



初代培養細胞 培養キットシリーズ

## 膵島培養キット (ラット) 【Pancreatic Islet Culture kit (Mouse), 品番：PNI14】

2024年7月1日改訂

※ 本品は、研究目的にのみご使用ください。

膵島（ランゲルハンス島）は主に3種類の内分泌細胞（ $\alpha$ 細胞、 $\beta$ 細胞、 $\delta$ 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、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. 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。

### II. 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CO<sub>2</sub>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。

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。

### III. キット構成

構成	容量	本数
膵島 (ランゲルハンス島)	膵島 100 個以上 / 25cm <sup>2</sup> フラスコ	1 本
5.5mM グルコース含有メディウム ※培養用メディウム	100 mL	1 本

### IV. メディウムの主成分

品名	主成分
5.5mM グルコース含有メディウム	DMEM、血清、グルコース、その他

使用動物 : SD ラット・♂・13 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-C-XXX

## V. 細胞培養方法

ラット膵島（100 個以上）は、25cm<sup>2</sup> フラスコ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（20℃）で発送しています。製品がお手元に届きましたら、直ちにフラスコから膵島をシャーレ<sup>(注1)</sup>に移して5%CO<sub>2</sub>存在下の37℃インキュベーター内で一晩前培養し、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 5.5mM 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、浮遊状態で培養します。

(注 1) 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。また、膵島は酸素要求性が高いため、培地の量は膵島が完全に沈んでしまうほどでは、酸素が枯渇し死滅します。水面のすぐ下に膵島がある状態まで培地の量を加減して下さい。

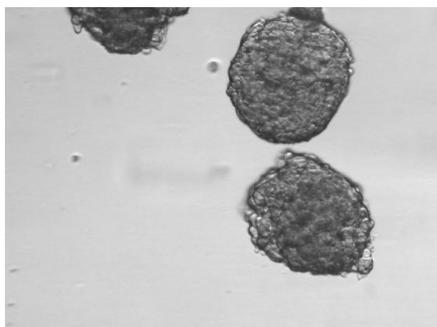


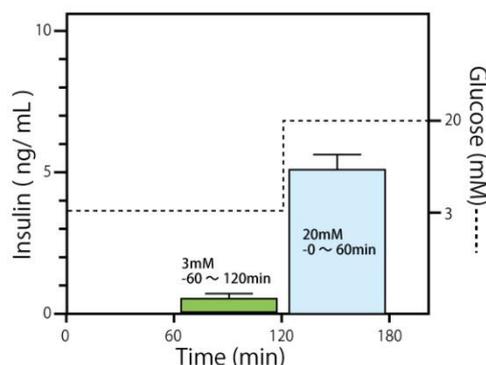
図 1. マウス膵島

## VI. グルコース応答性試験（Transwell 法：推奨）

グルコース応答性試験は、膵島自体のインスリン分泌機構が非常にデリケートであり、また初代細胞であることから、ロット差等も大きく、アッセイには多くのノウハウが含まれます。

弊社で採用しているアッセイ方法は確立された開発者の意向に伴い、誰もが自由に閲覧できる形では開示しておりません。グルコース応答性試験のプロトコルをご希望の場合は、弊社問い合わせ窓口まで、お問い合わせください。また、グルコース応答性試験を実施する場合は膵島の状態でこなしてください。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。

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：5~10 個/well

評価法：Stimulation Index(SI)

$$\text{SI} = \frac{20\text{mM 画分のインスリン濃度}}{3\text{mM 画分のインスリン濃度}}$$

$$\frac{5.1}{0.48} = 10.6 \quad \text{SI}$$

## VII. 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® (品番：TR118 または同等品)
- ・ グリコーゲン molecular biology grade
- ・ 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 $\mu$ L、100 $\mu$ L 及び 1000 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L 加え(2)~(9)を再度繰り返しておこない<sup>(注2)</sup>、ペレットを RNase free 水で溶解し Total RNA 液とします。

(注 2) 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。

## VIII. 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 】

- ・臍島用細胞分散液（酵素）（品番：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°C、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°C、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (4) 37°Cに温めた臍島用細胞分散液を 100~200μL 加え、37°Cウォーターバス又は CO<sub>2</sub> 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°C、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°C、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 】

- ・臍島用細胞分散液（キレート剤）（品番：PNIDMC）
- ・HKRB バッファーセット（別売）（品番：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°C、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°C、1 分間）をおこない、上清を除去してください。
- (4) 37°Cに温めた臍島用細胞分散液を 100~200μL 加え、37°Cウォーターバス又は CO<sub>2</sub> 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°C、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°C、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。