

POCA[®]小腸吸収（CACO-2）PC

取扱説明書



目次

1. 製品特徴	P2
2. 梱包内容	P2
3. 製品操作説明	P3
4. 製品 Q&A	P6
5. お問い合わせ先	P9

この度は、POCA[®]小腸吸収（CACO-2）PC をお求めいただきまして誠にありがとうございます。

ご使用前に下記説明をご一読いただき、ご利用下さい。

1. 製品特徴

POCA[®]小腸吸収（CACO-2）PCは「ECACC（European Collection of Cell Culture）」の標準株細胞 CACO-2（ECACC カタログ番号 86010202）をコーニング社の Transwell プレートに播種した状態でお届けする小腸吸収評価用のアッセイキットです。ECACC のオリジナル CACO-2 細胞を播種しており、一定の品質にてお届けしております。ご注文後、培養を開始し基本的には播種 19 日目（定期的に培地交換）に発送、20 日目に到着致します。

2. 梱包内容

【24well タイプ】



4 カップー組の発送容器になっております。



上段にインサートカップ入り容器
下段に、アッセイ用の空プレートが
入っております。

【12well タイプ】



12well の空プレートも別添でお送りしております。

インサートカップを別容器に入れ、培地で満たした状態で発送しております。

3. 製品操作説明

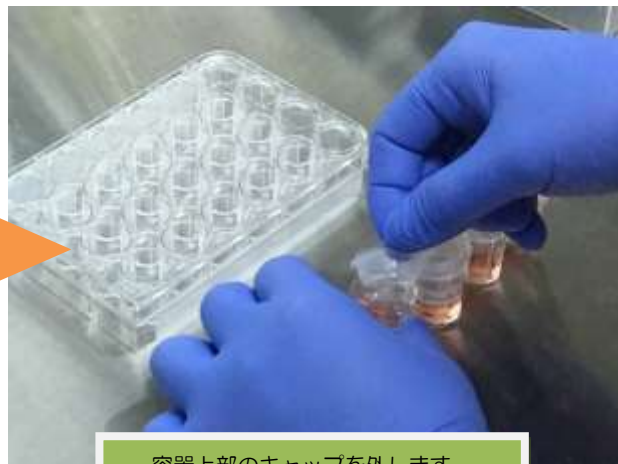
本製品は発送容器にインサートカップが入った状態で発送しており、輸送により泡立ちが発生している可能性があります。泡立ちの有無に関わらず、下記の手順にて培地交換を推奨いたします。必ず全ての作業を無菌状態にて行って下さい。

(12well タイプの培地交換につきましては、P5 をご参照下さい。)

