

感受性試験プロトコル例

使用プレート；

Cell-able® 100-600P (サークル径：100µm, ピッチ(中心間距離)600µm, 約 90 サークル/well), 96well plate (本品は受注生産品です)

1. 播種数と暴露開始時点の決定

- ① 定法により培養したシャーレから培養上清を除去し、DPBS で 2 回洗浄する
- ② Accutase を添加し、7～10 分インキュベーションする。
- ③ Accutase と等量の培地を添加しピペッティングにより細胞を分散させ、遠心チューブに回収する。
- ④ 160g× 3 分間遠心し、上清を除去する。
- ⑤ 1 ml の培地を添加しピペッティングにより細胞を分散させ、血球計算盤などにより細胞数を計測する。
- ⑥ 培地にて 12,000cells/ml 又は 36,000cells/ml の細胞分散液を調製し、100µl/well で播種する [1,200cells/well(=約 12cells/サークル) 又は 3,600cells/well(=約 36cells/サークル)]。
- ⑦ CO₂ インキュベーターにて培養を開始し、2～3 日に一度培地交換を行う。
- ⑧ 培養開始後 2, 4, 7, 10 日目の細胞数変化を CellTiter-Glo®(Promega, G7570)により計測する。
 - ・各時点において、各ウェルに 100µl の CellTiter-Glo®基質を添加し、ピペッティングにて細胞を溶解する。
 - ・全ての反応液を新しいサンプリング用黒壁プレートに移し、プレートシールにてプレートを密閉し凍結保存する。
 - ・全てのサンプルを凍結した後、室温・暗所にて 2 時間程度静置し、室温で融解し、2 分間攪拌・スピンドウン後、シールを剥がしてプレートリーダーにて測定する (反応液温度が室温に戻っていること)。
 - ・CellTiter-Glo®の測定値が測定機器の受光光量上限値を超えた場合、基質と培地を等量混合した溶液で希釈して測定する (使用機器により上限値は異なる)。

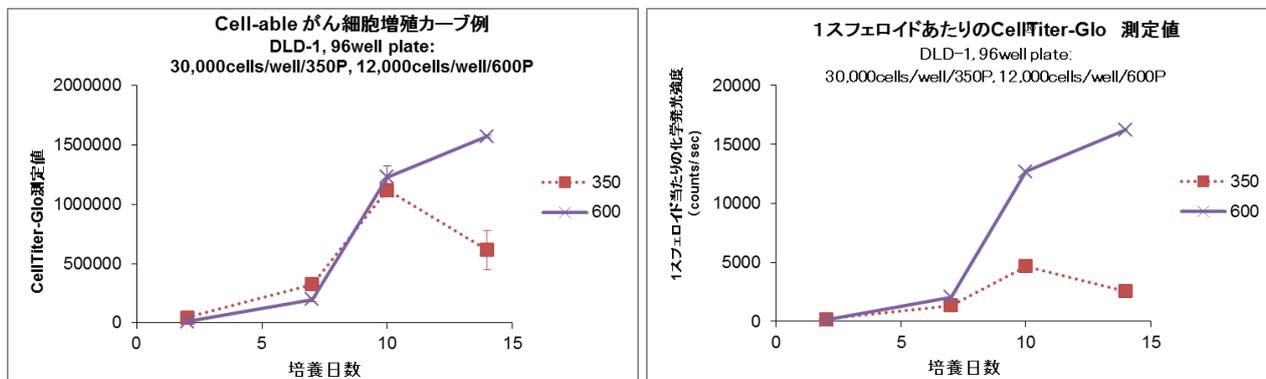
2. 感受性試験

- ① 1. の結果より、細胞が対数増殖をしている時間、例えば 72 時間(day7～day10)を選択し、播種細胞数、薬物暴露開始時点を決める。
- ② ①で決定した条件で細胞を播種し、暴露開始時点まで培養し、薬物暴露を開始する。
暴露濃度は薬物の C_{max} を参考にその 100 倍程度を最高濃度に設定し、5～8 水準の濃度を設定する。薬物は各用量の 1000 倍濃度に DMSO にて溶解し、最終濃度になるように培地で希釈したものを暴露培地とする。vehicle 培地は 0.1% DMSO を添加した培地とする。
- ③ 培養上清を取り除き、vehicle 培地及び暴露培地を添加して暴露を開始する。
- ④ 暴露開始時点 (day0) サンプル用 well に CellTiter-Glo®基質を添加し、1. で示した方法と同じ要領で凍結保管する。
- ⑤ 72 時間培養後、各ウェルに CellTiter-Glo®基質を添加してプレートシールでプレートを密閉し、2

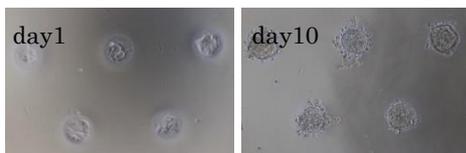
分間シェーカーにて攪拌したのち凍結保管する。

- ⑥ ④,⑤のプレートを開所に室温に戻し、シェーカーで 2 分間攪拌・スピンドアウン後、シールを剥がしてプレートリーダーにて測定する

参考) ピッチサイズ比較データ (サークルあたり約 12 細胞播種した場合)



350P



600P



ピッチ 350µm 及び 600µm, サークル径 100µm の Cell-able®を用いて, DLD-1 の増殖を比較した。細胞播種濃度はパターンサークルに約 12 個/サークルの細胞が入る濃度とした。上段左グラフは増殖曲線。上段右は 1 スフェロイドあたりの CellTiter-Glo®測定値 (左のグラフの測定値をサークル数で除した値)。下段左写真 2 枚はピッチ 350µm の Cell-able®で培養した際の播種翌日と 10 日後の写真。下段右写真 2 枚はピッチ 600µm の Cell-able®で培養した際の播種翌日と 10 日後の写真

注) 資料中のデータは一例であり、実験結果を保証するものではありません。

お問い合わせ先

 住友ベークライト株式会社

S-バイオ事業部 

E-mail : s-bio@sumibe.co.jp

TEL : 03-5462-4831, FAX: 03-5462-4835

製造元：東洋合成工業株式会社  TOYO GOSEI

〒111-0053 東京都台東区浅草橋1-22-16
ヒューリック浅草橋ビル8階
Tel 03 (5822) 6186, Fax 03 (5822) 6187
Email cell-able@toyogosei.co.jp
URL: www.toyogosei.co.jp

販売元：  住友ベークライト株式会社
S-バイオ事業部 マーケティング・営業部
〒140-0002 東京都品川区東品川2-5-8 天王洲パークサイドビル
Tel: 03 (5462) 4831, Fax: 03 (5462) 4835
E-mail : s-bio@sumibe.co.jp
URL : www.sumibe.co.jp/product/s-bio/