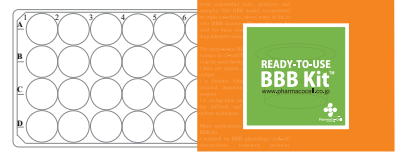




内容

- ◎ BBBキット™ (RBT-24H / MBT-24H)
- ◎ 培養液 (角型ボトル1本)
- ◎ ブランクインサート (Millicell® x 4 inserts)
- ◎ 品質保証書
- ◎ 取り扱いプロトコール (本紙)

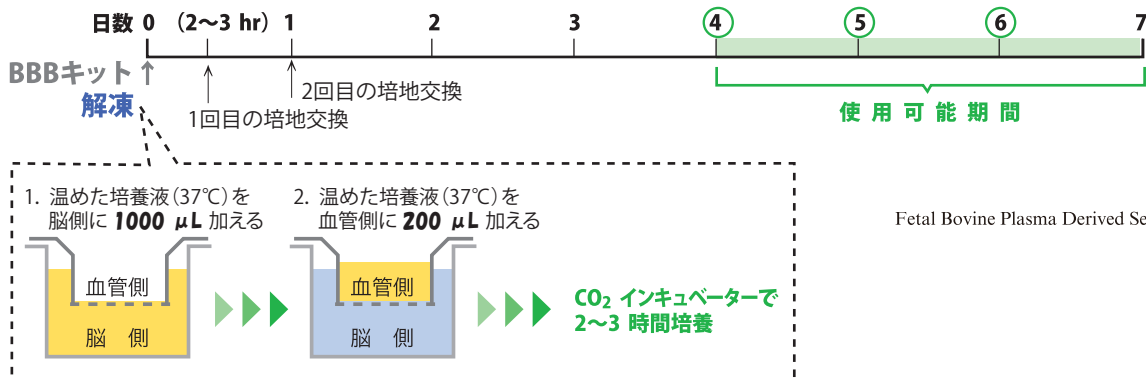


※内容をご確認ください。

取扱い方法 [解凍からBBBキット™ (RBT-24H/MBT-24H) の使用まで]

1. 解凍後のスケジュール

ご使用に当たって、まず解凍していただきます。その後のスケジュールは以下のとおりです。



Fetal Bovine Plasma Derived Serum (PDS)

解凍後、培養液の添加量

	解凍	1回目の培養液交換	2回目の培養液交換
血管側	200 μ L	300 μ L	300 μ L
脳側	1000 μ L	1200 μ L	1200 μ L

※BBBキット™ 培養液 (10% FBS / DMEM F-12)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM F-12)	
Fetal Bovine Serum(FBS)	10% (v/v)
Heparin	100 μ g/mL
basic Fibroblast growth factor (bFGF)	1.5 ng/mL
Insulin-Transferrin-sodium Selenite (ITS)	insulin 5 μ g/mL transferrin 5 μ g/mL sodium selenite 5 ng/mL
Hydrocortisone	500 nM
Gentamicin	50 μ g/mL

2. BBBキット™および培養液の保存方法

BBBキットは -80°C で保存してください。(商品お受け取りより1ヶ月間が品質保証期間です。)
培養液は -20°C 以下で保存してください。

3. BBBキット™の解凍・培養から使用まで (p2 以降をご覧ください。)

解凍^{1~8} \Rightarrow 1回目の^{9~10}培養液交換 \Rightarrow 培養¹¹ \Rightarrow 2回目の^{12~14}培養液交換 \Rightarrow 培養¹⁵ \Rightarrow 実験¹⁶

(番号はp2以降の手順番号です。)

4. BBBキット™の経内皮電気抵抗 (TEER)

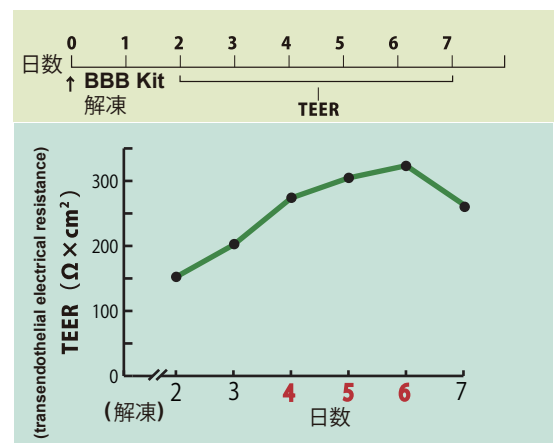
BBBキット™は **TEER 150 $\Omega \times \text{cm}^2$** 以上を保持しています。