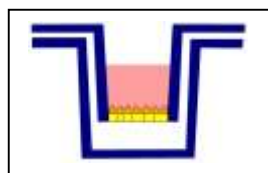
24well プレートタイプ時の培地交換手順



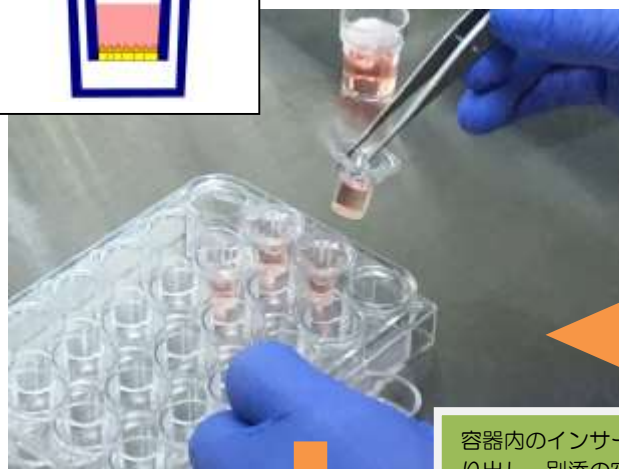
キットから容器を取り出します。



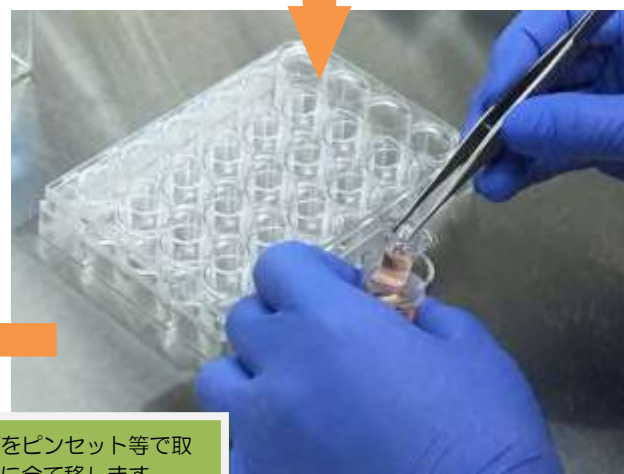
容器上部のキャップを外します。



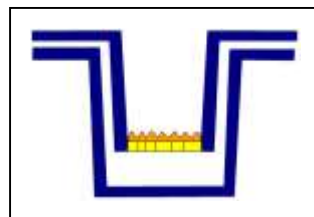
イメージ画像

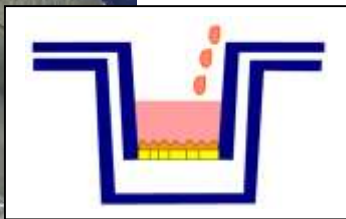
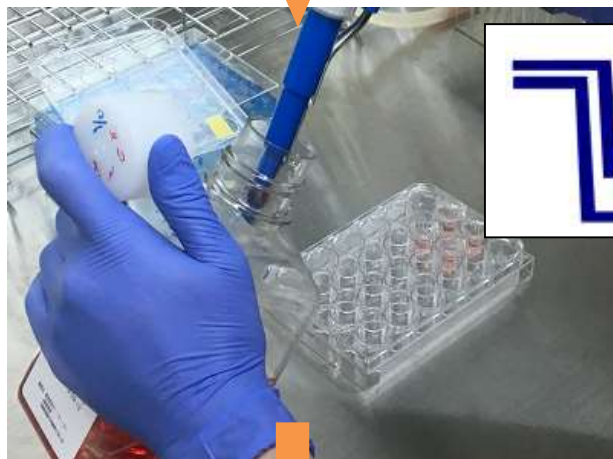


容器内のインサートカップをピンセット等で取り出し、別添の空プレートに全て移します。



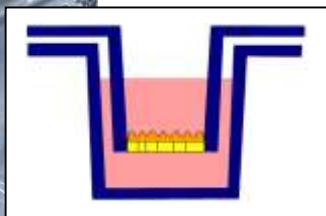
アスピレーターもしくはピペットでインサート内の培地を吸引除去します。





別売の「細胞メンテナンス用培地」もしくは D-MEM【Low/High グルコースどちらでも可】+FBS10%+2mM グルタミンをインサート側から滴下しながら全ての well に入れます。外側から入れた場合、メンブラン下側からのバック圧で細胞が剥がれる可能性があります。

※滴下容量につきましては、本ページの下記記載の容量をご参照下さい。



インサート上部の隙間よりインサート外側に培地を入れる。

※滴下容量につきましては、本ページの下記に記載の容量をご参照下さい。

全ての培地交換が終了しましたらプレート蓋をし、37℃、5%の CO₂ インキュベーターに入れ、翌日よりアッセイを開始して下さい。

【培地添加量】

プレート タイプ	インサート内側 添加培地量	インサート外側 添加培地量
12 well	500 μ L	1500 μ L
24 well	100 μ L	600 μ L

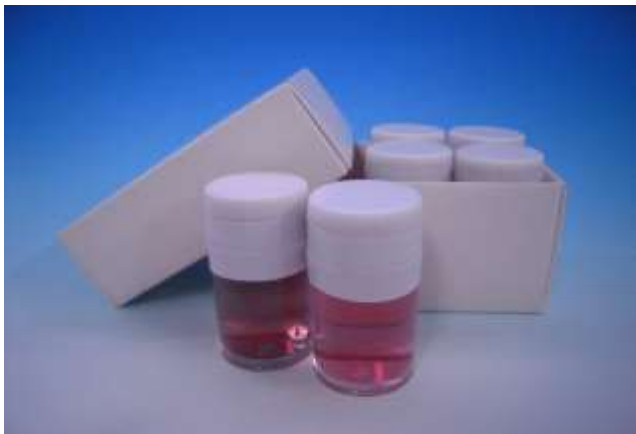
<12well タイプ Transwell プレートの発送形態とアッセイ準備手順>

