

Technical Data

ibidi Pump system および μ -Slide I を用いた HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の灌流 (perfusion) アッセイ

評価製品

ibidi Pump system (ib10902)
 ibidi μ -Slide I 0.6 Luer ibiTreat (ib80186)

目的

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) について、灌流 (perfusion) 条件と静置培養条件での違いを比較するため、ibidi Pump system と μ -Slide I を用いた灌流 (perfusion) アッセイを実施し、蛍光顕微鏡を用いて静置培養条件と比較した。
 また、HeLa (ヒト子宮頸癌細胞) でも同じアッセイを行い、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) との違いを比較した。

はじめに

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) などの内皮細胞は、灌流 (perfusion) 培養によりシエアストレス (すり応力/剪断応力) を与えると、一般的な静置培養と比較して、より生体内に近い細胞形態や細胞応答を示します。

そこでibidi社では、より *in vivo* に近い環境で長期間の灌流実験を可能とする独自のibidiポンプシステムを開発しました。

本システムは、ibidi社チャンネルスライド内の細胞にかかるシエアストレス (dyn/cm²) が付属の専用ソフトウェアで自動計算されるため、通常のポンプと異なり、流速値 (mL/分) ではなくシエアストレス値 (dyn/cm²) で条件設定することが可能です。

また、使用するibidi社チャンネルスライドは、そのまま免疫蛍光染色による高解像度細胞観察に使用することも可能です。

本アプリケーションノートのデータにつきましては、株式会社ニコンインステック バイオサイエンス営業本部 営業推進部営業企画課 企画戦略グループ 滝口 智司様のご厚意により掲載させていただきました。
 ここに深く感謝申し上げます。

当社使用機器



マイクロスライド I
 ibidi μ -Slide I 0.6 Luer
 ibiTreat (ib80186)
 (P6に詳細説明有)



ibidi Pump system (ib10902)
 (P6に詳細説明有)



Nikon 倒立顕微鏡 (Ts2R-FL)
 (P7に詳細説明有)

使用機器

条件1 HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に関する実験

- 細胞名 : HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)
- 灌流培養システム : ibidiポンプシステム (ibidi社)

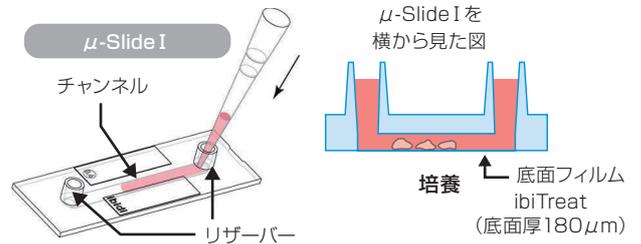
実験No.	細胞濃度 (個/mL)	播種密度 (個/cm ²)	flow前の静置培養時間 (hr)	シエアストレス条件
1	1.6×10 ⁶	9.6×10 ⁴	2.5	2dyn/cm ² 30min → 5dyn/cm ² 30min → 10dyn/cm ² 35hr → 20dyn/cm ² 14hr
2	1.0×10 ⁶	6.0×10 ⁴	2	2dyn/cm ² 30min → 5dyn/cm ² 30min → 10dyn/cm ² 16hr
3	5.0×10 ⁵	3.0×10 ⁴	1	2dyn/cm ² 30min → 5dyn/cm ² 30min → 10dyn/cm ² 33hr

- 培養容器 : μ -Slide I 0.6 Luer ibi Treat (ib80186)
- 培地 : HuMedia-EG2 (KURABO)
- 蛍光染色試薬 : (細胞膜) Wheat Germ Agglutinin (WGA) -CF594 conjugate (29023-1 BIOTIUM)
 (F-actin) Alexa Fluor® 488 phalloidin (A12379 Life technologies)
 (核) Hoechst 33342 solution (FL149 DOJINDO)
- 顕微鏡 : 倒立顕微鏡 Ts2R-FL (Nikon)

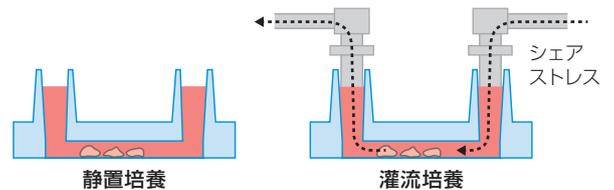
実験手順

培養

- ① 2枚のibidi μ -Slide Iを滅菌条件下で取り出し、実験No.1-3それぞれの細胞濃度のHUVEC 200 μ Lを右に示したチャンネルに直接ピペットで移します。
- ② 付属のフタでリザーバーにフタをします。
- ③ スライドをインキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) に入れ、細胞を接着させます (実験No.1-3それぞれの準じます)。その後、両方のリザーバーに新しい培地60 μ Lを注入します。

