

Protocol for Thawing and Use of Plateable and Suspension Cryopreserved Hepatocytes

凍結肝細胞の融解プロトコール

凍結肝細胞の融解プロトコール

Protocol for Thawing and Use of Plateable and Suspension Cryopreserved Hepatocytes

序説

このプロトコールは下記のアプリケーションなどに使用される凍結肝細胞の融解・前処理の方法を紹介しています。

- ・ Metabolic Stability (Intrinsic Clearance)
- ・ Metabolic ID/profiling
- ・ Enzyme Induction
- ・ Hepatotoxicity
- ・ Transporter Uptake and Efflux
- ・ Environmental Bioaccumulation and Liver Disease

プロトコールの1～7までは浮遊細胞、接着細胞両方に共通しています。

8以降は接着細胞用となっています。

必要な試薬 (弊社で推奨する試薬)

ヒト浮遊細胞

→融解用培地

- ・ Cryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM®)

サイズ 製品番号

50ml CM7000

→インキュベーション用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)

500ml A1217601

1pack CM4000

ヒト接着細胞

→融解用培地

- ・ Cryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM®)

50ml CM7000

→プレーティング用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum containing)

500ml A1217601

1pack CM3000

→インキュベーション用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)
- ・ Collagen I, Coated Plates
- ・ Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix

500ml A1217601

1pack CM4000

1plate CM1024

5ml A1413202

動物浮遊細胞

→融解用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)

500ml A1217601

1pack CM3000

→インキュベーション用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)

500ml A1217601

1pack CM4000

動物接着細胞

→融解用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)

500ml A1217601

1pack CM3000

→プレーティング用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)

500ml A1217601

1pack CM3000

→インキュベーション用培地

- ・ Williams' Medium E (1x, no phenol red)
- ・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)
- ・ Collagen I, Coated Plates
- ・ Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix

500ml A1217601

1pack CM4000

1plate CM1024

5ml A1413202

凍結肝細胞を溶かす前に・・・

- Geltrex™ (LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix's 製品番号A1413202) を用いてOverlay法で使用される際は、アプリケーションの2～3時間前に氷上で溶かして下さい。
(4℃でOvernightでも可)
ゲル化を防ぐため氷冷保存して下さい。
- Hepatocyte Maintenance and Plating Supplement Packs* (CM4000とCM3000) の使用説明書を参考に、Williams' E培地 (A1217601) を使い、それぞれメンテナンス用培地とプレーティング用培地を用意して下さい。
- 凍結肝細胞を融解させる前にこのプロトコールを見直して、必要な試薬、または器具が準備されていることを必ず確認して下さい。凍結肝細胞は融解後、直ちに使用していただく必要があります。**細胞を再凍結すると代謝活性機能が損なわれる可能性があります。**
- 全ての凍結肝細胞製品が接着細胞とは限りません。接着細胞を使用して実験をされる際は、接着型細胞のロットをお選び下さい。
(プライマリー肝細胞をお取り扱いの際は一般的な安全予防措置に従い、Biosafetyキャビネット (クリーンベンチ) をご使用下さい)

プロトコール

融解→遠心分離→再懸濁

1. Water Bathを使って培地を37℃に温めます。

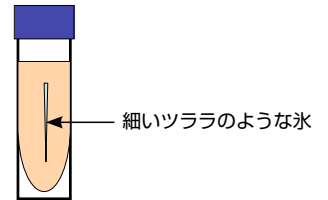
動物肝細胞を使用→CHRM®培地（ヒト肝細胞用）または、Hepatocyte Plating Supplement Pack（CM3000）を加えたWilliams' E

接着細胞を使用→プレーティング培地 Hepatocyte Plating Supplement Pack（CM3000）を加えたWilliams' E

浮遊細胞を使用→インキュベーション用培地 Hepatocyte Maintenance Supplement Pack（CM4000）を加えたWilliams' E

2. 凍結肝細胞を37℃のWater Bath で2分ほどかけて融解します。

肝細胞はとてもデリケートな細胞です。液体窒素（気相）で保存されている状態から直ちに37℃の状態に戻す必要があります。バイアルをWater Bathに入れてからも液体が融解するまでWater Bathから室温へ取り出さないで下さい。細いツララのような氷がバイアルの中で浮遊している状態まで融解してから取り出して下さい。