12well プレートは、発送形態が 24well タイプと違います。

下記の操作手順に従って、アッセイまでのご準備をお願いします。

<操作手順>

- ① 製品が届きましたら、インサートカップが入った円柱形容器に巻いてるビニールテープを剥がし、インサートカップを取り出します。
- ② インサートカップを空の 12well プレートに入れ、予め準備した培地（D-MEM+10%FBS+2mM グルタミン）をインサート内側に 500 μ L、外側に 1,500 μ L の順で添加します。
- ③ プレートの蓋をし、丸一日 37°C 5%の CO₂ インキュベーターに入れて、翌日からアッセイを開始して下さい。



4. 製品Q&A

【目次】

Q1：POCA 小腸吸収（CACO-2）はどのような製品ですか？

Q2：CACO-2 細胞自身のトランスポーター発現データや、薬物を吸収させた時のデータはお持ちですか？

Q3：プレートタイプやメンブレンのポアサイズの選択は可能ですか？ また、どのように使い分けますか？

Q4：CACO-2 細胞の膜抵抗値はある程度の希望の値のものを送っていただく事は可能ですか？

Q5：製品が到着後、培地を交換しインキュベーターに入れると説明書に記載ありますが、その培地中に血清や抗生物質も添加しますか？

Q6：CACO-2 細胞は継代可能でかつ実験者が Transwell プレートに播種しアッセイ可能ですが、このようなサービスを始めた理由は何ですか？

Q7：製品はどのように送られて来ますか？

Q8：購入後、細胞の状態が良くない場合、補償はしてもらえますか？

Q9：透過性試験用サンプルの前処理はどのようにしますか？

Q10：インサート側からマルチウエル側の透過性評価をする場合には、プレインキュベーションする前にインサート側だけ HBSS +HEPES で1～2 回洗浄するとパンフレットに記載されておりますが、反対方向の吸収評価をする場合はインサート側ではなくマルチウエル側を1～2 回洗浄することになるのでしょうか？

Q11：使用 Transwell プレートのメンブレンの種類を教えてください。

Q12：各ウエルプレートの 1well あたりのインサート側メンブレンの直径と表面積を教えてください。

Q13：製品が到着後、何日目位まで透過試験に使用可能ですか？

Q14：出荷時に添付しております膜抵抗値はいつ測定された時の値ですか？

Q15：アッセイするためのプロトコールはお持ちですか？

Q16：経時的にアッセイするために、インサート内側・外側のバッファの容量を規定量より多く入れたいのですが、可能ですか？

【回答】

Q1：POCA 小腸吸収（CACO-2）はどのような製品ですか？

A1：英国の公的な細胞バンクである ECACC (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.jsp>)

より CACO-2 細胞を仕入れ、Transwell プレートに 19 日間（2～3 日に一回培地交換）培養させた状態でお届けしている製品で、化合物等の吸収評価などに使用致します。

製品は全て ECACC のオリジナル CACO-2 を使用しプレートに播種しているため、一定の品質でお送りすることが可能です。

Q2：CACO-2 細胞のトランスポーター発現データやロット間差がないデータはお持ちですか？

A2：P-gp (MDR-1) と BCRP に関する輸送能と阻害能のデータを取得しており、両トランスポーターの発現と機能を確認しております。また CACO-2 細胞 2 ロットにおいてロット差がないことも確認済みです。詳細につきましては下記アドレスよりご確認下さい。

<http://www.saibou.jp/service/poca/pdf/poca-caco2-leaflet.pdf>

Q3：プレートタイプやメンブレンのポアサイズの選択は可能ですか？ また、どのように使い分けますか？

A3：基本的にプレートはコーニング社の 12、24well Transwell プレートの中から選択していただき、メンブレンのポアサイズの大きさにつきまして、0.4、3 μ m から選択可能です。0.4 μ m は細胞培養や共培養のアプリケーション、薬物輸送研究に使用されます。3 μ m は、ケモタキシスや血管新生のアプリケーションに推奨されます。（Corning 社掲載カタログ情報）

Q4：CACO-2 細胞の膜抵抗値はある程度の希望の値のものを送っていただく事は可能ですか？

A4：通常は培養開始後 19 日目に発送し 20 日目に到着させておりますが、低い抵抗値をご希望の場合には、別途お問い合わせ下さい。

（連絡先：06-6435-9747）

Q5：製品が到着後、培地を交換しインキュベーターに入れると説明書に記載ありますが、その培地中に血清や抗生物質も添加しますか？

A5：D-MEM（Low/High グルコースタイプどちらでも可、グルタミン最終濃度 2mM）に約 10%になるように FBS（非働化済み FBS が望ましい）を添加し調製したもので培地交換します。