-80°C で凍結保存していたBBBキット™ (RBT-24H) を、標準プロトコールに従って解凍・培地交換し、解凍後2日目よりTEERを測定しました。

※培養液には、cAMPやそのアナログはいっさい含まれておりません。

※解凍から4日目よりBBBキット™として使用可能です。
解凍から6日目いっぱいまでのご使用をお勧めします。

※ご使用前に必ず電気抵抗値を測定し、**TEER 150 $\Omega \times \text{cm}^2$** 以上であることをご確認ください。



※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。

3. BBBキット™の解凍から使用まで

[解凍日 (day 0)]

1. 凍結保管されている添付の培養液を、ウォーターバスで 37 °C に温めておきます。(30分~1時間程度)

2. BBBキット™ をフリーザーから取り出す前に、クリーンベンチ内に必要な器具を準備します。

• 200 μL と 1,000 μL 容量のマイクロピペット (以降P200、P1000と表記します) を各1本用意し、それぞれ200 μL、1,000 μLに設定し、滅菌済みチップを装着しておきます。

• BBBキット™ は箱ごとプラスチック袋に密閉されています。開封用にハサミを用意します。

• 温めておいた培養液を軽く振って中身を攪拌し、クリーンベンチに移します。

3. BBBキット™ をディープフリーザー (-80°C) から取り出し、ハサミでプラスチック袋を開封して取り出します。取り出した箱をクリーンベンチに入れ、箱からBBBキット™ を取り出し、セロファン袋から抜き取りします。

注意: BBBキット™ は構造上溶けやすいので、手で持つ際にはプレート底面に触れず、側面を持つようにしてください。また、工程6までの解凍作業は迅速・丁寧に行ってください。

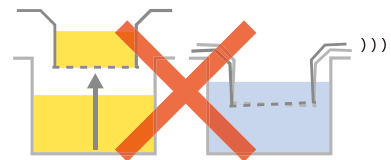
4. BBBキット™ の表面に氷・水滴が付着している場合は酒精綿等で拭きとり、直ちに次の工程へ進んでください。

注意: プレートを傾けたり逆さまにしないでください。プレートの表面についた水滴を内部に入れないようにしてください。

重要: 5~6の工程において、下記の操作は**絶対に行わないでください**。

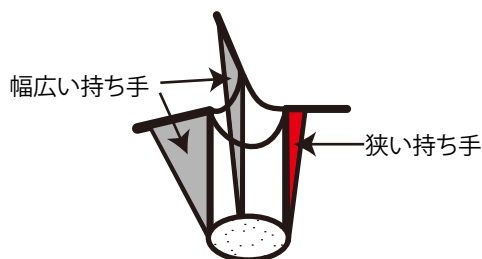
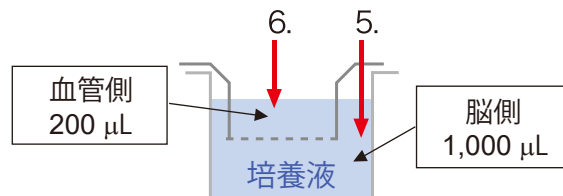
- ピペットチップでインサート膜に触れる、穴をあける。
- インサートを持ち上げたり、動かす。
- 培養液添加後に、脳側・血管側を懸濁する。

上記の操作を行ってしまうと、細胞が均一に分散されず、正常に機能しない場合があります。

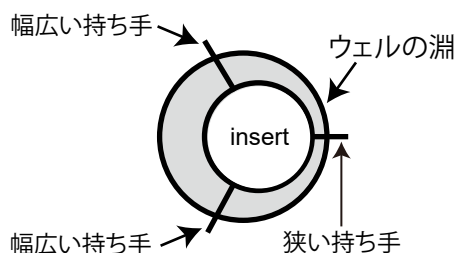


5. BBBキット™ のインサートが入っている全てのウェルの脳側(プレート側) に、培養液を1,000 μL添加します

注意: BBBキット™ のインサートには3つの持ち手があり、うち2つは幅が広く、一つは幅が狭くなっています。そのため、インサートはウェルの中心部から少しずれた状態でウェルに入っています。インサートとウェルの間の隙間が広い部分から培養液を脳側へ添加してください。ピペットチップの先端がウェルの壁に接触しても構いませんので、正確に1 mLずつ添加してください。



