

## 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、体内時計を形成する時計遺伝子のひとつ**bmal1**遺伝子の発現リズムを測定できるマウス胚性線維芽細胞です。その由来は**bmal1**遺伝子のプロモーター下流に発光タンパク質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)で、本製品は当該マウスの胎児から調製されております。

## 【製品情報】

細胞名：サーカディアンリズム評価細胞 (Bmal1-Eluc MEF)

由来：マウス

細胞数： $5.0 \times 10^5$  cells/vial

保存方法：液体窒素タンク

超低温フリーザー (-140℃)

ディープフリーザー (-80℃)

## 2. 本製品の特長・使用方法

## 【本製品の特長】

本製品は、時計遺伝子のひとつ**bmal1**遺伝子の発現リズムを細胞の発光強度を計測することにより測定することが可能です。体内時計調整機能が期待される化合物等を培地に添加し、それによる発光強度の変化から化合物が有する体内時計調整能を評価します。

細胞の発光強度の計測には、生物発光を測定するルミノメーターを使用します。長期的な発光強度の測定には、培養機能付き自動発光測定機能を有した機器の使用を推奨いたします。

## 【本製品の使用方法】

## ▽細胞

- サーカディアンリズム評価細胞

## ▽試薬

- DMEM, high glucose (FUJIFILM Wako, CAT#044-29765)
- FBS (Sigma, CAT#172012)
- Penicillin/Streptomycin (GIBCO, CAT#15140-122)
- D-PBS (-) (FUJIFILM Wako, CAT#045-29795)
- TrypLE™ Select (1x) (Sigma, CAT#12563-011)
- Dexamethasone (Sigma, CAT#D4902)
- D-luciferin (カリウム塩) (TOYOBO, CAT#MRL-101)

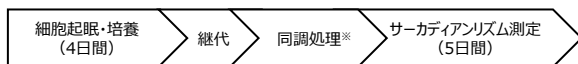
## ▽培地

基本培地組成	
DMEM, high glucose	445 mL
FBS	50 mL
Penicillin/Streptomycin	5 mL
Total	500 mL

## ▽試薬調製方法

- Dexamethasone (Dex)  
エタノールで10 mM Dexを調製し、-20℃で保存。D-PBS (-) で1 mMに希釈し、終濃度100 nMになるよう基本培地に添加。
- D-luciferin  
D-PBS (-) で40 mM D-ルシフェリンを調製し、-20℃で保存。適当な濃度になるよう基本培地に添加。

## ▽測定スケジュール例



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

## ▽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、上述の基本培地で回収する。
- 300×g前後で3分間遠心し、上清を吸引除去する。基本培地10 mLに細胞を懸濁し、10 cm dish 1枚に全量を播種。37℃、5% CO<sub>2</sub>下で4日間程度培養する。

## ▽継代 (35 mm dish対応培養機能付きルミノメーター使用時)

- ※24, 96 wellの方法は裏面に記載
- 基本培地を恒温槽で37℃に温める。
- 培地除去後、細胞をD-PBS (-) で洗浄し、TrypLE™ Select (1x) を添加。37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で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 (図1 継代前の細胞の様子参照)。
- 細胞数を調整した後、細胞を播種 ( $1 \times 10^5$  cells/35 mm dish) し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で24時間培養する。

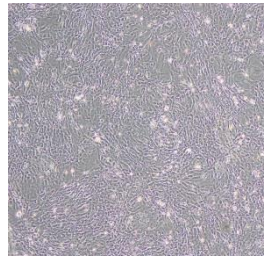


図1 継代前の細胞の様子



培養機能付きルミノメーター (AB-2550 クロノスDio)

## ▽同調処理

- 24時間後、100 nM Dex培地に置換し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で2時間培養する。

## ▽測定

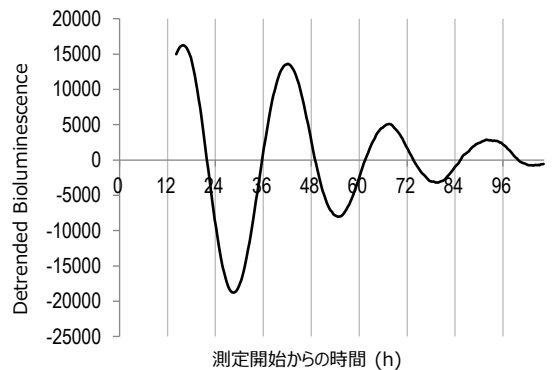
- 2時間後、培地をD-ルシフェリン培地に置換し、速やかに測定機器内に細胞を移動し、測定を開始する。

## ▽測定条件例

- 測定時間：1分
- 測定間隔：20分
- フィルター：全光 (F0)

## ▽データ処理

ディトレンド処理および平滑化処理により、下記のような**bmal1**遺伝子の発光リズム (サーカディアンリズム) の図が得られます。



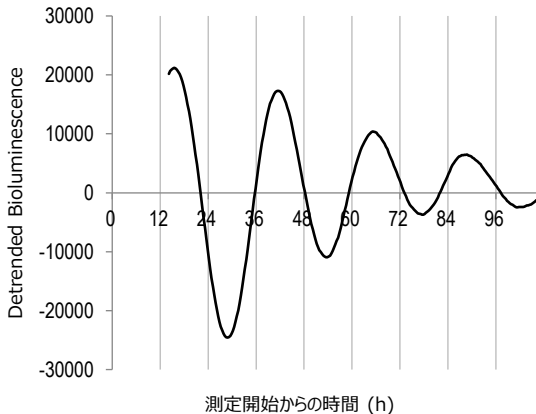
- ▽継代（24/96 well plate対応培養機能付きルミノメーター使用時）  
 ※35 mm dishの方法は表面に記載  
 ・基本培地を恒温槽で37℃に温める。  
 ・培地除去後、細胞をD-PBS (-) で洗浄し、TrypLE™ Select (1x) を添加。37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で3分間静置する。  
 ・37℃に温めた基本培地で細胞を回収し、300×g前後で3分間遠心して細胞を集める。上清を吸引除去後、基本培地で懸濁し、細胞数を計測する（図1 継代前の細胞の様子参照）。  
 ・細胞数を調整した後、細胞を播種（■5×10<sup>4</sup> cells/well、▲1×10<sup>4</sup> cells/well）し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で24時間培養する。  
 ※■24 well plate, ▲96 well plate



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)

- ▽同調処理  
 24時間後、100 nM Dex培地に置換し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で2時間培養する。
- ▽測定  
 2時間後、培地をD-ルシフェリン培地に置換し、速やかに測定機器内に細胞を移動し、測定を開始する。
- ▽測定条件例  
 測定時間：■10秒 ▲5秒  
 測定間隔：20分  
 フィルター：全光 (F0)

- ▽データ処理  
 デイトレンド処理および平滑化処理により、下記のような**bmal1** 遺伝子の発光リズム (サーカディアンリズム) の図が得られます。



### お問い合わせ先

本製品についての技術的な質問がございましたら、下記連絡先までご連絡下さい。  
 例) 細胞が増えない、リズムをきれいに刻めないなど

**TEL 0859-21-7232**

(開設時間9:00~12:00 13:00~17:00 土日祝日・休日を除く)

**MAIL info@gpc-lab.co.jp**

3営業日たっても弊社からの回答がない場合、システム上のトラブルの可能性がございます。その際はご面倒ですが、再度お送りいただくか電話でご質問いただけますようお願い申し上げます。

**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場合、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