抗生物質につきましては、実験系により添加していただいても問題ございません。

Q6：CACO-2 細胞は継代可能でかつ実験者が Transwell プレートに播種しアッセイ可能ですが、このようなサービスを始めた理由は？

A6：まず培養期間が 20 日間と長い点と、施設間により化合物の透過速度のバラツキが大きいことがサービスを開始した大きな要因です。弊社は品質保証を担保している英国の公的細胞バンクである ECACC より細胞を輸入し、継代を経ずに播種しているため、一定の品質の製品をお送りしております。

Q7：製品はどのように送られて来ますか？

A7：12well プレート、24well プレートともに、インサートカップを下記画像のように別容器に入れた形で発送しております。冬場は蓄熱材とカイロを同梱し温めた状態で発送しております。



<12well>



<24well>

Q8：購入後、細胞の状態が良くない場合、補償はしてもらえますか？

A8：配送状態により若干の培地が漏れている場合がございますが、膜抵抗値が300Ω以上あれば性能に問題はございません。膜抵抗値が300Ω以下の場合には代替品を発送させていただいております。

Q9：透過性試験用サンプルの前処理はどのようにしますか？

A9：透過試験を実施する化合物や素材により異なりますが、DMSOなどの溶媒で溶解したサンプルを、DMSOの最終濃度が0.1%以下になるようにHBSS-HEPESなどのバッファーに溶解しております。

Q10：インサート側からマルチウエル側の透過性評価をする場合には、プレインキュベーションする前にインサート側だけHBSS+HEPESで1～2回洗浄するとパンフレットに記載されておりますが、反対方向の吸収評価をする場合はインサート側ではなくマルチウエル側を1～2回洗浄することになるのでしょうか？

A10：反対方向の吸収評価時も、インサート側を再度洗浄して下さい。

Q11：使用Transwellプレートのメンブレンの種類を教えてください。

A11：コーニング社のTranswellプレートを使用しており、メンブレンの材質はポリカーボネートです。

Q12：各ウエルプレートの1wellあたりのインサート側メンブレンの直径と表面積を教えてください。

A12：24wellは6.5mmで0.33cm²、12wellは12mmで1.12cm²です。

Q13：製品が到着後、何日目位まで透過試験に使用可能ですか？

A13：到着日を含め3日目位（例：6/1に到着した場合、6/3）までご利用可能ですが、3日目は膜抵抗値が高く機能を担保していない場合がございます。

Q14：出荷時に添付しております膜抵抗値はいつ測定された時の値ですか？

A14：膜抵抗値測定はメルク社のMillCellを使用しております。出荷前に培地中に直接電極を差し込み測定した後、新しい培地に交換して出荷しております。

Q15：アッセイするためのプロトコールはお持ちですか？

A15：お客様によりアッセイ方法が様々なため、決まったプロトコールは持っておりません。ただ一般的にご利用されておりますTransport Bufferと致しましてはHBSS（with Ca²⁺、Mg²⁺）にHEPES（10mM）やグルコース（25mM）を添加させpHを7.4付近に調整したものに、サンプルを溶解させたPBSもしくはDMSO（0.1%以下）を添加溶解して透過試験を実施しております。Ca²⁺、Mg²⁺は細胞間接着に影響がございますので、両イオンを含まないBufferを使用致しますと、バリア機能が弱くなります。トランスポーターの中にはpHの影響を受けるものもございますので、必要に応じてpHの調整をして下さい。（インサート側pH6.4、マルチウエル側pH7.4など）

Q16：経時的にアッセイするために、インサート内側・外側のバッファーの容量を規定量より多く入れたいのですが、可能ですか？

A16：24wellのみ確認しております。24wellの規定量はインサート内側100μL、外側600μLですが、最大インサート内側が300μL、インサート外側が1,300μL入ります。ただインサート内側は漏れないギリギリの容量のため、内側は200μL、外側1,200μLを推奨しております。

5. お問い合わせ先

製品の不備、ご質問等ございましたら、下記までご連絡下さい。

株式会社ケー・エー・シー 試薬事業部

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町 2 丁目 1-20

TEL : 06-6435-9747 FAX : 06-6435-9748

E-mail : shiyaku-info@kacnet.co.jp

【発売元】

株式会社 ケー・エー・シー

<URL> <http://www.kacnet.co.jp/>

2019 年 10 月作成