

Bmal1-Eluc MEF assay Protocol

【1】 試薬消耗品

- DMEM (high glucose, FUJIFILM Wako, cat# 044-29765, 500 mL)
- Penicillin/Streptomycin (GIBCO, cat# 15140-122)
- D-PBS (-) (FUJIFILM Wako, cat# 045-29795)
- TrypLE™ Select (1x) (Sigma, cat# 12563-011)
- FBS (Fetal Bovine serum)
- D-Luciferin potassium salt
- Dexamethasone (Sigma, cat# D4902)
- 10 cm dish (Corning, cat# 430167)
- 35 mm dish (Corning, cat# 430165)
- 24 well plate (PerkinElmer, cat# 6007470)
- 96 well plate (Nunc, cat# 165306)

【2】 測定機器

- 培養機能付きルミノメーター (AB-2550 クロノス Dio)
- プレート対応培養機能付きルミノメーター (WSL-15650 クロノス HT)

【3】 培地調製

- DMEM 445 mL に FBS 50 mL と Penicillin/Streptomycin 5 mL をそれぞれ加える。
 - 調製した培地を 50 mL tube に分注し、4°C で保存する。
- ※pH 変化により、Growth に影響がある可能性があるため小分けして保存しておく。

Reagent	Maker	Final concentration in medium	Required amount
DMEM, high glucose	FUJIFILM Wako Cat#044-29765	-	445 mL
FBS	SIGMA Cat#172012-500ML	10 %	50 mL
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Cat#15140-122	1 %	5 mL

【4】 細胞培養

4-1. Bmal1-Eluc MEF 起眠：1 vial から 10 cm dish 1 枚へ播種

※基本的に金曜日に起眠を実施し、14 時に播種を完了する。

- 50 mL tube に分注して保存してある培地を 37 °C のウォーターバスで温めておく。
培地 9 mL を 15 mL tube (遠心用) に入れて 37 °C のウォーターバスで温めておく。
- 凍結細胞 (5×10^5 cells/vial) を 37°C のウォーターバスで融解し、小さな氷塊が残った状態でウォーターバスから出し、温めておいた遠心用培地から 1 mL をバイアルに加え、遠心用の 15 mL tube に回収する。
※細胞に影響が出る可能性があるので、ピペッティングで溶解は行わない。
- 遠心用 15 mL tube を約 300×g、室温、3 分間遠心する。
- 上清をアスピレートし、10 回程度のタッピングにより細胞ペレットをほぐす。
- あらかじめ温めておいた培地 1 mL を加え、ピペッティングを 10 回程度ゆっくり行って懸濁し、セルカウントを行う (80%程度の生存率を確認)。
- 細胞懸濁液に培地 9 mL を加え、10 cm dish に播種し、37°C、5% CO₂ で培養する。

4-2. Bmal1-Eluc MEF 播種：10 cm dish 1 枚から測定用に播種する

※金曜日の 14 時に播種した細胞を火曜日の 14 時に測定用に播種する。

※播種前に細胞の写真を取り、状態を確認し保存しておく。また、前日の細胞観察で細胞の増殖が不十分な場合、フレッシュ培地を 5 mL 追加する。

- 50 mL tube に分注して保存してある培地を 37 °C のウォーターバスで温めておく。
- 10 cm dish の培地をアスピレートする。
- PBS で細胞を Wash し、TrypLE™ Select (1×) 1 mL 加え、細胞全体に行きわたらせた後、37°C、5% CO₂ でインキュベートする。
- インキュベート後、培地 2 mL を加えて遠心用の 15 mL tube に回収する。
- 10 cm dish にさらに培地 2 mL を加え、先ほど回収した遠心用の 15 mL tube に加える。
- 遠心用 15 mL tube を約 300×g、室温、3 分間遠心する。
- 上清をアスピレートし、10 回程度のタッピングにより細胞ペレットをほぐす。
- あらかじめ温めておいた培地 1 mL を加え、ピペッティングを 10 回程度ゆっくり行って懸濁し、セルカウントを行い測定用に播種する。
 - ① 35 mm dish の場合 (播種濃度： 1×10^5 cells/2 mL/dish)
 - ② 24 well plate の場合 (播種濃度： 5×10^4 cells/0.5 mL/well)
 - ③ 96 well plate の場合 (播種濃度： 1×10^4 cells/0.1 mL/well)

【5】 Dexamethasone (DEX) 処理

※火曜日 14 時に細胞播種し、その 24 時間後 (水曜日 14 時) に DEX 処理を行う。

5-1. 保存用 DEX 調製方法

- 事前にエタノールで 10 mM DEX を調製し、さらに 10 mM DEX を D-PBS (-) で 1 mM に調製し、-20°C で保存しておく。

5-2. 100 nM DEX/培地に培地交換

- 1 mM DEX を培地で 10 倍希釈して 100 μ M DEX を調製する。
- 100 μ M DEX を培地で 1000 倍希釈し、100 nM DEX/培地を調製する。
- 24 時間培養した細胞の培地を除去し、100 nM DEX/培地を添加する。
- Dex/培地添加後 37°C、5% CO₂ で 2 時間培養する。

【6】測定機器の準備

6-1. Kronos Dio の準備

- CO₂ ボンベを開ける。
- Dio のスイッチを入れる。
- Dio の中からスポンジを取り出し、蒸留水で全体を湿らせ、受け皿も少量の蒸留水を入れておく。
- 測定までの 2 時間程度、そのまま電源を入れておき、装置を安定させておく。

