

膵島培養キット (マウス)

【Pancreatic Islet Culture kit (Mouse), Code No. PNI13】

平成 27 年 12 月 1 日改訂

※ 本品は、研究目的にのみご使用ください。

膵島（ランゲルハンス氏島）は主に 3 種類の内分泌細胞（ α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞）から構成されており、それぞれの細胞からグルカゴン、インスリン、ソマトスタチン等を分泌し、糖代謝や脂質代謝等の調節に深く関与しています。

本キットは膵臓をコラゲナーゼ処理し、ハンドピックアップ及び密度勾配遠心により、外分泌細胞などを除去して分離した膵島及び培地のセットになります。

《I. キット構成》	1
《II. メディウムの主成分》	1
《III. 細胞培養方法》	2
《IV. グルコース応答性試験（Transwell 法：推奨）》	2
《V. グルコース応答性試験（チューブ法）》	3
《VI. Total RNA 抽出方法》	5
《VII. 膵島の分散方法》	6
a. 細胞分散液（酵素）による分散方法	6
b. 細胞分散液（キレート剤）による分散方法	6
《VIII. マウス膵島培養キット関連製品》	7

《I. キット構成》

構成	容量	本数	有効期限
膵島（ランゲルハンス島）	膵島 100 個以上 / 2 mL チューブ	1 本	即日使用推奨
11mM グルコース含有メディウム ※培養用メディウム	30 mL	1 本	3 ヶ月 (4°C)
3mM グルコース含有メディウム	60 mL	1 本	3 ヶ月 (4°C)
グルコース溶液	1 mL	1 本	3 ヶ月 (4°C)

使用動物 : ICR マウス・♂・7~8 週齢
細胞採取日 : 平成-年-月-日
発送日 : 平成-年-月-日
Lot No. : XXX-X-XXX

《II. メディウムの主成分》

品名	主成分
11mM グルコース含有メディウム	RPMI1640、血清、グルコース、その他
3mM グルコース含有メディウム	RPMI1640、血清、グルコース、その他
グルコース溶液	グルコース（濃度は 1.7M）

《III. 細胞培養方法》

マウス膵島 (100 個以上) は、2mL チューブに培養用メディウムで浮遊させた状態のものを定温輸送箱 (4℃) で発送しています。製品がお手元に届きましたら、直ちにチューブからマイクロピペットで膵島をシャーレ^(注1)に移して 5%CO₂ 存在下の 37℃インキュベーター内で 1~2 時間前培養し、実体顕微鏡もしくは位相差顕微鏡下で膵島の形態をご確認の上、実験等にご使用ください。

膵島を培養する場合は、付属の 11mM グルコース含有メディウムを培養用メディウムとして使用し、浮遊状態で培養できます。培養日数を経つにつれて膵島の機能が低下するため、到着後速やかにご使用になることをお勧め致します。

(注) シャーレは、細胞培養用シャーレをご使用の場合は膵島が培養面に接着しやすくなるため、浮遊状態で培養する場合は浮遊性細胞用シャーレもしくは微生物用シャーレ (Kord-Valmark 社製 No.2901 など) をお勧め致します。

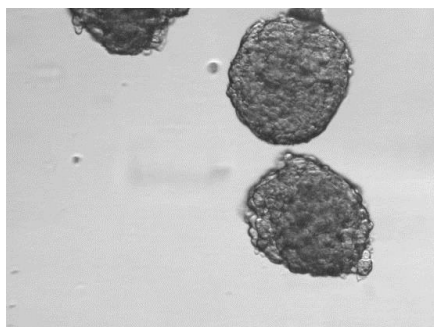


図 1. マウス膵島

《IV. グルコース応答性試験 (Transwell 法 : 推奨)》

(注) グルコース応答性試験を実施する場合は膵島の状態で行なってください。分散させた状態でのグルコース応答性は弊社では確認出来ておりません。

【 準備していただくもの 】

- ・ 6.5mm Transwell® with 5.0µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile(Corning)
Product Number: #3421
- ・ 1.5mL マイクロチューブ (上清回収用)
- ・ プレート遠心機 (マルチプレートが遠心できるタイプ)
- ・ ピペット及びピペットチップ (10µL 及び 1000µL 用)
- ・ CO₂インキュベーター
- ・ ウォーターバス
- ・ 実体顕微鏡もしくは位相差顕微鏡
- ・ マウスインスリン測定用 ELISA キット (弊社取扱: 80-INSMS-E01 または同等品)