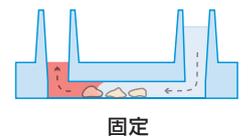


- ④ スライド1枚はそのまま静置培養を継続し、もう一方はibidiポンプシステムに滅菌条件下で接続し、インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) 内で、灌流培養します。シヤーストレス条件を実験No.1-3それぞれの条件で実施します。



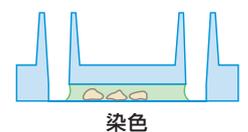
細胞の固定

- ⑤ 1000 μ Lピペットを用いて、リザーバーから培地を吸引します。1つのリザーバーにPBS 1000 μ Lをゆっくり注入しながら、反対側のリザーバーから吸引して、細胞を洗浄します。
注意：チャンネルは常に液体で満たして気泡が生じないようにし、細胞の損失を予防します。
- ⑥ 細胞を3.7% ホルマリン / PBS 200 μ Lで10分間固定します。
- ⑦ 1000 μ LのPBSを注入しながら、もう1つのリザーバーから液体を吸引して、チャンネル内の液体を除去します。
*チャンネルから液体をすべて除去します。



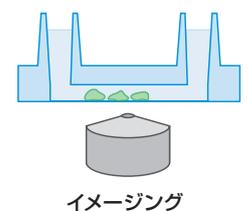
染色およびマウンティング

- ⑧ 必要な染色溶液を前もって調製します。
Wheat Germ Agglutinin (WGA) -CF594 conjugate (1.3 μ L 400倍希釈) およびAlexa Fluor[®] 488 phalloidin (0.5 μ L 1000倍希釈) およびHoechst 33342 soluiton (0.5 μ L 1000倍希釈) をPBS 500 μ L に混合します。
- ⑨ 上記で作成した染色混合溶液200 μ Lをチャンネルに注入し室温で20分間インキュベートします。
- ⑩ PBS 1000 μ Lを注入しながら、もう1つのリザーバーから液体を吸引して、チャンネル内の液体を除去します。
*チャンネルから液体をすべて除去します。
- ⑪ FluorSave[™] Reagent (Cat. 345789-20ML Calbiochem[®]) を200 μ L注入し、マウンティングおよび退色防止を行います。



撮像

- ⑫ 下記フィルターセット付きの蛍光顕微鏡で細胞を観察します。
 緑：ニコン蛍光フィルターブロックLED470nm 細胞膜 (WGA)
 赤：ニコン蛍光フィルターブロックTRITC F-actin (Phalloidin)
 青：ニコン蛍光フィルターブロックDAPI DNA核 (Hoechst 33342)



結果

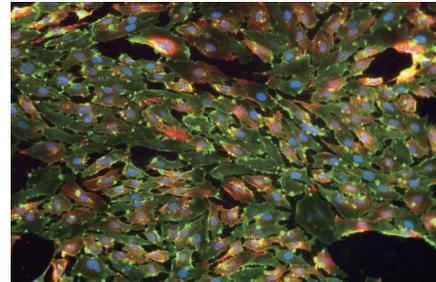
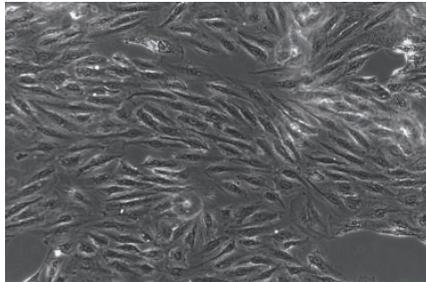
HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)

位相差

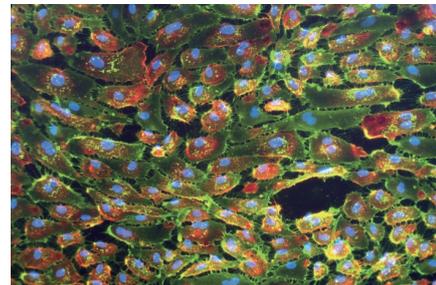
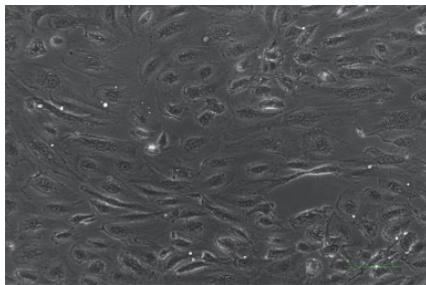
蛍光