6-2. Kronos HT の準備

- CO₂ ボンベを開ける。
- CO₂ ガス混合ユニット、加湿ユニット、HT のスイッチを入れる。
- 蒸留水のリザーバーに蒸留水を半分程度入れておく。
- パソコンを立ち上げ、ソフトを起動しておく。接続を確認。
- 測定までの 2 時間程度、そのまま電源を入れておき、装置を安定させておく。

【7】D-luciferin (D-Luc) 培地への培地交換

7-1. 保存用 40 mM D-Luc 調製方法

- 15 mL tube にアルミホイルを巻いて遮光し、D-Luc を秤量する。
- クリーンベンチ内で D-PBS (-) を加え、40 mM D-Luc を調製する。
※40 mM D-Luc = 12.74 mg/mL
- D-Luc が溶解したことを確認し、1.5 mL tube (アルミで遮光) に分注し、-20°C で保存する。

7-2. 400 μ M D-Luc/培地に培地交換し、発光値の確認を実施

- 40 mM DEX を培地で 100 倍希釈して測定に必要な 400 μ M D-Luc/培地を調製する。
- DEX/培地で 2 時間処理した細胞の培地を除去し、培地 (D-Luc (-)) で Wash する。
- Wash した培地を除去し、400 μ M D-Luc/培地を添加し、発光値を測定する。

【8】測定開始時の被験物質添加

※DMSO で被験物質を溶解する場合、培地中の終濃度が 0.3% DMSO となるように調製する。DMSO で溶解していない被験物質と溶解した被験物質がある場合は、DMSO で溶解していない被験物質群も 0.3% DMSO になるように DMSO を添加することを推奨する。

8-1. 被験物質の調製および被験物質含有培地の調製

- 被験物質添加後の DMSO の最終濃度が 0.3% となるよう被験物質含有培地を調製する。
- 高濃度の被験物質による細胞への刺激を避けるため、測定用の培地には必要な D-Luc 及び被験物質を含有する培地を調製し、dish に添加する。

【9】 測定開始。

※水曜日 16 時に測定を開始する。

9-1. 35 mm dish (Kronos Dio) の場合

- 被験物質含有培地を添加した dish を Kronos Dio にセットする。
- 下記測定条件で測定を開始する。
 - ・計測時間：1 分
 - ・計測間隔：20 分
 - ・フィルター：F0 (フィルターなし)

9-2. 24 well plate (Kronos HT) の場合

- 被験物質含有培地を添加した plate を Kronos HT にセットする。
- 下記測定条件で測定を開始する。
 - ・計測時間：10 秒
 - ・計測間隔：20 分
 - ・フィルター：F0 (フィルターなし)

9-3. 96 well plate (Kronos HT) の場合

- 被験物質含有培地を添加した plate を Kronos HT にセットする。
- 下記測定条件で測定を開始する。
 - ・計測時間：5 秒
 - ・計測間隔：20 分
 - ・フィルター：F0 (フィルターなし)

【10】 被験物質の途中添加

※被験物質を溶解した培地を前もって調製し、インキュベーター内に置いておく。

※添加時間は、随時 Raw データを確認しながら、添加を開始する。

※intact は培地入れ替え処理なしの条件として測定する。

10-1. 途中添加後、測定終了まで被験物質含有培地で測定する場合

(Kronos Dio の場合)

- 添加時間の 1 回前の BG (バックグラウンド) 測定が終わったら、Dio からターンテーブルを取り出す (次の測定まで約 10 分間)。
- intact の dish 以外の培地をアスピレートする。
- 0.3% 被験物質/400 μ M D-Luc/培地、または 0.3% 溶媒/400 μ M D-Luc/培地をそれぞれの dish に 2 mL 添加する。

- ターンテーブルを Kronos Dio に戻し、測定を再開する。

(Kronos HT の場合)

- 添加時間の1回前の測定が終わったら、HT からプレートを取り出す(次の測定まで、96 well plate 約8分間、24 well plate 約13分間)。
- intact の well 以外の培地を除去する。
- 0.3% 被験物質/400 μ M D-Luc/培地、または0.3% 溶媒/400 μ M D-Luc/培地をそれぞれの well に添加する (24 well plate : 500 μ L, 96 well plate : 100 μ L)。
- plate を Kronos HT に戻して測定を再開する。

10-2. 途中添加後、一時的 (30分間等) に被験物質含有培地で処理し、その後被験物質を含まない培地で測定する方法

- 添加時間の1回前のBG (バックグラウンド) 測定が終わったら、Dio からターンテーブルを取り出す (次の測定まで約10分間)。
- intact の dish 以外の培地をアスピレートする。
- 0.3% 被験物質/400 μ M D-Luc/培地、または0.3% 溶媒/400 μ M D-Luc/培地をそれぞれの dish に2 mL 添加する。
- ターンテーブルごと、37°C、5% CO₂ で30分間インキュベートする。
- ターンテーブルをインキュベーターから取り出し、intact 以外の dish の培地をアスピレートする。
- アスピレートした dish を0.3% 溶媒/400 μ M D-Luc/培地で2 mL で Wash する。
- Wash した培地をアスピレートし、0.3% 溶媒/400 μ M D-Luc/培地を2 mL 添加する。
- ターンテーブルを Kronos Dio に戻し、測定を再開する。
※HT の場合も同様の作業を実施する。
※被験物質濃度は、経時的添加の2-3倍程度で反応性が確認される傾向がある。

【11】測定終了

- 5日間測定後、データをエクスポートし解析する。
- dish または plate を取り出し、測定後の細胞の状態を確認するため写真を撮って保存する。
- 機器の電源を切り、機器の中のリザーバーの蒸留水を捨て、機器の中の水分をふき取る。
- 機器のフタは少し開けて置き、中を乾かすように置いておく。
- CO₂ ボンベを閉める。