【 20mM グルコース含有メディウムの調製方法 】

20mM グルコース含有メディウムは、グルコース溶液 (濃度は 1.7M) を 3mM グルコース含有メディウムで 100 倍希釈した溶液になります。

20mM グルコース含有メディウムは、サンプル 1 本あたり 0.5mL 用しますので必要量調製してください。

【 アッセイ方法 】

下記プロトコールは、参考例です。

グルコース応答性テストの time point は、お客様のご検討内容に合わせて変更等行なってください。

(注) 臍島は輸送やシャーレへの移し替えの影響により、一部形が崩れたりすることがございます。形が崩れたものは、グルコース応答性を失ってしまうため、アッセイには形が保たれているもののみを選別してご使用ください。

- (1) 実験の開始前に臍島をマイクロピペットでチューブからシャーレに移し、1~2 時間の前培養を行なってください。
- (2) 6.5mm Transwell plate (24well plate) に 3mM グルコース含有メディウムを 500 μ L 加え、プレート遠心機で 1000rpm、10 秒間遠心してください。
- (3) シャーレ内の臍島を顕微鏡下で Transwell の insert 内に一定個数 (5 個~30 個) 入れてください。
- (4) 臍島を入れたプレートを 5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で 60 分間静置してください。
- (5) 60 分間静置したプレートを取り出し、insert 下側に落ちたメディウムを除去してください。
- (6) プレート遠心機で 1000rpm、10 秒間遠心し、insert 下側に落ちたメディウムを除去してください。
- (7) メディウムを除去したプレートに新たに 3mM グルコース含有メディウムを 500 μ L 加え、5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で 60 分間静置してください。
- (8) 60 分間静置したプレートを取り出し、insert 下側に落ちたメディウムを 1.5mL チューブに回収してください。
- (9) プレート遠心機で 1000rpm、10 秒間遠心し、insert 下側に落ちたメディウムを (8) と同じチューブに回収してください (回収したメディウムを 3mM-60~120min 画分とします)。
- (10) 上清を回収したプレートに新たに 20mM グルコース含有メディウムを 500 μ L 加え、5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で 60 分間静置してください。
- (11) 60 分間静置したプレートを取り出し、insert 下側に落ちたメディウムを 1.5mL チューブに回収してください。
- (12) プレート遠心機で 1000rpm、10 秒間遠心し、insert 下側に落ちたメディウムを (11) と同じチューブに回収してください (回収したメディウムを 20mM-0~60min 画分とします)。
- (13) それぞれ回収した上清を用いてインスリン濃度測定をおこなってください。回収した上清を保存する場合は冷凍保存(-20°C)してください。

《V. グルコース応答性試験 (チューブ法)》

(注) グルコース応答性試験を実施する場合は臍島の状態で行ってください。分散させた状態でのグルコース応答性は弊社では確認出来ておりません。

【 準備していただくもの 】

- ・ 1.5mL 平底マイクロチューブ
- ・ 1.5mL マイクロチューブ (上清回収用)
- ・ 小型微量遠心機 (2,000g 程度のチビタンタイプ)
- ・ ピペット及びピペットチップ (10 μ L、200 μ L 及び 1000 μ L 用)
- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ ウォーターバス
- ・ 実体顕微鏡もしくは位相差顕微鏡
- ・ マウスインスリン測定用 ELISA キット (弊社取扱: 80-INSMS-E01 または同等品)

【 20mM グルコース含有メディウムの調製方法 】

20mM グルコース含有メディウムは、グルコース溶液 (濃度は 1.7M) を 3mM グルコース含有メディウムで 100 倍希釈した溶液になります。

20mM グルコース含有メディウムは、サンプル 1 本あたり 0.5mL 用しますので必要量調製してください。

【 アッセイ方法 】

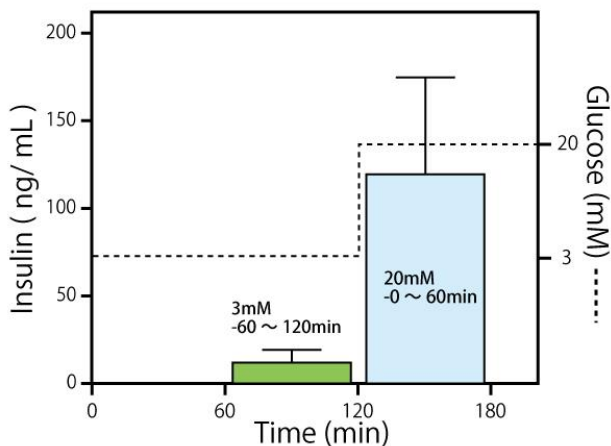
下記プロトコールは、参考例です。

グルコース応答性テストの time point は、お客様のご検討内容に合わせて変更等行なってください。

(注) 膵島は輸送やシャーレへの移し替えの影響により、一部形が崩れたりすることがございます。形が崩れたものは、グルコース応答性を失ってしまうため、アッセイには形が保たれているもののみを選別してご使用ください。