 Fluidic condition
(灌流培養)

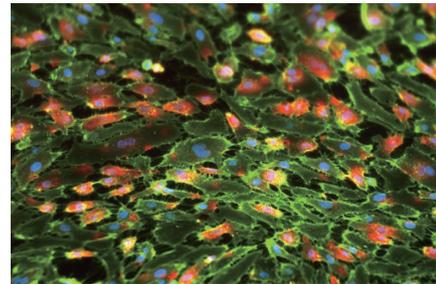
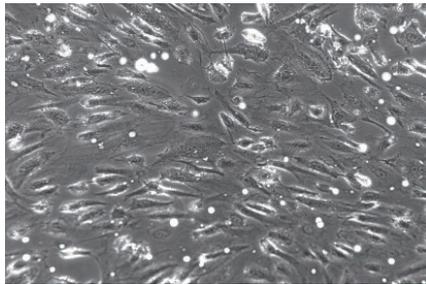
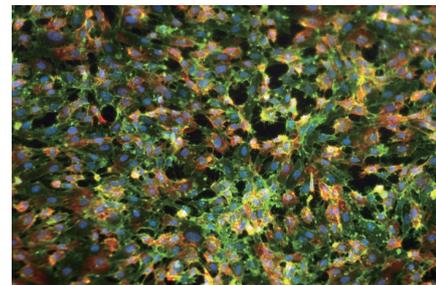
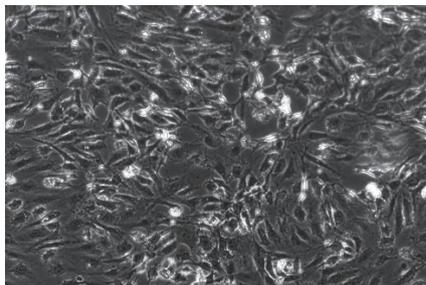
実験 No.1



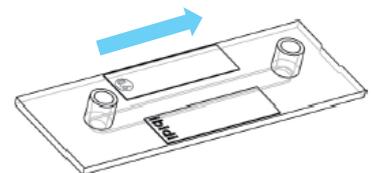
実験 No.2



実験 No.3


 Static condition
(静置培養)


- Flow培養は全ての条件 (3つ) で細胞の形状が静置培養に比べて変化した
- 20dyn/cm²の条件では剥がれる細胞が多く観察された (実験No. 1)
- 変更した染色法は短時間 (1時間) で反応が済み、簡単



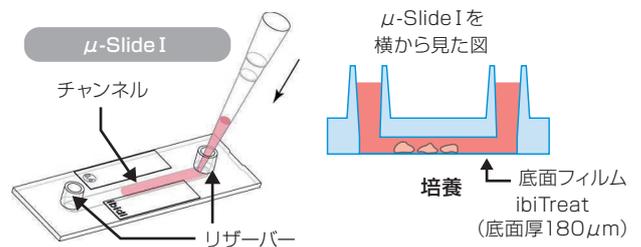
条件2 HeLa (ヒト子宮頸癌細胞) に関する実験

- 細胞名 : HeLa (ヒト子宮頸癌細胞)
- 灌流培養システム : ibidiポンプシステム (ibidi社)
 シェアストレス条件 : 2 dyn/cm² 30min → 5 dyn/cm² 30min → 10 dyn/cm² 11hr.
- 培養容器 : μ -Slide I 0.6 Luer ibiTreat (ib80186 ibidi社)
- 培地 : HuMedia-EG2 (KURABO)
- 蛍光染色試薬 : (細胞膜) Wheat Germ Agglutinin (WGA) -CF594 conjugate (29023-1 BIOTIUM)
 (F-actin) Alexa Fluor[®] 488 phalloidin (A12379 Life technologies)
 (核) Hoechst 33342 soluiton (FL149 DOJINDO)
- 顕微鏡 : 倒立顕微鏡 Ts2R-FL (Nikon)