BBBキット™ インサートの構造



ウェル中のBBBキット™ インサート(俯瞰図)

6. インサートが入った全てのウェルの脳側に培養液を添加した後、全てのインサートの血管側(インサート内側)に培養液を200 μLずつ添加します。

7. 培養液添加後、プレートに蓋をして、表面と底に残っている水滴をふき取ってください。

8. CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) で2~3時間培養します。
培養液は再びウォーターバスもしくはCO₂ インキュベーターにて温めておいてください。

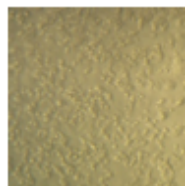
※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。

9. 2～3時間培養後、倒立顕微鏡でアストロサイトがウェル底面に接着していることを確認してください。

アストロサイトを観察する際は、視野をインサートとウェルの隙間に移して焦点を合わせてください。焦点が合いましたら、そのまま視野をインサート下に移していただくと、インサート直下にアストロサイトが集積・接着している様子が観察できます。プレートを軽く揺らして接着を確認してください。



アストロサイト



内皮細胞

注意: インサート膜性質上、伸展した内皮細胞を観察することはできません。(解凍直後は内皮細胞が観察できません) 内皮細胞とアストロサイトの一部のみ観察することができますので、その部分を目安に細胞の接着をご確認ください

10. 培養液交換作業の前に、必要な器具を準備します。

・マイクロピペット:

P1000 (300 μ Lに設定) とP5000 (1,200 μ Lに設定) を各1本、もしくはP1000を2本 (300 μ Lと600 μ Lに設定) 用意し、滅菌済みチップを装着しておきます。

・アスピレーター:

吸引ホースにP1000チップを接続し、さらに滅菌済みP200チップを接続すると、培養液の吸引操作が容易になります。

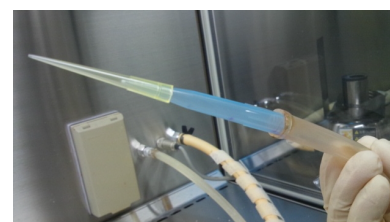
・先曲がりピンセット:

インサートをピックアップする際に用います。先端に溝がある先曲がりピンセット (No.7) を推奨しております。乾熱滅菌を済ませておくか、使用前に70%エタノールに先端を浸してから炙ることで滅菌してください。

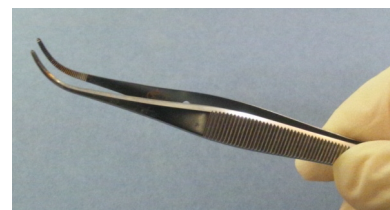
・培養液:

培養液をクリーンベンチ内に移しておきます。

培養液交換作業中は複数の器具を用いますので、必要のない器具はクリーンベンチの外に移して、作業空間を広く確保してください。



アスピレーター



ピンセット (有溝)

11. 培養液交換

培養液交換の手順は、内皮細胞が培養液に浸かっていない時間が最短となるように設定されています。

① インサートの幅が広い持ち手をピンセットでつまんで持ち上げます。インサートを落とさないように注意してください。

注意: インサート膜がプレートや他の器具に接触しないようにしてください。

② 脳側の培養液を吸引除去します。

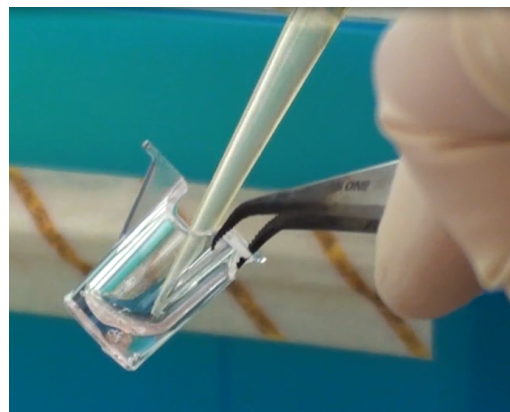
注意: 凍結保護剤にはDMSOが含まれているため、本工程ではしっかりと吸引除去してください。

