

初代細胞製品（培養細胞）

膵島培養キット（ラット）

【Pancreatic Islet Culture kit (Rat), Code No. PNI14】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2018年10月16日改訂

I. 製品概要

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、ハンドピッキング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。

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】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には付属の専用メディウムをご使用下さい。

III. 製品の保証について

製品は培養された状態で納品されます。到着後すぐにCO₂インキュベーターに入れて培養を開始してください。

製品は保存できません。到着後速やかに実験にご使用ください。

製品は到着時又は翌日に細胞の状態を確認して下さい。

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、製品到着後の生育不良に関して保証いたします。当社、製品サポート（メール：primarycell@cosmobio.co.jp）までご連絡下さい。

保証期限は【製品お受け取りから翌日まで】です。

また、増殖不良や分化不良に関しては、製品サポートまでお問い合わせ下さい。

メディウムや使用方法に変更を加えられた場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

構成	容量	本数
膵島（ランゲルハンス島）	膵島 100 個以上/チューブ	1 本
3mM グルコース含有メディウム （培養用メディウム）	100 mL	1 本
グルコース溶液	1 mL	1 本

※専用メディウムは単品販売もごさいます。詳しくは Web(www.primarycell.com) からご確認ください。

使用動物： : SD ラット・♂・7~8 週齢
細胞採取日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
発送日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
Lot No. : XXX-X-XXX

V. 培養用メディアウムの主成分

品名	主成分
3mM グルコース含有メディアウム	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：1.7M）

VI. 操作方法

※本製品は【継代不可】です。

ラット臍島（100個以上）は、2mL チューブに培養用メディア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臍島をシャーレ（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臍島の形態をご確認の上、実験等にご使用ください。

臍島を培養する場合は、付属の3mMグルコース含有メディアウムを培養用メディアウムとして使用し、浮遊状態で培養できます。培養日数が経つにつれて臍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臍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。

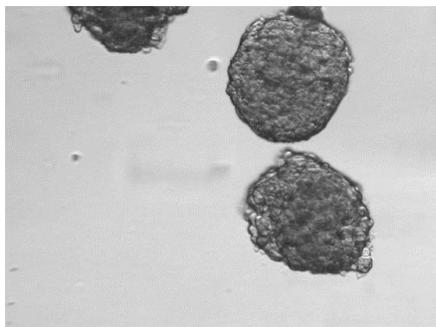


図1. ラット臍島

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。

【準備するもの】

- ・ 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
- ・ ラットインスリン測定用 ELISA キット（弊社取扱: 80-INSRT-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。

グルコース応答性試験（チューブ法）

【準備するもの】

- ・ 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
- ・ ラットインスリン測定用 ELISA キット（弊社取扱: 80-INSRT-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 】

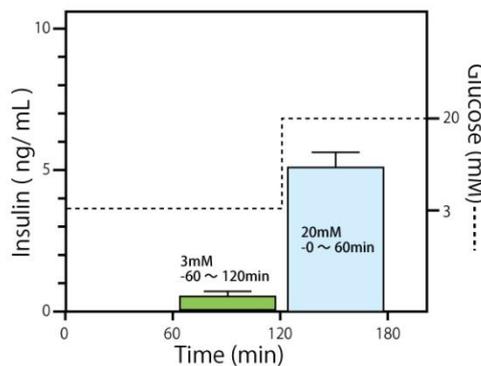
下記プロトコールは、参考例です。

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 グルコース含有メディウムを 500 μ L 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 $^{\circ}$ 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 グルコース含有メディウムを 500 μ L 加えてください。
8. 5%CO₂ 存在下の 37 $^{\circ}$ 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 グルコース含有メディウムを 500 μ L 加えてください。
12. 5%CO₂ 存在下の 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C)してください。

ラット膵島におけるグルコース応答性試験：測定例 1



使用膵島数：5 個/tube

評価法：Stimulation Index(SI)

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

$$SI : \frac{5.1}{0.48} = 10.6$$



Total RNA 抽出方法

【準備するもの】 ※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。

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。

《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。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函 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/>