

# 褐色脂肪細胞培養キット F-1, F-8(ラット)

(Brown Adipocyte Culture kit, Code No. BAT01, BAT02)

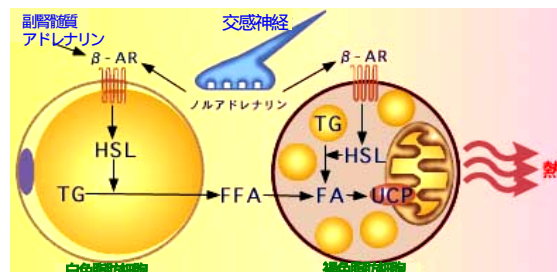
平成 21 年 4 月 20 日改定

本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

褐色脂肪組織は、過剰に摂取したエネルギーを脂肪として蓄えると同時に、脂肪のエネルギーを直接熱として体外に放出する特殊な働きを持っています。また、交感神経から分泌されるノルアドレナリンの作用により、エネルギー消費の自動調節にも寄与しています。

本培養キットは、ラット褐色脂肪組織より褐色脂肪前駆細胞を初代培養 (Primary Culture) し、Semi-Confluent まで増殖したところで発送しております。入荷時の初代培養細胞、あるいは適当な培養皿もしくはマルチプレートに継代した細胞を培養方法に沿って培養しますと、徐々に褐色脂肪細胞へと分化いたします。

本培養系を用いて、褐色脂肪細胞の脂質代謝実験、熱エネルギー放出実験、褐色脂肪細胞の機能解明あるいは新規 3 作動薬のスクリーニング等が可能です。



## 《 . キット構成》

キット構成	F-1 キット	F-8 キット
褐色脂肪前駆細胞	25cm <sup>2</sup> フラスコ × 1 本	25cm <sup>2</sup> フラスコ × 8 本
増殖用メディウム	125ml × 1 本	250ml × 1 本
分化誘導用メディウム	100ml × 1 本	250ml × 1 本
脂肪細胞維持メディウム	125ml × 1 本	500ml × 1 本

## 褐色脂肪細胞培養キット メディウム組成

	増殖用メディウム	分化誘導用メディウム	脂肪細胞維持メディウム
Dulbecco's Modified Eagle Medium (高グルコース)			
牛胎児血清 10 %			
ペニシリン 10 units/ml			
ストレプトマイシン 10 μg/ml			
pantothenic acid 17 μM			
(+)-biotin 33 μM			
ascorbic acid 100 μM			
octanoic acid 1 μM			
Triiodothyronine 50 nM			
Insulin 10 μg /ml	-		
Dexamethasone 2.5 μM	-		-