- (1) 実験の開始前に膵島をマイクロピペットでチューブからシャーレに移し、1～2 時間の前培養を行なってください。
- (2) 1.5mL 平底マイクロチューブに 3mM グルコース含有メEDIUMを 500μL 加えてください。
- (3) シャーレ内の膵島を顕微鏡下で平底マイクロチューブに一定個数 (5 個～30 個) 入れてください。
- (4) 膵島を入れたチューブを 5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で蓋を開けた状態で 60 分間静置してください。
- (5) 60 分間静置したチューブを取り出し、蓋を閉めて小型微量遠心機で 10 秒間遠心してください。
- (6) マイクロピペットで膵島に触れないように上清をすべて除去してください。
- (7) 上清を除去したチューブに新たに 3mM グルコース含有メEDIUMを 500μL 加えてください。
- (8) 5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で蓋を開けた状態で 60 分間静置してください。
- (9) 60 分間静置したチューブを取り出し、蓋を閉めて小型微量遠心機で 10 秒間遠心してください。
- (10) マイクロピペットで膵島に触れないように上清をすべて回収してください。(回収した上清を 3mM-60～120min 画分とします)。
- (11) 上清を回収したチューブに新たに 20mM グルコース含有メEDIUMを 500μL 加えてください。
- (12) 5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーター内で蓋を開けた状態で 60 分間静置してください。
- (13) 60 分間静置したチューブを取り出し、蓋を閉めて小型微量遠心機で 10 秒間遠心してください。
- (14) マイクロピペットで膵島に触れないように上清をすべて回収してください。(回収した上清を 20mM-0～60min 画分とします)。
- (15) それぞれ回収した上清を用いてインスリン濃度測定をおこなってください。回収した上清を保存する場合は冷凍保存(-20°C)してください。

マウス膵島におけるグルコース応答性試験：測定例 1



使用膵島：10 個/tube

評価法：Stimulation Index(SI)

$$SI = \frac{20\text{mM}-0\sim 60\text{min 画分のインスリン濃度}}{3\text{mM}-60\sim 120\text{min 画分のインスリン濃度}}$$

$$SI : \frac{119.5}{11.9} = 10.0$$

《VI. Total RNA 抽出方法》

【 準備していただくもの 】 ※器具類・試薬類は、RNase free 製品をご利用ください。

- ・ TRI reagent® (弊社取扱: Cat.No.TR118 または同等品)
- ・ グリコーゲン molecular biology grade (弊社取扱: Cat.No. R0561 または同等品)
- ・ クロロホルム
- ・ 2-プロパノール
- ・ エタノール
- ・ RNase free 水
- ・ 2.0mL マイクロチューブ
- ・ 小型冷却遠心機
- ・ ピペット及びピペットチップ (10 μ L、100 μ L 及び 1000 μ L 用)

【 抽出方法 】

- (1) 臍島 100 個を 2.0mL マイクロチューブに移した後、小型微量遠心機又は 1000~3000 \times g で数秒間遠心して臍島を沈殿させ、上清を除去してください。
- (2) 上清を除去したチューブに TRI reagent® を 500 μ L 加え、直ちに 60 秒間ボルテックスで混合し、臍島を完全に溶解させてください。
- (3) 臍島を可溶化させた溶液にクロロホルムを 100 μ L 添加後、ボルテックスで混合し室温で 1 分間静置してください。
- (4) 1 分間静置させた溶液を遠心分離 (15,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) し、上層・中間層・下層とに分離させてください。中間層 (白色)、下層 (赤色) にピペット先端が触れない様に注意しながら、分離した上層を新しいチューブに回収してください。
※回収した上清に中間層・下層が混入した場合は、その溶液を再度遠心分離し、上層を回収してください。
- (5) 回収した上清にしてグリコーゲンを 2 μ L 加えボルテックスで混合し、さらに回収した上層画分と等量の 2-プロパノールを添加し、混和させた後 10~15 分間氷上で静置してください。
- (6) 氷冷後、再度ボルテックスで混和し、遠心分離 (15,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) してください。
- (7) 遠心分離後チューブ底にペレット (Total RNA 塊) があることを確認後、上清を慎重に除去してください。
- (8) 上清を除去後、99.5%エタノールを 300 μ L 加えてタッピングおよびスピンドアウンし、底面のペレットを吸わないように上清を除去してください。
- (9) 上清を除去後、75%エタノールを 700 μ L 加えピペッティングし、遠心分離 (15,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) してください。遠心後、底面のペレットを吸わないように上清を除去し、ペレットを風乾させてください。
※チューブ内壁などに 75%エタノールが残っていないことを確認してください。
- (10) ペレットに TRI reagent® を 300 μ L 加え(2)~(9)を再度繰り返しておこない^(注3)、ペレットを RNase free 水で溶解し Total RNA 液とします。

