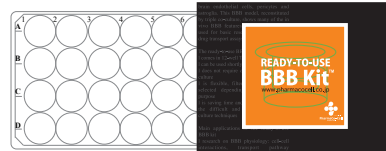




内容

- ◎BBBキット (MBT-24)
- ◎培養液
- ◎プランク用インサート (Millicell® x 4 inserts)
- ◎品質保証書
- ◎使用プロトコル

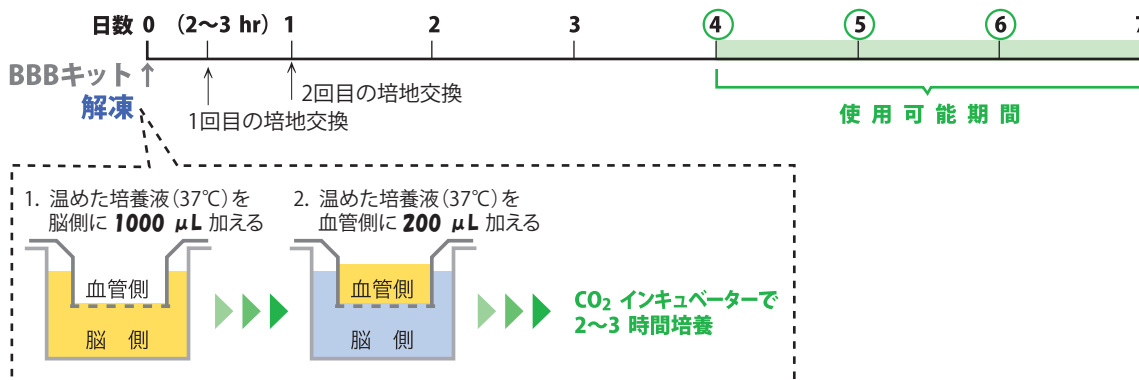


※内容をご確認ください。

取り扱い方法【解凍からBBBキット(MBT-24)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。



解凍後、培養液の添加量

	解凍	1回目の 培地交換	2回目の 培地交換
血管側	200 μL	300 μL	300 μL
脳側	1000 μL	1200 μL	1200 μL

※ 培養液の組成

10%PDS / DMEM F-12:
 Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM F-12)
 Fetal Bovine Plasma Derived Serum (PDS) 10% (v/v)
 Heparin 100 $\mu\text{g/mL}$
 basic Fibroblast growth factor (bFGF) 1.5 ng/mL
 Insulin-Transferrin-sodium Selenite (ITS) insulin 5 $\mu\text{g/mL}$, transferrin 5 $\mu\text{g/mL}$, sodium selenite 5 ng/mL
 Hydrocortisone 500 nM
 Gentamicin 50 $\mu\text{g/mL}$

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。(商品到着より1ヶ月以内にご使用ください。)
 培養液は -20°C 以下で保存してください。

3. BBBキット解凍・培養そしてBBBキットの使用まで (p2) をご覧ください)

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

(番号は p2 の手順番号です。)

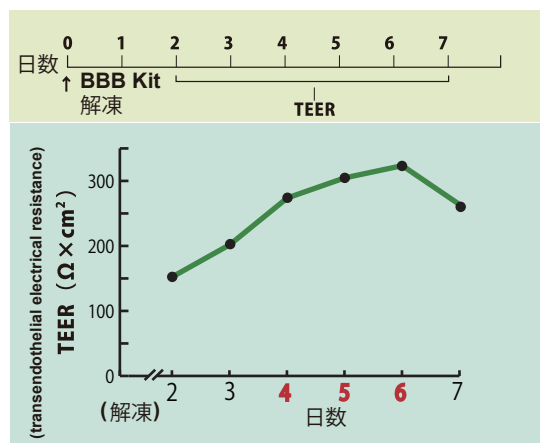
4. BBBキット (MBT-24)の 経内皮電気抵抗 (TEER)

BBBキット (MBT-24) 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 (MBT-24) を、標準プロトコルに従って解凍・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つ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。

※ご使用の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。



ファーマコセル株式会社

本社 / BBBラボラトリー (中央研究所)
 〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学教室
 TEL: 095-819-7041 / FAX: 095-819-7044
 URL: <http://www.pharmacocell.co.jp> / e-mail: info@pharmacocell.co.jp

