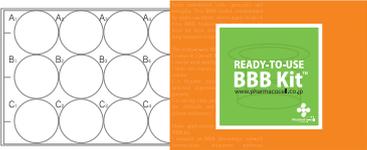




**内容**

- ◎BBBキット (PET-12)
- ◎解凍液
- ◎培養液1
- ◎培養液2
- ◎コントロール用 コーニング社Transwell® (#3460)
- ◎使用プロトコール
- ◎品質保証書

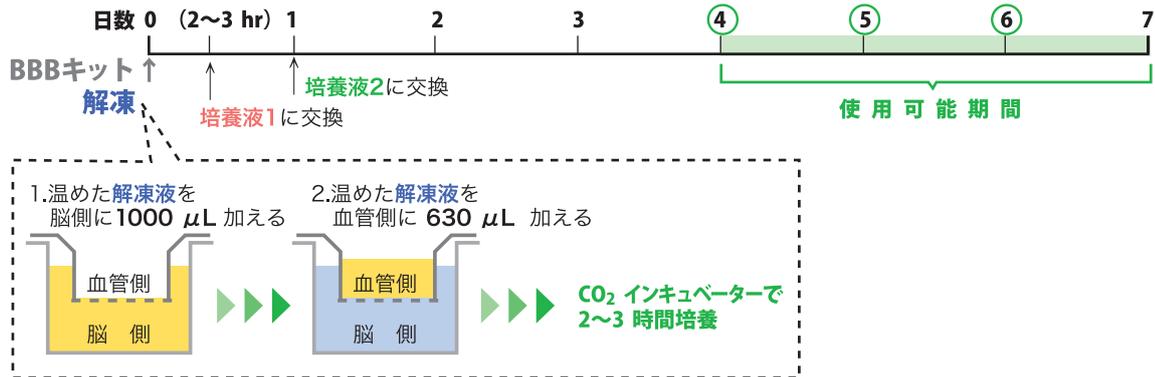


※内容をご確認ください。

## 取り扱い方法 [解凍からBBBキット (PET-12) 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

	解凍液	培養液1	培養液2 ※
血管側	630 µL	500 µL	500 µL
脳側	1000 µL	1500 µL	1500 µL

※培養液2 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) 1.0% (v/v)  
 Heparin 1.00 µg/mL  
 basic Fibroblast growth factor (bFGF) 1.5 ng/mL  
 Insulin-Transferrin-sodium Selenite (ITS) insulin 5 µg/mL, transferrin 5 µg/mL, sodium selenite 5 ng/mL  
 Hydrocortisone 500 nM  
 Gentamicin 50 µg/mL

### 2. BBBキットおよび解凍液・培養液の保存方法

BBBキットは  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存して下さい。(  $-80^{\circ}\text{C}$  で6ヶ月保存できますが、1ヶ月以内にご使用ください。)

解凍液と培養液は  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で保存して下さい。

### 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<sup>1~8</sup> ⇒ 培地交換<sup>9~10</sup> ⇒ 培養<sup>11</sup> ⇒ 培地交換<sup>12~14</sup> ⇒ 培養<sup>15</sup> ⇒ 実験<sup>16</sup>  
解凍液 培養液1 培養液2

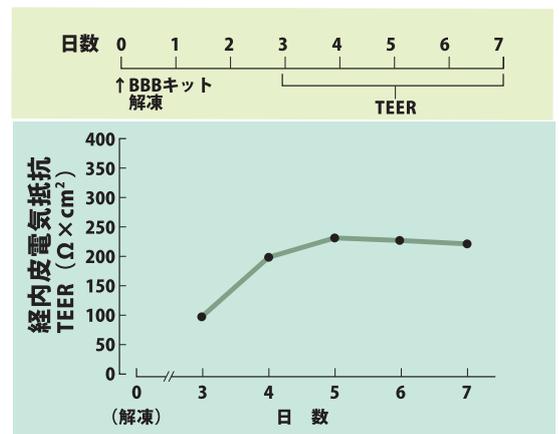
(番号は p2 の手順番号です。)

### 4. BBBキット (PET-12) の 経内皮電気抵抗 (TEER)

BBBキット (PET-12) は  $\text{TEER } 150 \Omega \times \text{cm}^2$  以上を保持しています。  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存していた BBBキット (PET-12) を解凍後、培養液1と培養液2\*に交換し、3日目より TEER を測定しました。

(\*解凍液と培養液1、2にはcAMPやそのアナログはいっさい含まれておりません。)

※4日目から BBBキットとして使用可能です。10日目まで  $\text{TEER } 150 \Omega \times \text{cm}^2$  以上を確認していますが、解凍から6日目いっぱいまでのご使用をお勧めします。



※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

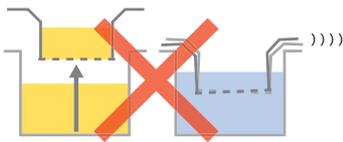
本社 / BBBラボラトリー (中央研究所)  
 〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学第一教室内  
 TEL: 095-819-7041 / FAX: 095-819-7044  
 URL: <http://www.pharmacocell.co.jp> / e-mail: [info@pharmacocell.co.jp](mailto:info@pharmacocell.co.jp)

