

Technical Data

ibidi Pump system および μ -Slide y-shaped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 y-shaped ibiTreat (ib80126)

目的

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) について、シヤアストレス値の違いにより細胞形態に違いがあるかどうか確認するため、Y字に分岐したチャンネルを持つ μ -Slide y-shapedとibidi Pump system を用いた灌流 (perfusion) アッセイを実施し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

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) 培養によりシヤアストレス (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。

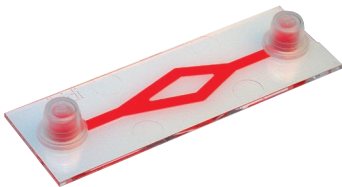
本システムは、ibidi社チャンネルスライド内の細胞にかかるシヤアストレス (dyn/cm^2) が付属の専用ソフトウェアで自動計算されるため、通常のポンプと異なり、流速値 (mL/分) ではなくシヤアストレス値 (dyn/cm^2) で条件設定することが可能です。

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 Yシェイブ
ibidi μ -Slide y-shaped ibiTreat (ib80126)
(P4に詳細説明有)



ibidi Pump system(ib10902)
(P4に詳細説明有)



Nikon 倒立顕微鏡(Ts2R-FL)
(P5に詳細説明有)

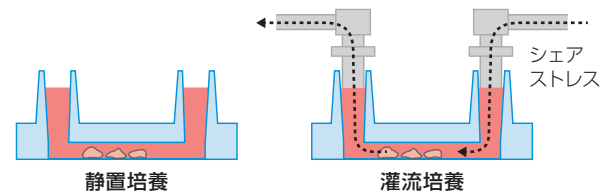
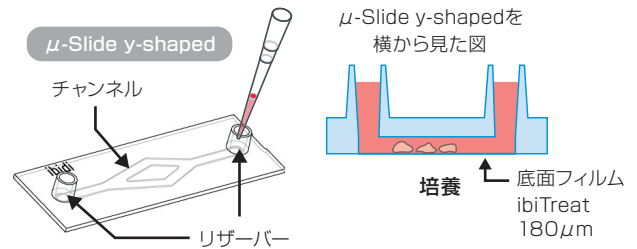
実験条件

- 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)
シヤアストレス条件 : 2 dyn/cm^2 30min \rightarrow 5 dyn/cm^2 30min \rightarrow 10 dyn/cm^2 39 hr.
- 培養容器 : μ -Slide y-shaped ibiTreat (ib80126 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

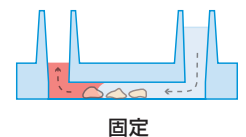
培養

- ① 2枚のibidi μ -Slide y-shapedを滅菌条件下で取り出し、細胞濃度 1×10^6 個/mLのHUVEC $200 \mu\text{L}$ (播種密度 3.9×10^4 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°C、5% CO₂) に入れ、細胞を接着させます (約2時間)。その後、両方のリザーバーに新しい培地 $60 \mu\text{L}$ 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°C、5% CO₂) 内で、灌流培養します。シヤーストレス条件を以下のようにします。
(2dyn/cm² 30min \Rightarrow 5dyn/cm² 30min \Rightarrow 10dyn/cm² 39hr)



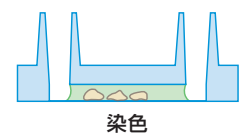
細胞の固定

- ⑤ $1000 \mu\text{L}$ 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 $1000 \mu\text{L}$ 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 $200 \mu\text{L}$ で10分間固定します。
- ⑦ $1000 \mu\text{L}$ 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。



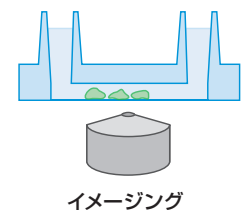
染色およびマウンティング

- ⑧ 必要な染色溶液を事前に調製します。
Wheat Germ Agglutinin (WGA) -CF594 conjugate ($1.3 \mu\text{L}$ 400倍希釈)、Alexa Fluor® 488 phalloidin ($0.5 \mu\text{L}$ 1000倍希釈) およびHoechst 33342 solution ($0.5 \mu\text{L}$ 1000倍希釈) をPBS $500 \mu\text{L}$ に混合します。
- ⑨ 上記で作成した染色混合溶液 $200 \mu\text{L}$ 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 $1000 \mu\text{L}$ 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 $200 \mu\text{L}$ 注入し、マウンティングおよび退色防止を行います。



