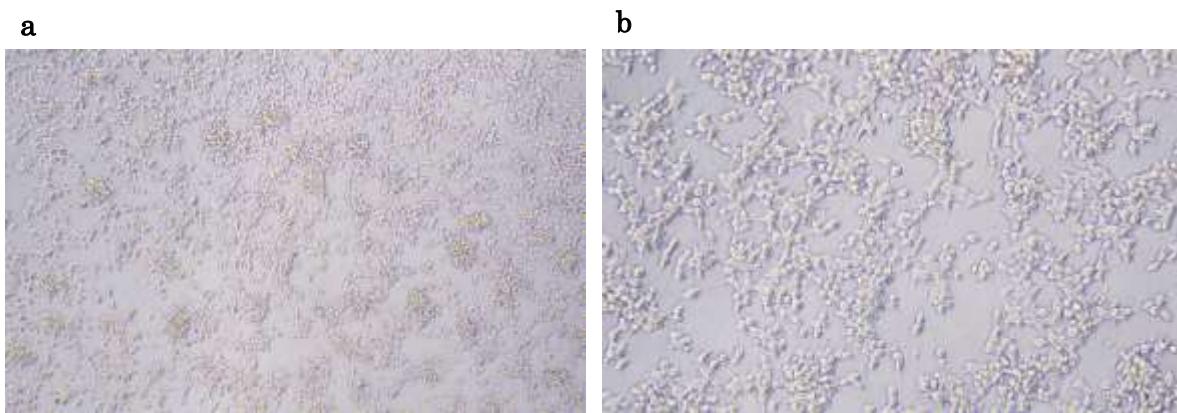


図1. 位相差顕微鏡画像

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

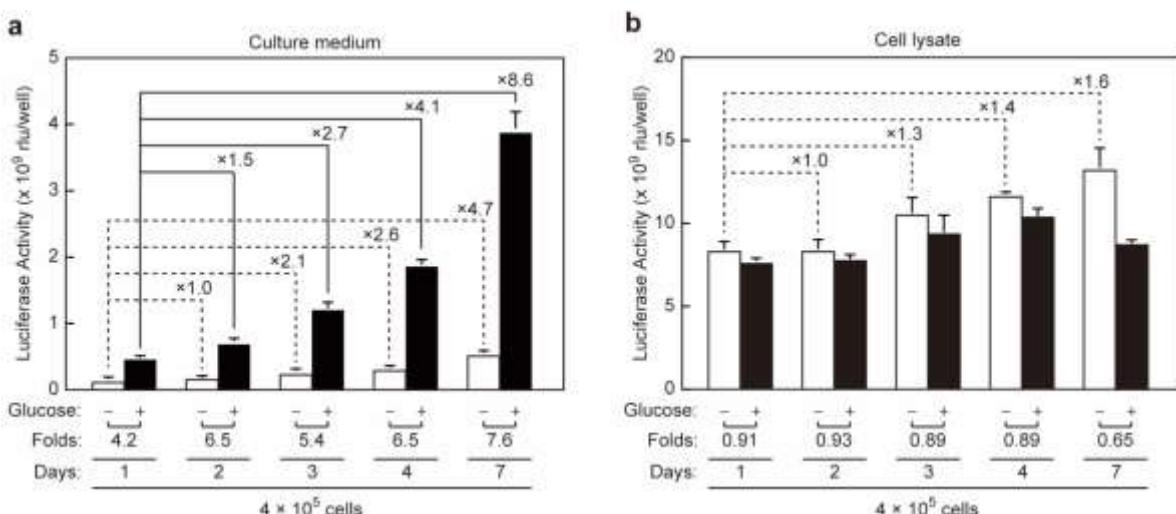


図2. ルミノメーターを用いた GSIS アッセイの例(参考文献1 Fig. 4 から引用)

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(アトーブルーメーター 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

- 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) JNC 社 セレンテラジン系ルシ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/labojPhoton_Collection/Assaykit/pdf/20180314_Coelenterazine_Luciferase_Assay-kit_Measurement-protocol_for-web.pdf.

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先: 〒047-0261 北海道小樽市錢函 3 丁目 513 番 2

コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送

または primarycell@cosmobio.co.jp あて PDF ファイル送信



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp
URL : <http://www.primarycell.com/>