### 3. BBBキット解凍・培養そしてBBBキットの使用まで

一般的な細胞培養技術で、どこでもご利用できます。

#### 【解凍日】

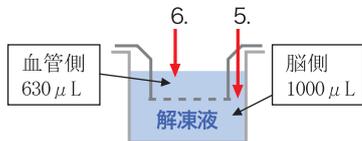
1. 付属の**解凍液**をあらかじめウォーターバスやインキュベーターで37°Cに温めておきます。( **解凍液**は凍ったままウォーターバスやインキュベーターに入れて温めてください。)
2. 37°Cに温めておいた**解凍液**をクリーンベンチ内に用意しておきます。
3. ディープフリーザー(-80°C)からBBBキットを取り出し、すばやくクリーンベンチの中に入れ、中身を出します。BBBキットを密封しているセロファンの袋は、必ず、クリーンベンチの中で、はずしてください。(BBBキットは構造上とても溶けやすいので、ディープフリーザーから取り出して解凍するまでの工程は、すばやく行ってください。)
4. 取り出したBBBキットの表面に氷や水滴がついている場合は、消毒用エタノールを噴霧し、キムワイブなどでふき取ってください。このとき、プレートを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ていないように注意してください。
5. このあと直ちに、凍った状態のBBBキットの脳側に、**解凍液**を1000 μLずつ添加します(12 well分)。脳側に**解凍液**を添加するときは、インサートのすき間から添加してください。



※5.~7.の工程においてピペットの先でメンブレンに触れたり、インサートをはずしたり動かしたりしないように注意してください。

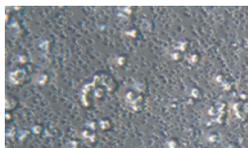
アストロサイトが均一に分散されず、BBBキットが正常に機能しない場合があります。

6. 脳側に12 well分添加したあと、血管側(インサートの内側)に**解凍液**を630 μLずつ添加します(12 well分)。

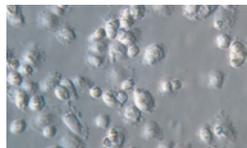


7. 血管側(インサートの内側)の細胞を分散させるため、ピペッターで5~10回ほど軽く懸濁します(12 well分)。解凍作業終了後、プレートの表面と底に残っている水滴を消毒用エタノールで濡らしたキムワイブ等で拭き取ってください。  
\*脳側(アストロサイト播種部位)は懸濁しないでください。
8. CO<sub>2</sub>インキュベーターで2~3時間培養します。この間に、**培養液1**を37°Cに温めておいてください。

9. 2~3時間培養後、倒立顕微鏡で細胞が張り付いていることを確認してください。

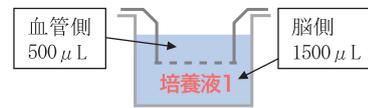
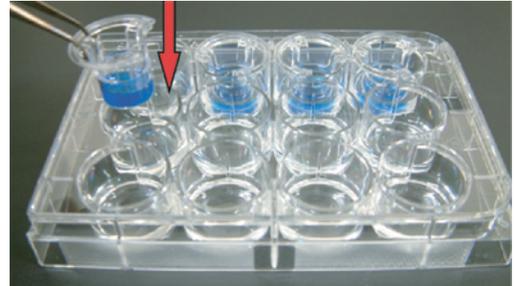


内皮細胞(強拡)



アストロサイト(強拡)

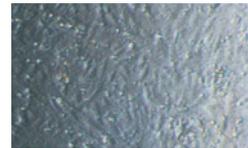
10. インサートをピンセットで持ち上げ、脳側の**解凍液**を吸引します。インサートを戻し、37°Cに温めていた**培養液1**をインサートの隙間から1500 μL脳側に入れます(赤矢印)。次に、血管側(インサート内)の**解凍液**を吸引し、37°Cに温めていた**培養液1**を500 μL加えます。この作業を繰り返し、BBBキットすべてのwellの**解凍液**を**培養液1**に交換します。(細胞を傷つけないよう1 wellごとに吸引して**培養液1**の添加は丁寧にしてください。)



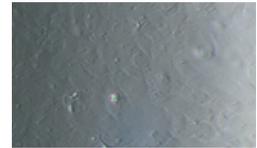
11. CO<sub>2</sub>インキュベーターで、一昼夜培養します。

#### 【解凍翌日】

12. 倒立顕微鏡で細胞がコンフルエントになった状態を確認してください。

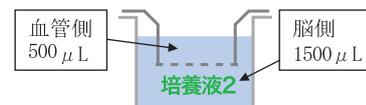


内皮細胞(弱拡)



アストロサイト(弱拡)

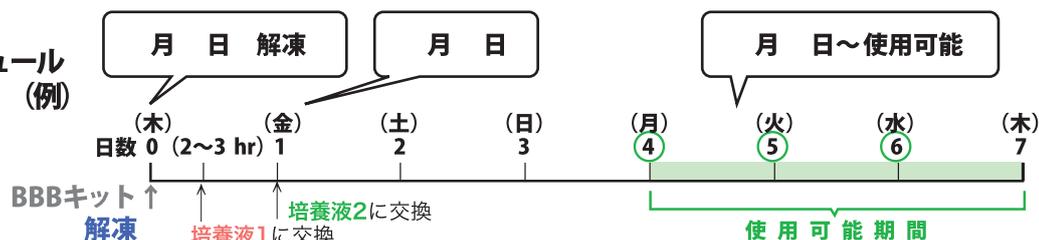
13. 付属の**培養液2**をあらかじめウォーターバスやインキュベーターで37°Cに温めておきます。( **培養液2**は凍ったままウォーターバスやインキュベーターに入れて温めてください。)
14. 10.の**解凍液**の吸引と**培養液1**の交換と同じ要領で、**培養液1**を吸引し、**培養液2**に交換します。(細胞を傷つけないよう1 wellごとに丁寧にしてください。)



15. CO<sub>2</sub>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. 目的の実験を行ってください。(4日目からBBBキットとして使用可能です。10日目までTEER 150 Ω x cm<sup>2</sup>以上を確認していますが、解凍から6日目いっぱいまでのご使用をお勧めします。)

#### 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。