ウェルの淵にはアストロサイトがほとんど存在しないため、アスピレーター先端部をウェルの淵に接触させても構いません。

③ 血管側の培養液を吸引除去します。

注意: インサート内部の培養液を吸引する際は、インサート膜と視線が垂直に交わるような角度でインサートを持ち、アスピレーターの先端をインサート内壁に沿わせながら徐々に下して吸引します。

②と同様に培養液をしっかり除去することが重要ですが、アスピレーターの先端がインサート膜に接しないように(膜に穴をあけたり、内皮細胞を傷つけないように)注意してください。インサート膜裏面に泡が付着している場合がありますが、無理に除去しないでください。



次項④へ続く →

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。

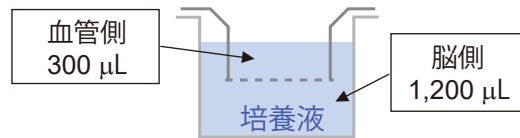
④ インサートをもとのウェルに戻します。

注意: ウェルに戻す際にインサート(特に膜面)がプレートにあたってしまうと、インサート膜にヘコミやキズ・穴ができてしまい、TEERが上昇しないことがあります。操作にご注意ください。

⑤ 準備しておいたP1000を用いて、血管側に培養液を300 μL ゆっくりと添加し、続いてP5000(1,200 μL に設定済)もしくはP1000(600 μL に設定済)を用いて、脳側に培養液を1,200 μL 添加します。

注意: 決められた量の培養液を正確に添加してください。

P1000を2本使用される場合には、300 mLに設定したものと600 mLに設定したものを区別しやすいように、ピペットをラベルすることをお勧めします。



⑥ ①～⑤を1ウェルごとに繰り返し、すべてのウェルの培養液を交換します。

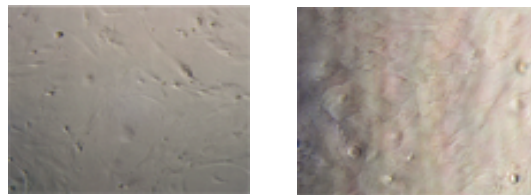
注意: どのウェルまで培養液交換を行ったかを意識しながら操作してください。培養液交換されていないウェルはTEERが保証値まで上昇しない可能性があります。

12. CO₂ インキュベーター(37 °C, 5% CO₂)にて一昼夜培養します。

残った培養液は翌日の培養液交換に用いますので、冷蔵庫にて保管してください。

【 解凍翌日 (day 1) 】

13. 工程9と同様に倒立顕微鏡でアストロサイトを観察し、接着・伸展していることを確認します。

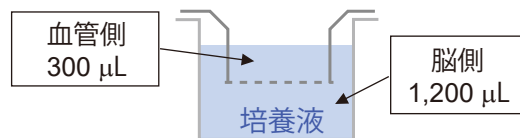


アストロサイト

14. 添付の培養液を、ウォーターバスで37 °Cに温めておきます。(30分～1時間程度)

15. 工程11と同様の手順で培養液を交換します。

細胞やインサート膜を傷つけないように、1ウェルずつ丁寧に行ってください。



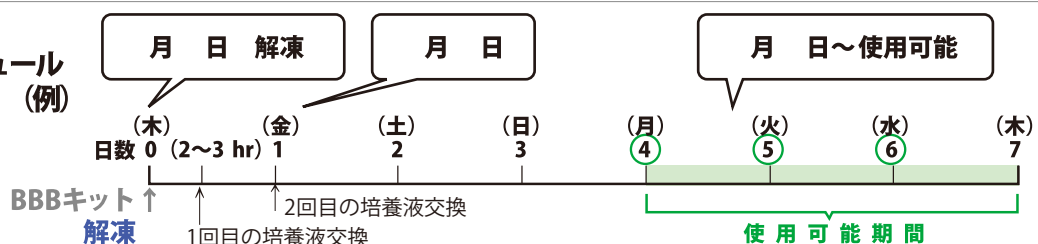
16. CO₂ インキュベーター(37 °C, 5% CO₂)にて3日間(解凍日を0日目として、4日目まで)培養します。

工程15以降、培養液交換の必要はありません。

17. 4日目にBBBキット™のTEERは150 $\Omega \times \text{cm}^2$ 以上に達し、7日目までBBB機能を維持します。

注意: 実験前に必ずTEERを測定し、実験に用いるすべてのBBBキット™インサートのTEERが150 $\Omega \times \text{cm}^2$ 以上であることをご確認ください。

実験スケジュール (例)



※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。