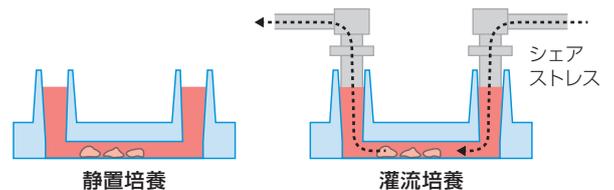
実験手順

培養

- ① 2枚のibidi μ -Slide Iを滅菌条件下で取り出し、細胞 1×10^6 個/mLのHeLa 200 μ L (播種密度 6.0×10^4 個/cm²)を右に示したチャンネルに直接ピペットで移します。
- ② 付属のフタでリザーバーにフタをします。
- ③ スライドをインキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) に入れ、細胞を接着させます (10時間)。その後、両方のリザーバーに新しい培地60 μ Lを注入します。

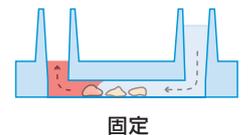


- ④ スライド1枚はそのまま静置培養を継続し、もう一方はibidiポンプシステムに滅菌条件下で接続し、インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) 内で、灌流培養します。シェアストレス条件を以下のようにします。
 (2dyn/cm² 30min ⇒ 5dyn/cm² 30min ⇒ 10dyn/cm² 11hr)



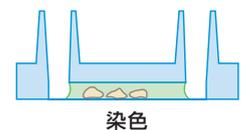
細胞の固定

- ⑤ 1000 μ Lピペットを用いて、リザーバーから培地を吸引します。1つのリザーバーにPBS 1000 μ Lをゆっくり注入しながら、反対側のリザーバーから吸引して、細胞を洗浄します。
 注意：チャンネルは常に液体で満たして気泡が生じないようにし、細胞の損失を予防します。
- ⑥ 細胞を3.7%ホルマリン/PBS 200 μ Lで10分間固定します。
- ⑦ 1000 μ LのPBSを注入しながら、もう1つのリザーバーから液体を吸引して、チャンネル内の液体を除去します。
 *チャンネルから液体をすべて除去します。



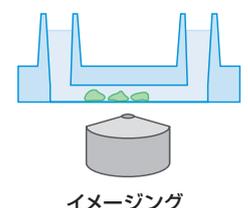
染色およびマウンティング

- ⑧ 必要な染色溶液を前もって調製します。
 Wheat Germ Agglutinin (WGA) -CF594 conjugate (1.3 μ L 400倍希釈) およびAlexa Fluor[®] 488 phalloidin (0.5 μ L 1000倍希釈) およびHoechst 33342 soluiton (0.5 μ L 1000倍希釈) をPBS 500 μ L に混合します。
- ⑨ 上記で作成した染色混合溶液200 μ Lをチャンネルに注入し室温で20分間インキュベートします。
- ⑩ PBS 1000 μ Lを注入しながら、もう1つのリザーバーから液体を吸引して、チャンネル内の液体を除去します。
 *チャンネルから液体をすべて除去します。
- ⑪ FluorSave[™] Reagent (Cat. 345789-20ML Calbiochem[®]) を200 μ L注入し、マウンティングおよび退色防止を行います。



撮像

- ⑫ 下記フィルターセット付きの蛍光顕微鏡で細胞を観察します。
 緑：ニコン蛍光フィルターブロックLED470nm 細胞膜 (WGA)
 赤：ニコン蛍光フィルターブロックTRITC F-actin (Phalloidin)
 青：ニコン蛍光フィルターブロックDAPI DNA核 (Hoechst 33342)

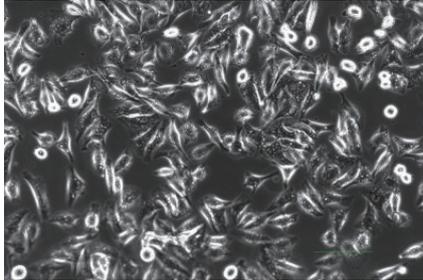
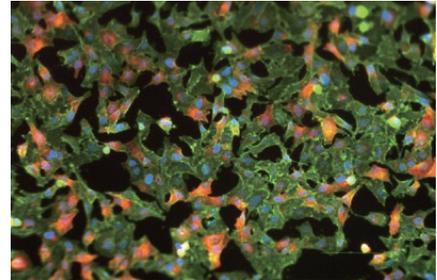
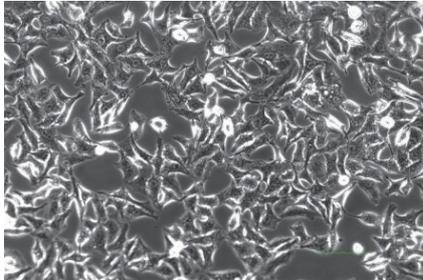