撮像

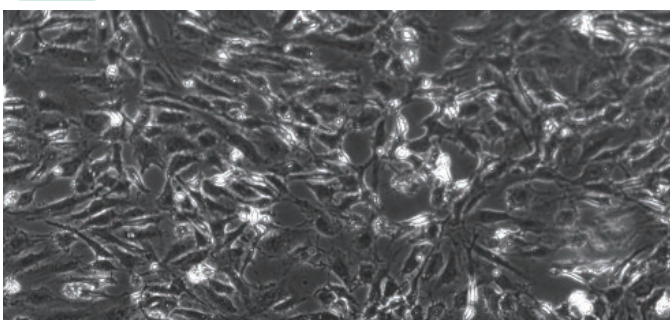
- ⑫ 下記フィルターセット付きの蛍光顕微鏡で細胞を観察します。
 緑：ニコン蛍光フィルターブロックLED470nm 細胞膜 (WGA)
 赤：ニコン蛍光フィルターブロックTRITC F-actin (Phalloidin)
 青：ニコン蛍光フィルターブロックDAPI DNA核 (Hoechst 33342)



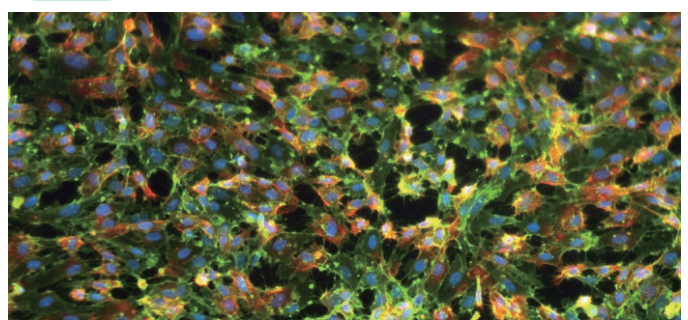
結果

静置培養 41hr 培養

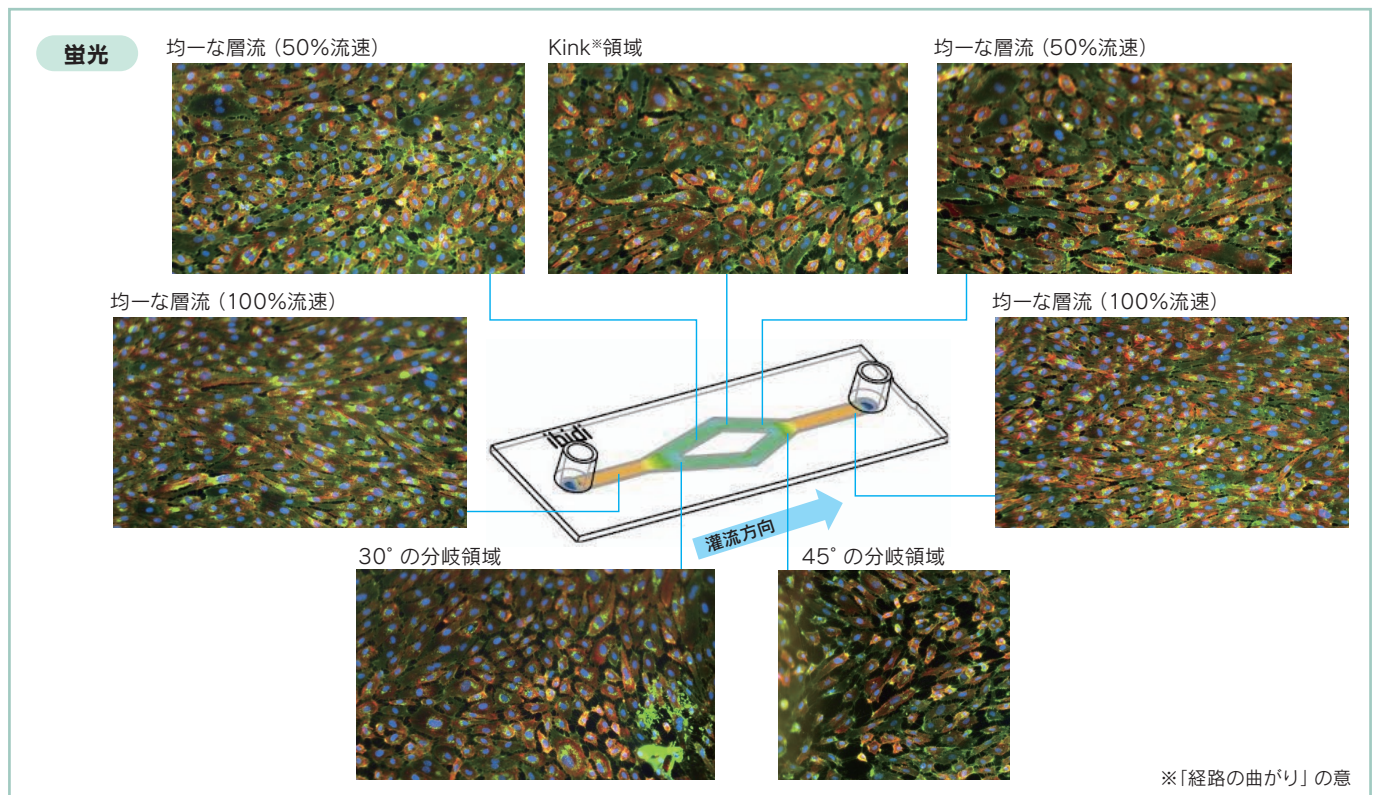
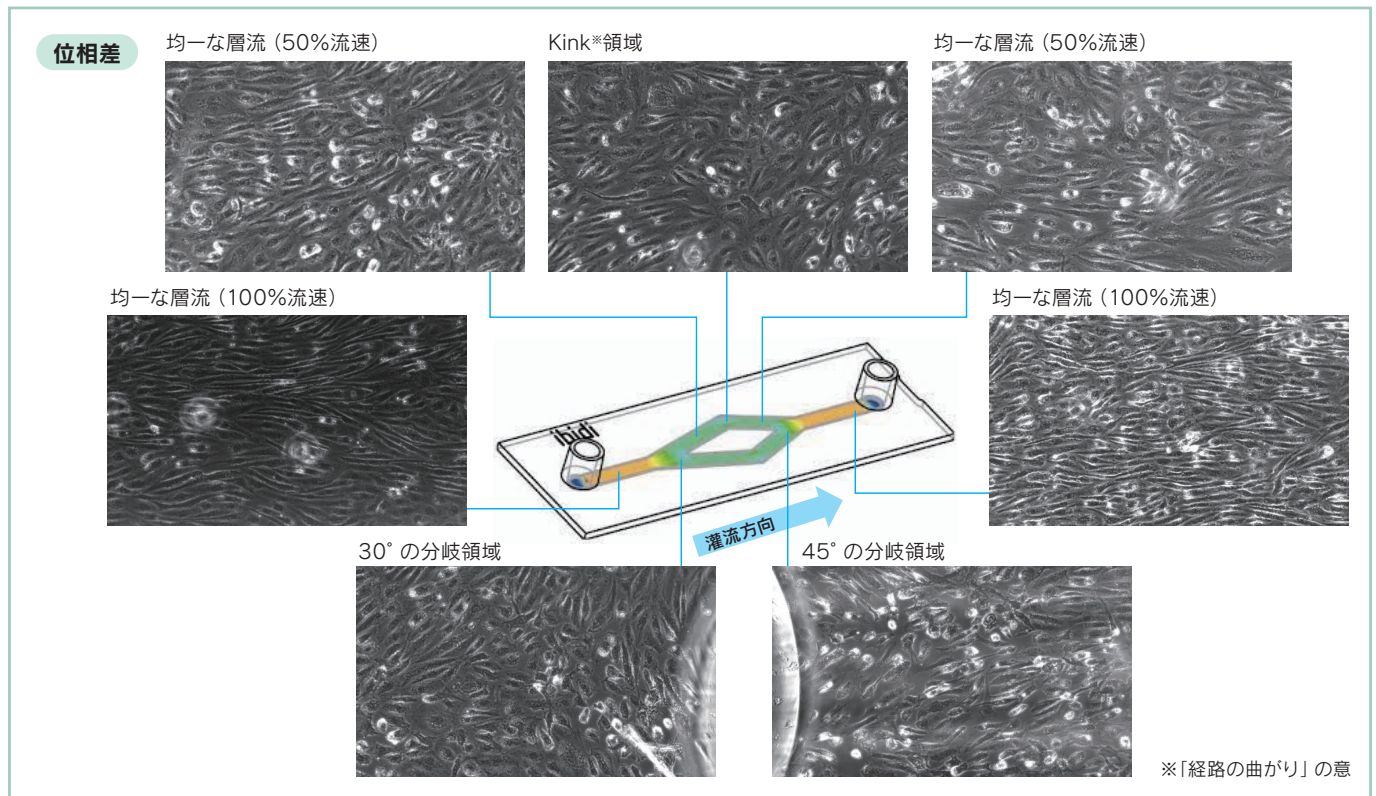
位相差



