

PRODUCT SHEET

サーカディアンリズム評価細胞
(Bmal1-ELuc MEF)
CAT# GP-M02-P2

1. はじめに

【サーカディアンリズム評価細胞について】

本製品は、*bmal1*プロモーター下流にELucを連結したコンストラクトを用いて作製されたトランスジェニックマウス(Bmal1-ELucマウス)から調製した胚性線維芽細胞で、時計遺伝子*bmal1*の発現リズムを測定できます。

2. サーカディアンリズム測定プロトコル

【細胞】

- サーカディアンリズム評価細胞 (LOT#170331F23007)

【試薬】

- DMEM, high glucose (Wako, CAT#044-29765)
- FBS (Sigma, CAT#172012)
- Penicillin/Streptomycin (GIBCO, CAT#15140-122)
- D-PBS (-) (Wako, CAT#045-29795)
- 0.25% Trypsin/EDTA (Wako, CAT#201-16945)
- Dexamethasone (Sigma, CAT#D4902)
- D-Luciferin (カリウム塩) (TOYOBO, MRL-101)

【機器】

- Kronos Dio (ATTO, CAT#AB-2550)

【培地】

▶ 基本培地組成

DMEM, high glucose	445 mL
FBS	50 mL
Penicillin/Streptomycin	5 mL

【試薬調整方法】

▶ Dexamethasone :

エタノールで10 mMに調整し、-20℃で保存。10 mM DexをPBSで1 μMに希釈し、最終濃度100 nMになるよう培地に添加。

▶ D-Luciferin :

PBSで50 mMに調整し、-20℃で保存。50 mM D-ルシフェリンを最終濃度100 μMになるよう培地に添加。

【試験スケジュール】



※1：細胞の増殖速度はFBSのロット等によって前後することがあります。

※2：4日以上培養する場合は、培地交換を行うことを推奨します。

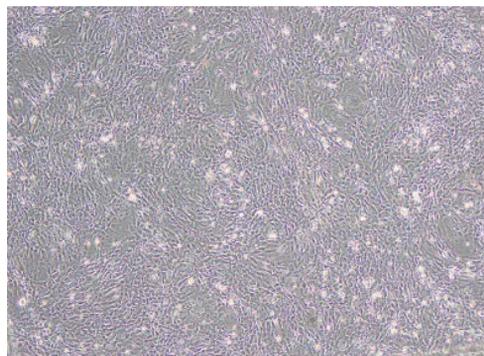
※3：10cm dish 80%コンフルで測定用35mm dish約8枚に播種できます。

※4：測定2時間前にDex 添加による同調処理を行い、その後ルシフェリン培地に置換して測定を開始します。

【試験内容】

▶ 細胞起眠・培養

- 基本培地9 mLをチューブに分取し、恒温槽で37℃に温める。
- 凍結細胞を37℃恒温槽で融解し、①の培地で回収する。
- 300×g前後で3分間遠心して細胞を集める。上清を吸引除去し、基本培地10 mLに細胞を懸濁し、10cm dishで培養を開始する(37℃, 5%CO₂)。
- 80%コンフル(右図参照)になるまで、細胞の状態を適宜確認し、4日以上培養が必要な場合は培地交換を行う。



(図) 継代前の細胞の様子

▶ 継代・同調処理

- 基本培地を恒温槽で37℃に温める。
- 培地除去後、細胞をPBSで2回程度洗浄し、0.125% Trypsinを添加。インキュベータ内に3分間静置する。
- 37℃に温めた基本培地で細胞を回収し、300×g前後で3分間遠心して細胞を集める。上清を吸引除去後、基本培地で懸濁し、細胞数を計測する。
- 細胞数を調整した後、細胞を播種(1.0×10⁵個/35mm dish)し、翌日の試験まで培養する。
- 細胞播種24時間後、100 nMデキサメタゾン培地に置換し、37℃, 5%CO₂インキュベータ内で2時間培養する。