結果

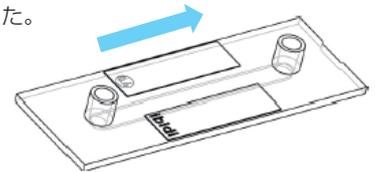
HeLa (ヒト子宮頸癌細胞)

位相差

蛍光

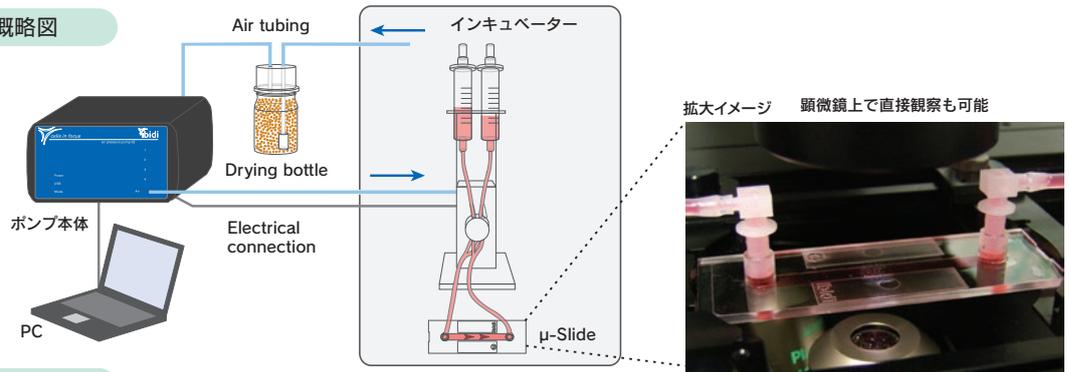
Fluidic condition
(灌流培養)Static condition
(静置培養)

- Flow培養で細胞の形状は変化しなかった。予想では剥がれる細胞が多いと思ったがそうでもなかった。
- 播種後、接着までの時間は1昼夜かかった。(HUVECは1~2.5時間程度)

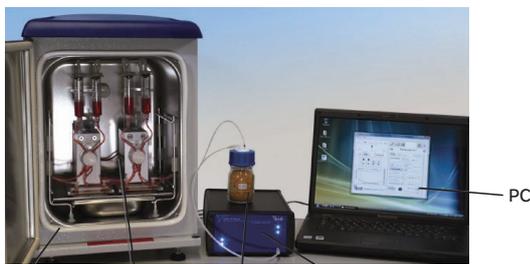


ibidi Pump System

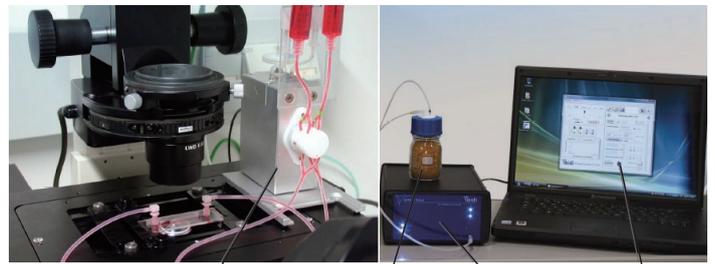
ibidi ポンプシステムの概略図



ibidi ポンプシステムの使用例



インキュベーター ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体
例1：インキュベーター内で灌流培養した後で顕微鏡観察



ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体 PC
例2：灌流培養しながら顕微鏡観察

【特長】

- 灌流（フロースルー）条件下の細胞観察に最適です。
- HUVECなどの内皮細胞(endothelial cell)を、より生体内に近い条件で培養できます。
- 左右シリンジのチャンネル切り換えで、途切れることなく長期間一定方向の還流が可能です。
- ibidi社の様々なタイプのフロー培養用スライドから選択できます。
- 専用ソフトにより、簡単にフロー条件のプログラムが可能です。
- シェアストレスの強さや、定流速／脈動など自由自在です。
- ヒーティングシステム（別売）との組み合わせで、リアルタイム観察も可能です。

【文献情報】

- ibidi社 採用文献検索ページ
(下記アドレスより、ibidi社製品の採用文献の検索が可能です)
<http://ibidi.com/support/references/>

【仕様】

流速範囲	0.03 - 35 ml/min
シェアストレス	0.3 - 150 dyn/cm ²
培地量	2.5 - 50ml (シリンジ消耗品セットに依存します。)

■ ポンプ本体

ポンプ圧	5 - 95mbar (推奨使用範囲)
使用環境	15 - 40℃ (湿度80%で31℃まで、湿度30%で40℃まで)
サイズ	170×230×90mm (W×D×H) 2.4kg