3. バイアルを70%のアルコールスプレーで消毒してクリーンベンチの中で拭きます。CHRM®（ヒト肝細胞用）、Hepatocyte Plating Supplement Pack（CM3000）を加えたWilliams' E 培地（動物肝細胞用）の中に融解した肝細胞をデカントして下さい。（ピペットを使用しても大丈夫ですが、チップの先が広く開いているタイプを使用して下さい）

4. 室温で遠心分離します。

	G-force	時間（分）
ヒト	100	10
イヌ、サル	65	4
ラット、マウス	55	3

5. 遠心分離後、上清をデカントして、 1×10^6 の細胞に対して1mlの培地を加えます。

→接着細胞の場合はプレーティング培地を使用

→浮遊細胞の場合は事前に温めてあるインキュベーション用培地を使用

カウント→プレート→インキュベーション

6. 生細胞数と収率を計算します。

→計算式が記載された“*Cell Counting Calculation Worksheet*”を使用

（肝細胞はとてもデリケートなので、自動セルカウンターを使用すると誤った生細胞数、収率算出の原因となります。良い結果を得るために顕微鏡を用いたマニュアル計測を推奨します）

7. 浮遊細胞をご使用の際は培地を加えて頂きご希望の濃度にして下さい。

浮遊細胞を使用の場合はこの時点で終了となります。

8. プレーティング用培地で、それぞれの播種密度で細胞を調整します。(表 1 と 表 2 をご参照下さい)

表 1—General Seeding Density Guide for Cryopreserved Hepatocytes. 12mL media per plate.

Note: each lot may require slight adjustments in seeding density to form optimal monolayer.

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
ヒト	0.9-1.1 x 10 ⁶ cells/mL	0.8-1.0 x 10 ⁶ cells/mL	0.7-0.9 x 10 ⁶ cells/mL	0.6-0.8 x 10 ⁶ cells/mL	0.5-0.7 x 10 ⁶ cells/mL
ラット	0.9-1.1 x 10 ⁶ cells/mL	0.8-1.0 x 10 ⁶ cells/mL	0.7-0.9 x 10 ⁶ cells/mL	0.6-0.8 x 10 ⁶ cells/mL	0.5-0.7 x 10 ⁶ cells/mL
イヌ	0.9-1.1 x 10 ⁶ cells/mL	0.8-1.0 x 10 ⁶ cells/mL	0.7-0.9 x 10 ⁶ cells/mL	0.6-0.8 x 10 ⁶ cells/mL	0.5-0.7 x 10 ⁶ cells/mL
サル	1.1-1.3 x 10 ⁶ cells/mL	1.0-1.2 x 10 ⁶ cells/mL	0.9-1.1 x 10 ⁶ cells/mL	0.8-1.0 x 10 ⁶ cells/mL	0.7-0.9 x 10 ⁶ cells/mL
マウス	0.5-0.7 x 10 ⁶ cells/mL	0.4-0.6 x 10 ⁶ cells/mL	0.3-0.5 x 10 ⁶ cells/mL	0.2-0.4 x 10 ⁶ cells/mL	0.1-0.3 x 10 ⁶ cells/mL

表 2—Approximate Number of Cells Per Plate . 12mL media per plates.

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
ヒト	10.8-13.2 million cells	9.6-12 million cells	8.4-10.8 million cells	7.2-9.6 million cells	6-8.4 million cells
ラット	10.8-13.2 million cells	9.6-12 million cells	8.4-10.8 million cells	7.2-9.6 million cells	6-8.4 million cells
イヌ	10.8-13.2 million cells	9.6-12 million cells	8.4-10.8 million cells	7.2-9.6 million cells	6-8.4 million cells
サル	13.2-15.6 million cells	12-14.4 million cells	10.8-13.2 million cells	8.4-10.8 million cells	9.6-12 million cells
マウス	6-8.4 million cells	4.8-7.2 million cells	3.6-6 million cells	2.4-4.8 million cells	1.2-3.6 million cells

