



アッセイプロトコル

免疫細胞染色

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、”3D-RPTEC[®]”をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は 3D-RPTEC を用いた免疫細胞染色のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTEC を用いた評価のご参考になれば幸いです。

目次

1. 使用機器・試薬類.....	- 3 -
2. 実施方法.....	- 3 -
2-1. 事前準備.....	- 3 -
2-2. 注意事項.....	- 3 -
2-3. 実施プロトコル（例）.....	- 4 -
3. 染色後の取り扱い（細胞の紛失防止策）.....	- 5 -
4. 免疫細胞染色の撮像例.....	- 5 -
5. 問い合わせ先.....	- 6 -

1. 使用機器・試薬類

以下に免疫細胞染色に必要な機器や試薬の一例を示しております。各施設でのご使用に合わせて適宜改変していただければと思います。

測定機器

- ・ 蛍光顕微鏡

測定用機材

製品名	製造	カタログ番号	規格/容量
セルセーバーチップラック入 (広口チップ)	QSP	FG-FB205R	200 μ L / 96 本 \times 10 ラック

試薬類

製品名	製造	カタログ番号	規格/容量
Triton X	富士フイルム和光純薬	581-81705	500 mL
D-PBS(-)	富士フイルム和光純薬	045-29795	500 mL
Donkey Serum	Sigma-Aldrich	S30-100ML	100 mL
4%パラホルムアルデヒド溶液	富士フイルム和光純薬	161-20141	100 mL
メタノール	富士フイルム和光純薬	131-01826	500 mL

2. 実施方法

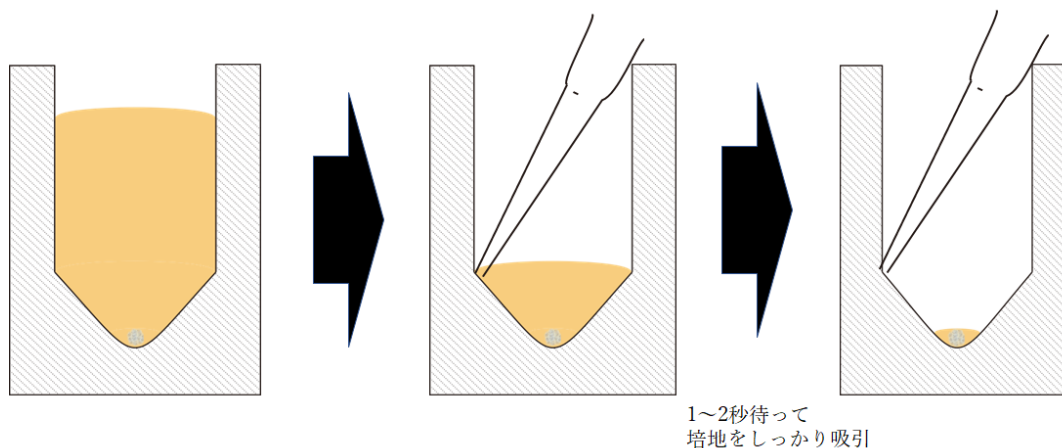
2-1. 事前準備

1. 500 mL の PBS(-) に 0.5 mL の Triton X を加え、0.1% PBT を調製する。
2. 100 mL の 0.1% PBT に 5 mL の Donkey Serum を加え、ブロッキング溶液（5% Donkey serum）を調製する。なお、ブロッキング溶液は各施設で使用されているものでも構いません。
3. 細胞は必要に応じて広口チップで指定ウェルに移動する。

2-2. 注意事項

- ✓ 3D-RPTEC の免疫細胞染色は培養プレート（96 well の V 底低接着プレート）中で実施可能です。

- ✓ 洗浄作業はアスピレーター（先端に 2 μ L または 10 μ L チップを接続）の先端を下記図のように V 底ウェル傾斜部の端部分にあてるようにして吸引除去し、ウェル底のスフェロイドを吸わないようにして下さい。



- ✓ 洗浄する際はスフェロイド（細胞塊）がウェル底に沈むまで 5 分間ほど待ってから次の洗浄を実施して下さい（自然沈降）。スフェロイドが沈みきっていない場合に洗浄作業を実施すると、アスピレーターでスフェロイドを吸引してしまう可能性があるのでご注意ください。