蛍光



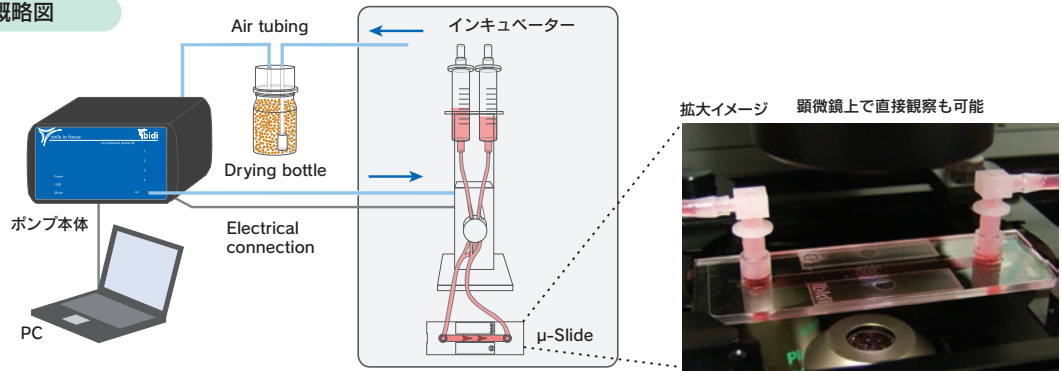
fluidic condition (灌流培養)

 シェアストレス40hr 2dyn/cm² 30min ⇒ 5dyn/cm² 30min ⇒ 10dyn/cm² 39hr

まとめ

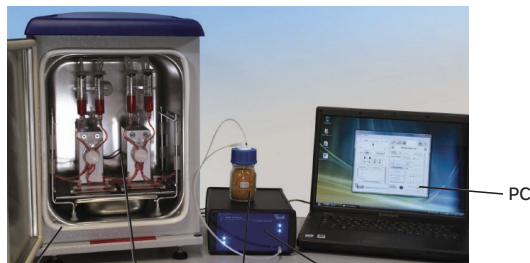
シェアストレスをかけた細胞は、スライドの領域により細胞の形状が異なることがわかった。内皮細胞並びに、細胞骨格であるアクチンフィラメントが流動方向に対し平行に並ぶ様子が確認された。これらは、内皮細胞がシェアストレスを感受することを示唆する結果である。

ibidi Pump System

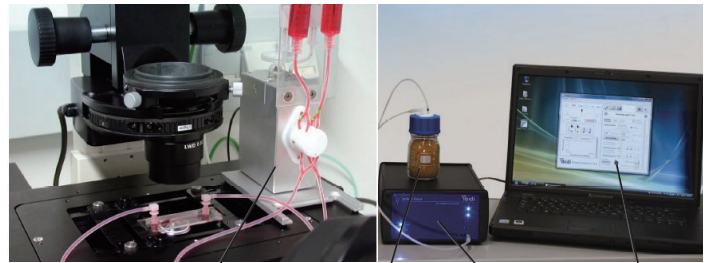
ibidiポンプシステムの概略図



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 Yシェイプ (μ-Slide y-shaped)

動脈硬化の血管シミュレーション用に開発されました。

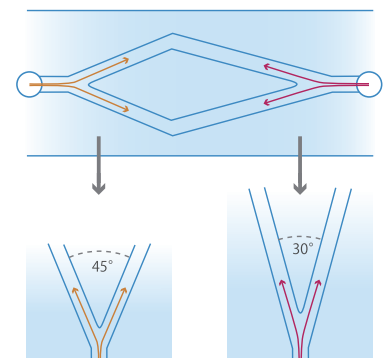
※シェアストレスについてはお問い合わせください。

【仕様】

- 30° と45° の2種類の角度について検討可能
- 両端のアダプター：メスルアー
- 両端の各リザーバー容量：96μl
- チャンネル内の容量：25μl
- チャンネル内の高さ：0.4mm
- チャンネル内流路の長さ：61.5mm
- スライドサイズ：25.5mm×75.5mm×1.5mm

本体(スライドチェンバー)は全て滅菌済です。

** ibiTreat=接着細胞用表面処理



研究用倒立顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ts2R

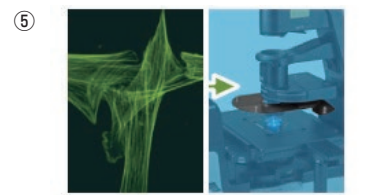
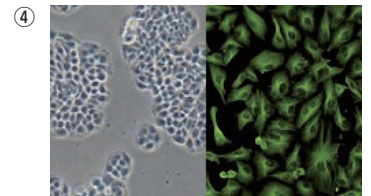
コンパクトな筐体で、多様な観察方法に対応した倒立顕微鏡のスタンダード機

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。
- **操作性に優れた高性能ステージ (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)	