3. BBBキット解凍・培養そしてBBBキットの使用まで

一般的な細胞培養設備・細胞培養技術でご利用いただけます。

【解凍日】

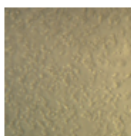
1. 付属の培養液をあらかじめウォーターバスやインキュベーターで37℃に温めておきます。培養液は凍ったままウォーターバスやインキュベーターに入れて温めてください。
2. 37℃に温めておいた培養液をクリーンベンチ内に移します。解凍に用いるピペットやチップも用意しておきます。
3. ディープフリーザー(-80℃)からBBBキットを取り出し、すばやくクリーンベンチの中に入れ、本体を出します。BBBキットを密封しているセロファン袋は、必ずクリーンベンチの中で外してください。BBBキットは構造上とても溶けやすいので、ディープフリーザーから取り出して解凍するまでの工程は、素早く行ってください。
4. 取り出したBBBキットの表面に氷や水滴が付着している場合は、酒精綿などでふき取り、直ちに次の工程へ進んでください。このとき、プレート逆さまにしないように注意してください。また、プレートの表面についた水滴をキットの中に入れないように注意してください。
5. 凍った状態のBBBキットの全てのwellの脳側(プレート側)に、培養液を1000 μ Lずつ添加します。脳側に培養液を添加する際は、インサートのすき間の広い部分から添加してください。

※5.~7.の工程において、

- ①ピペットの先でインサート膜に触れたり、インサートを外したり動かしたりしないで下さい。
- ②培養液添加時に脳側・血管側ともに懸濁は行わないで下さい。細胞が均一に分散されず、BBBキットが正常に機能しない場合があります。



6. 全てのwellの脳側に培養液を添加した後、全てのwellの血管側(インサート内側)に培養液を200 μ Lずつ添加します。
7. 解凍作業後、プレートの表面と底に残っている水滴を消毒用エタノールで濡らしたキムワイブ等で拭き取ってください。
8. CO₂インキュベーターで2~3時間培養します。この間に培養液を37℃に温めておいてください。
9. 2~3時間培養後、倒立顕微鏡でアストロサイトが接着していることを確認してください。

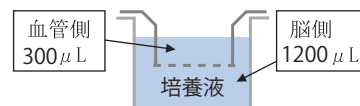
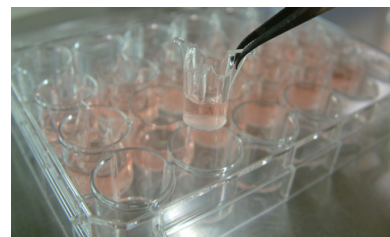


アストロサイト

内皮細胞

MBT-24はインサート膜の性質上、伸展した内皮細胞を観察することができません。(解凍直後は、内皮細胞が観察できます。)内皮細胞とアストロサイトの一部のみ鏡検することができますので、その一部を目安に細胞の接着をご確認ください。

10. インサートをピンセットで持ち上げ、脳側の培養液を吸引します。次に血管側の培養液を吸引し、37℃に温めていた培養液を血管側に300 μ L、続いて脳側に1200 μ L添加します。
この作業を1wellごとに繰り返し、全てのwellの培養液交換を行います。
チップやピペットの先で細胞を傷つけないように、1wellごとに培養液の吸引と添加を丁寧に行ってください。



11. CO₂インキュベーターで一昼夜培養します。

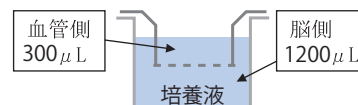
【解凍翌日】

12. 倒立顕微鏡で、アストロサイトが接着・伸展している状態を確認します。



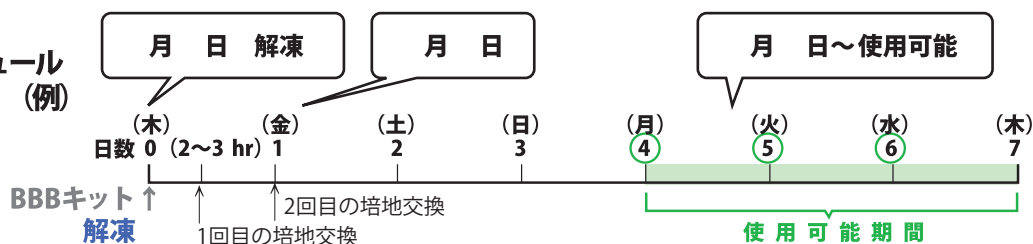
アストロサイト

13. 付属の培養液を、あらかじめウォーターバスやインキュベーターで37℃に温めておきます。
14. 10.の培養液交換と同じ要領で培養液を吸引し、温めていた培養液に交換します。細胞を傷つけないように、1wellずつ丁寧に行ってください。



15. CO₂インキュベーターで3日間培養します。(解凍日から4日目まで)
16. 各インサートの電気抵抗値(TEER)を測定し、**150 Ω × cm²以上であることを確認後**、目的の実験を行なってください。

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。