2-3. 実施プロトコル（例）

以下に、3D-RPTEC の免疫細胞染色の作業例をお示しします。詳細は各施設の手法に従って適宜改変ください。

1. 3D-RPTEC のウェル内の培地をできる限り吸引除去し、100 μ L/well の 4%パラホルムアルデヒド溶液を添加して固定する（固定時間 45 分間、室温にて静置）。
※メタノールでも固定可能（-20°C冷凍庫内で約 30 分間静置して固定）
※膜タンパク質はメタノール固定が推奨される場合もあります。
2. 固定後、PBS(-)で 3 回洗浄する（この状態で 4°C保管が可能）。
3. 100 μ L/well のブロッキング溶液を添加し、室温で 1 時間静置する。
4. 1 次抗体をブロッキング溶液で希釈する（抗体ごとに最適な希釈率で調製する）。
5. ウェル中のブロッキング溶液を吸引除去し、50~100 μ L/well の 1 次抗体を添加する。
6. 4°C冷蔵庫中で一晩静置する（1 次抗体中でオーバーナイト）。
7. 翌日、1 次抗体を除去し、100~150 μ L/well の 0.1% PBT を添加して 10 分間静置する（洗浄作業）。※洗浄作業を 3 回繰り返す。
8. 2 次抗体をブロッキング液で希釈する（抗体ごとに最適な希釈率で調製する）。

9. ウェル中のブロッキング溶液を吸引除去し、50~100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の2次抗体を添加する。
10. 室温遮光下で1時間静置する。
11. 2次抗体を除去し、100~150 $\mu\text{L}/\text{well}$ の0.1% PBTを添加して10分静置する。※洗浄作業を3回繰り返す。
12. ウェル内をPBS(-)に置換する。
13. 蛍光顕微鏡で観察する。

3. 染色後の取り扱い（細胞の紛失防止策）

染色後のバッファー中のスフェロイドを移動または回収する際はチップに細胞が吸着しないようご注意ください。タンパク質成分が含まれていないバッファー中では細胞がチップやチューブの壁面に付着し、細胞紛失につながる場合があります。**低吸着のチップおよびチューブ**の使用を推奨します。

なお、事前にチップ内側をタンパク質成分含有の培地に浸す（**3D-RPTEC 専用培地で2~3回ピペッティングする**）ことでもスフェロイドがチップ等に吸着しにくくなるため、紛失を防ぐことができます。

4. 免疫細胞染色の撮像例

固定液：メタノール（-20℃で30分間、100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ）

1次抗体：

Anti-OAT1 抗体（Transgenic、型番 KE038、rabbit 由来、50倍希釈）

Anti-P Glycoprotein 抗体（Abcam、型番 ab129450、rabbit 由来、200倍希釈）

Anti-SGLT2 抗体（Proteintech、型番 24654-1-AP、rabbit 由来、50倍希釈）

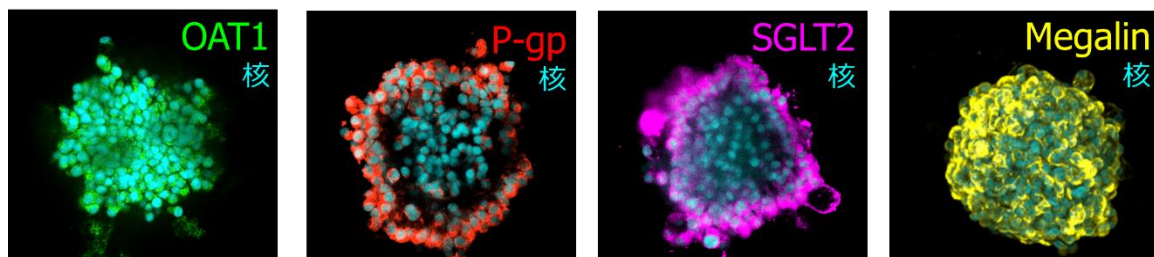
Anti-LRP2(Megalin)抗体（Novus Biologicals、型番 NBP1-85292、rabbit 由来、100倍希釈）

2次抗体：Anti-rabbit 抗体（Alexa Fluor 488、Invitrogen、500倍希釈）

使用プレート：低接着黒色U底プレート（Corning、型番 4515）

※共焦点蛍光顕微鏡の場合は染色後に細胞を低接着黒色U底プレートに移して撮像

※通常の蛍光顕微鏡の場合は培養中のV底プレートのまま染色から観察まで可能



共焦点蛍光顕微鏡で撮像した染色像

5. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/industrial/3drptec/>