9. マルチウェルプレートにピペットで分注します。懸濁する際に細胞を傷つけないよう、ピペットチップの先が広く開いているタイプを使用して下さい。肝細胞は通常の細胞と比べて大きいので3～4ウェル分注する度にゆっくりと転倒混和して下さい。

10. プレートインキュベーターの中に入れて、底面を下につけた状態で、縦・横に軽くプレートを動かしてウェル上で細胞が均一になるようにして下さい。

11. 4時間から6時間、37℃でインキュベートします。

→このインキュベーションで細胞はMonolayerを形成します。プレートを動かさないようにして下さい。

★Overlay法を行わない場合は、4～6時間後に培地交換をする際に使用するHepatocyte Maintenance Supplement Pack (CM4000) 添加済みWilliams' E を温めておいて下さい。

★Overlay法を使用する場合は、調製した培地を氷冷した状態にしておいて下さい。

12. インキュベーション後、クリーンベンチの中で軽くプレートを揺らして、デブリス（接着しなかった細胞断片）を浮かせてから培地を吸い取って下さい。

13. Overlay法を行わない場合は、温めたHepatocyte Maintenance Supplement Pack (CM4000) 添加済みWilliams' E、または他の培地（それぞれのアプリケーションによって調製された培地）を使用して培地交換を直ちに行ってください。細胞が乾燥しないように注意して下さい。

Overlay法を行う場合は次のステップに進んで下さい。

Overlay 法を使用される場合



注意事項： Geltrex™（LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix' s 製品番号A1413202）でOverlay法を使用される際は
使用の2～3時間前に氷上へ移し、溶解して下さい。
（4℃でOvernightでも可）
ゲル化を防ぐため、氷冷保存して下さい。

14. 使用するインキュベーション用培地の量を計算して、氷上で保管して下さい。
→通常12mL/プレートです。1～2mLの余裕を持って計算して下さい。
 15. Geltrex™のスペックシートに表記されているたんぱく質の濃度を確認して下さい。（ロットによって濃度が違います）
 16. インキュベーション培地量に弊社の推奨するGeltrex™の濃度（0.35 mg/mL）をかけて、その値をGeltrex™のたんぱく質の濃度で割ります。
この値がインキュベーション培地に加えるストックGeltrex™（mL）の量になります。
$$\frac{[\text{インキュベーション用培地 (mL)}] \times [0.35 \text{ (mg/mL)}]}{[\text{Geltrex™のタンパク濃度}]}$$
$$= [\text{インキュベーション培地に加えるストックGeltrex™ (mL) の量}]$$
 17. Geltrex™を冷えたインキュベーション用培地の中に入れます。転倒混和を行いよく混ぜて下さい。
 18. Overlay培地をプレートウェルに分注し、2時間以上24時間以内でインキュベーションを行って下さい。
→ゲル成分は細胞の上をコーティングします。
 19. インキュベーション用培地で毎日培地交換を行います。
- ★イヌの細胞を使用してOverlay法を行う場合はMatrigel™（BD）またはECM（Sigma）の使用を推奨します。

 公式 Facebook ページもチェック！ facebook.com/LifeTechnologiesJapan

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8 TEL.03-6832-9300 FAX. 03-6832-9580
大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28 TEL.06-6339-8165 FAX. 06-6339-8138

- コールセンター —————  0120-650591 (携帯からでもご利用いただけます)
- テクニカルサポート —————  0120-477-392 FAX：0120-477-120
- オーダーサポート ————— TEL：03-6832-6980 FAX：03-6832-9584
- カスタムプライマーについて — TEL：03-6832-6980 FAX：03-6832-9585
- サービスラボ ————— TEL：03-5753-3006 FAX：03-5753-3007
- 営業部 ————— TEL：03-6832-9300 FAX：03-6832-9580

販売店

研究用のみ使用できます。診断目的及びその手続上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は弊社または各社の商標または登録商標です。

販売条件はこちらをご覧ください。 www.lifetechnologies.com/TC

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan. GIB027-B12080B

www.lifetechnologies.com

 life
technologies™