▶ サーカディアンリズム測定

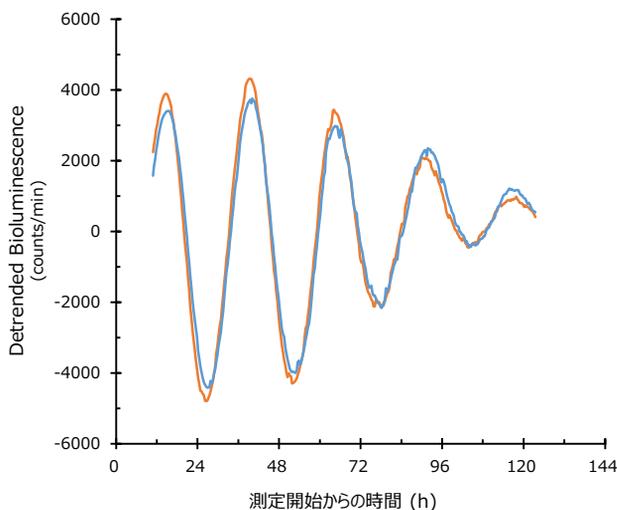
- 測定に用いる機器のセットアップを行う(庫内温度37℃, 5%CO₂, 乾燥防止のための含水スポンジを設置)。
- Dex培地で2時間処理した後、培地をルシフェリン培地に置換する。
- ルシフェリン培地に置換後、速やかに測定機器内に細胞を移動し、測定を開始する。

【測定条件】

測定時間 : 1分間
 測定間隔 : 20分間
 フィルター : FO (フィルターなし, 全光)
 デイトレンド処理 : 測定データの前後12時間の移動平均値でトレンド除去
 平滑化処理 : 測定データの前後2時間の移動平均値で平滑化

【測定結果】

サーカディアンリズムは、Dexによる同調処理が完了した後、144時間測定し、下記のデータを取得しました。



お願い：本品到着後、下記内容をご確認の上、製品を保管又はご使用ください。

3. 使用上の注意

【細胞試料の送付と保管について】

本凍結細胞試料（以下、「本品」とします。）は、ドライアイス同梱にてお送りしています。本品は到着後、すみやかに実験に使用してください。

到着後ただちに実験に使用しない場合は、融解と品質低下を防ぐため、すみやかに以下の条件で保存してください。細心の注意を払ってお届けしておりますが、万が一容器の破損が認められた場合や同梱ドライアイスが消失していた場合は、ただちに販売元にご連絡ください。

▶ 保存条件

• 液体窒素タンク

気相での保存を推奨いたします。液相にて保存した場合、チューブ内に液体窒素が流入し、融解の際にチューブが破裂又は内容物が飛散する危険があります。作業には、細心の注意をはらってください（「融解にあたっての注意」参照）。

• 超低温フリーザー（-140℃）、ディープフリーザー（-80℃）

ディープフリーザーで保存する場合は、必ず保存開始後1週間以内にご使用ください。ディープフリーザーで長期保存した場合には劣化の恐れがあります。

【融解にあたっての注意】

液体窒素からの取り出し・融解時には安全のため、厚手の手袋とフェイスガードを装着してください。特に凍結チューブが液体窒素の液相に保管されていた場合には、凍結チューブのわずかな隙間に液体窒素が流入し、取り出し・融解時に急激にチューブが膨張して破裂、又は内容物が飛散する恐れがありますので、作業には細心の注意を払って下さい。

【使用又は取扱いにあたっての注意】

- 本品は研究用です。それ以外の目的（治療・診断・飲食物・その他）には使用しないでください。
- 容器の破損、または容器内に異物が認められた場合は使用しないでください。
- 本品を取扱う際には、安全キャビネットを使用し、実験用手袋・保護用ゴーグル・マスク・白衣の着用等、安全対策を十分にとってください。
- 本品の使用にあたっては細胞培養技術を習熟の上でバイオハザード対策を実施し、すべての操作は無菌的に行ってください。
- 本品を誤って飲み込んだりしないように十分注意してください。万一、飲み込んでしまった場合、すぐに吐き出してください。眼、皮膚等に付いた場合、すぐに洗浄してください。異常が見られた場合は、すぐに医師の診察を受けてください。
- Product Sheet及び本使用上の注意に記載された操作以外の方法で本品を取り扱った場合については、本品の品質・性能を保証いたしかねます。
- 本品は培養後に再凍結できません。凍結融解を繰り返した場合、または起眠・培養後に再度凍結した細胞の品質・性能については、保証いたしかねます。
- 本品は、納品後ただちに実験に使用してください。すぐに実験を開始できない場合は、弊社指定の保存条件で保存し、納品1か月以内にご使用ください。
- 本品は、起眠後2継代以内にご使用ください。長期間の培養等による細胞の異常、性能の低下については、保証いたしかねます。
- 本品を不死化あるいは遺伝子改変することを禁じます。
- 本品はお客様自身が遂行する研究の為にのみ使用できるものです。本品またはその構成成分を第三者へ移転・販売・譲渡することはできません。

以上