(注) 臍島の Total RNA は分解されやすいため、繰り返し作業は必ず行い、作業の中断はしないでください。

《VII. 臍島の分散方法》

(注) 分散させた細胞のグルコース応答性は確認出来ておりません。グルコース応答性以外の検討にご利用ください。

a. 細胞分散液（酵素）による分散方法

【 準備していただくもの 】

- ・細胞分散液（酵素）（別売：製品コード PNIDME）
- ・滅菌済み PBS(-)

- (1) PBS(-)を 1mL 入れたマイクロチューブに臍島を移してください。
- (2) 遠心分離（200×g、4℃、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (3) PBS(-)を 1mL 加えて遠心分離（200×g、4℃、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (4) 37℃に温めた臍島用細胞分散液を 100～200μL 加え、37℃ウォーターバス又は CO₂インキュベーターで 15～30 分加温してください。
※時々、攪拌又はピペッティングをしながら分散の程度を確認してください。
- (5) 細胞が分散したら、臍島用培養メディウム（3mM グルコース含有メディウム）を 1mL 添加し、遠心分離（200×g、4℃、5 分間）後、上清を除去してください
- (6) メディウムを 1mL 添加して細胞を懸濁し、遠心分離（200×g、4℃、5 分間）を行なって、上清を除去してください。
- (7) (6) の作業を再度行なってください。
- (8) 臍島用培養メディウムを適量添加して細胞を懸濁させ、実験等にご使用ください。

b. 細胞分散液（キレート剤）による分散方法

【 準備していただくもの 】

- ・細胞分散液（キレート剤）（別売：製品コード PNIDMC）
- ・HKRB バッファーセット（別売：製品コード PNIMG）

- (1) 3mM グルコース含有 HKRB バッファーを 1mL 入れたマイクロチューブに臍島を移してください。
- (2) 遠心分離（200×g、4℃、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (3) 3mM グルコース含有 HKRB バッファーを 1mL 加えて遠心分離（200×g、4℃、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (4) 37℃に温めた臍島用細胞分散液を 100～200μL 加え、37℃ウォーターバス又は CO₂インキュベーターで 10～20 分加温してください。
※時々、攪拌又はピペッティングをしながら分散の程度を確認してください。
- (5) 細胞が分散したら、臍島用培養メディウム（3mM グルコース含有メディウム）を 1mL 添加し、遠心分離（200×g、4℃、5 分間）後、上清を除去してください
- (6) メディウムを 1mL 添加して細胞を懸濁し、遠心分離（200×g、4℃、5 分間）を行なって、上清を除去してください。
- (7) (6) の作業を再度行なってください。
- (8) 臍島用培養メディウムを適量添加して細胞を懸濁させ、実験等にご使用ください。

《VIII. マウス臍島培養キット関連製品》表に記載した製品は一部になります。詳しくはweb からご覧ください。

品名	製品コード	構成	有効期限
臍島用細胞分散液(酵素)	PNIDME	2本(2mL/本)	3ヶ月(4℃)
臍島用細胞分散液(キレート剤)	PNIDMC	2本(2mL/本)	3ヶ月(4℃)
HKRB バッファーセット	PNIMG	3mM グルコース含有 HKRB バッファー 1本(50mL/本) 20mM グルコース含有 HKRB バッファー 1本(50mL/本)	1年(4℃)
臍島培養用メディウム(マウス)	PNIM3	1本(100mL/本) ※11mM グルコース含有メディウム	3ヶ月(4℃)
グルコース応答性メディウム	PNIMT	3mM グルコース含有メディウム 1本(100mL/本) グルコース溶液 1本(1mL/本)	3ヶ月(4℃)

《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き投稿された論文、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。

送付方法

〒063-0061 北海道札幌市西区西町北 12 丁目 1-12 YS ビル
コスモ・バイオ株式会社 プライマリーセル事業部 あて郵送
または primarycell@cosmobio.co.jp あて PDF ファイル送信



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒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

● プライマリーセル事業部 (技術的なお問い合わせ)
TEL : (011) 667-5911 FAX : (011) 667-5912
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp
URL : <http://www.primarycell.com/>