■ Fluidic Unit : シリンジ固定用ユニット

使用環境	15~45℃ (湿度100%まで対応)
サイズ	85×135×270mm (W×D×H) 1.1kg

マイクロスライドI (μ-Slide I)

【特長】

- 灌流 (μ-Slide I Luer flow kit使用) 実験用に新開発
- チューブ接続はルアーアダプターを採用
- 詰合わせパック (ibiTreat又は未コーティング) も提供

【仕様】

- 共通仕様
チャンネル長さ：50mm
チャンネル幅：5mm

【コーティング】

- ・ ibiTreat (接着細胞用表面処理)
- ・ コラーゲンVI
- ・ フィブロネクチン (特注品)
- ・ ポリ-L-リジン
- ・ 未コーティング (疎水性)

【アプリケーション】

- ・ 灌流条件下での接着細胞
- ・ 細胞培養 (静止/流速停止)
- ・ 浮遊細胞
- ・ チャンネル内のゲル中での三次元細胞培養
- ・ 溶液の急速交換



	μ-Slide ^{0.2} Luer	μ-Slide ^{0.4} Luer	μ-Slide ^{0.6} Luer	μ-Slide ^{0.8} Luer
チャンネル内の容量(μl)	50	100	150	200
チャンネル内の高さ(μm)	200	400	600	800
コーティング面積 (cm ²)	5.2	5.4	5.6	5.8
グロース面積 (cm ²)	2.5	2.5	2.5	2.5
シェアストレス最小値/最大値(dyn/cm ²)	2.2/19.9	0.79/6.7	0.38/3.1	0.22/1.8

研究用倒立顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ts2R

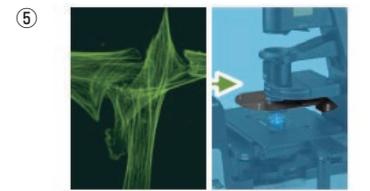
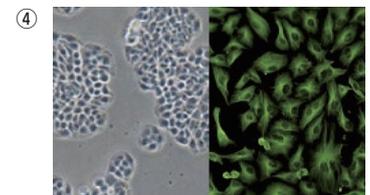
コンパクトな筐体で、多様な観察方法に対応した倒立顕微鏡のスタンダード機

研究室の多岐にわたる用途に合わせ、幅広い観察方法に対応。研究室内の限られたスペースに配置できるコンパクトさと優れた操作性の両立を実現した、研究用倒立顕微鏡の新スタンダード機です。



【特長】

- **軽快なオペレーション ①**
本体前面にボタンを配置することで光源のオン/オフを手元で行うことが可能です。
- **ステージ周辺の操作性を向上 ②**
ステージ高さを約30%下げ、ステージ操作性と視認性を大幅に向上しました。
- **操作性に優れた高機能ステージ (オプション) ③**
新開発のステージで快適なワークフローを提供します。
- **多彩な観察に対応 ④**
LED光源を採用し、明視野、位相差、DIC、NAMC、蛍光に対応します。
新開発の「エンボスコントラスト観察」は、厚みのあるサンプルに威力を発揮します。
- **明るい部屋でも操作しやすい蛍光観察 ⑤**
新開発のコントラストシールドが明るい部屋での蛍光観察を可能にします。
- **コンパクトかつ安定性の高い操作系 ⑥**
すっきりしたフォルムが効率的で快適な研究をサポートします。
- **クリーンベンチで快適に操作 ⑦**
顕微鏡の高さを下げ、スペースに余裕をもって収納可能です。
- **高精度・高品質**
上位機種クラスの観察用アクセサリがあります。



【仕様】

モデル	Ts2R	Ts2R-FL
観察方法	明視野、位相差、APC (Apodized Phase Contrast)、NAMC、微分干渉、エンボスコントラスト	明視野、位相差、APC (Apodized Phase Contrast)、NAMC、微分干渉、エンボスコントラスト、蛍光
光学系	CFI60無限遠光学系	
照明	透過照明：LED	透過/落射照明：LED
鏡筒	双眼鏡筒 傾角鏡筒	
接眼レンズ	10x (視野数22)	
レボルバー	固定6孔、DICスロット付	
コンデンサー	コンデンサーターレット コンデンサーレンズを併用	
エンボスコントラスト	エンボスコントラストスライダー (鏡筒側に装着) エンボスコントラストモジュール (コンデンサーターレットに装着)	