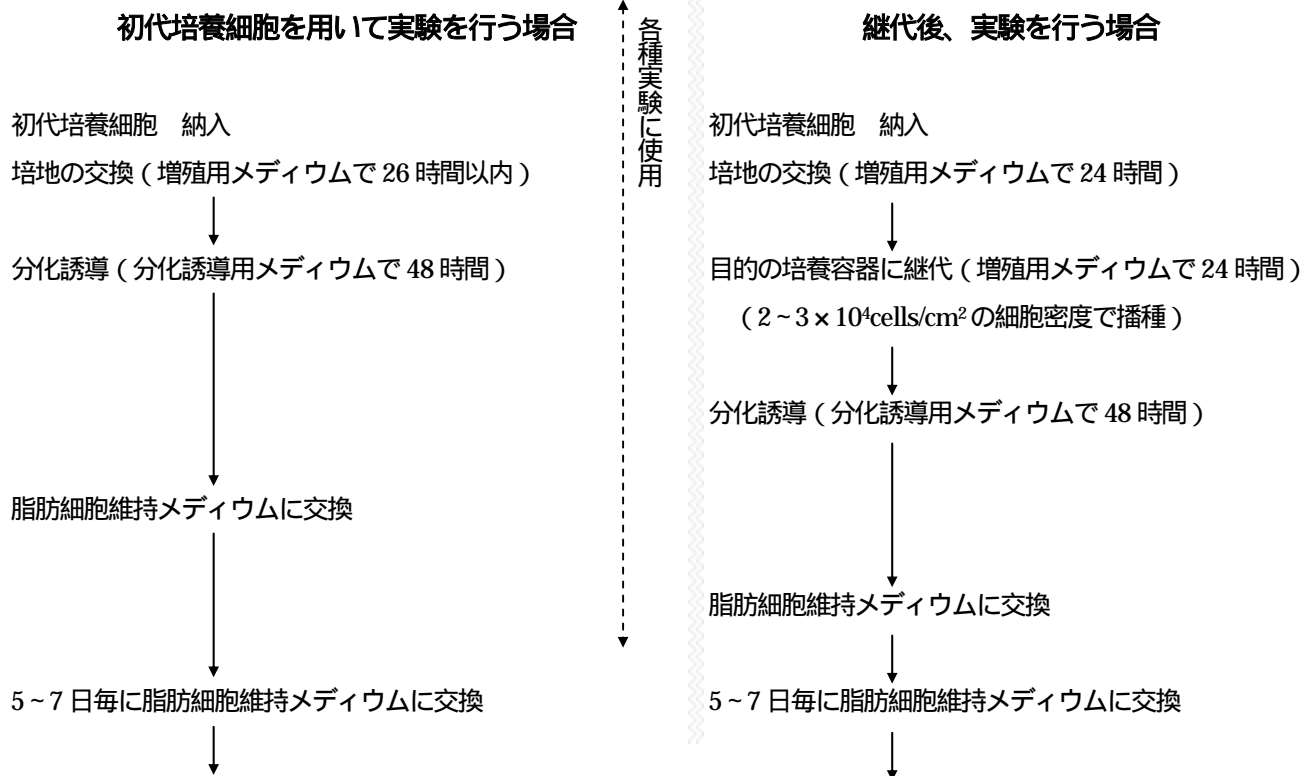
使用動物 : SD ラット・新生児 (2~4 日齢)

細胞採取日 : 平成 \*\*年 \*\*月 \*\*日

発送日 : 平成 \*\*年 \*\*月 \*\*日

Lot No. : \* \* \* \*

## 《 . フローチャート》



## 《 . 細胞培養方法》

ラット褐色脂肪前駆細胞は、出荷時にフラスコ内を増殖用メディウムで満たした状態で禁冷凍発送しております。商品がお手元に届きましたら、直ちに位相差顕微鏡にて細胞を観察し細胞が剥離していないかご確認下さい。  
またラット褐色脂肪細胞は、継代を繰り返すことによりその分化能が低下します。各種実験は、商品到着時の初代培養細胞、もしくは1度だけ継代した細胞を用いて行って下さい。

### 《 -1. 初代培養細胞を用いて培養を行う場合》

輸送用に加えてあるメディウムを無菌的に吸引除去し、室温に戻した増殖用メディウムを各フラスコに5mlずつ加える。

↓  
翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メディウムを吸引除去し、室温に戻した分化誘導用メディウムに交換する (分化誘導用メディウムで 48 時間)。

注1) 細胞がフルコンフルエントに達した後に分化誘導を行いますと、細胞が剥離し易くなったり、その後の分化能が低下することがあります。分化誘導は、商品が到着して増殖用メディウムに交換した後 26 時間以内に行ってください。

↓  
脂肪細胞維持メディウムに交換し、5~7 日間培養する。  
徐々に脂肪滴が蓄積していく様子が観察できる。  
脂肪細胞維持メディウムに交換後、5~7 日間培養以内に実験されることをお勧めいたします。

この間はメディウム交換をせずに培養してください。

注2) これ以上培養日数を延ばしたい場合はメディウム交換しさらに培養を継続することができますが、細胞が剥離しやすくなりますので取り扱いには慎重にしてください。

## 《 -2. 継代後、実験を行う場合》

[準備していただくもの]

- ・滅菌済み PBS(-) ; Ca、Mg を含まない生理的リン酸緩衝溶液
- ・トリプシン溶液 ; 0.1%トリプシン / 0.02%EDTA を含む PBS(-)
- ・実験に使用する培養用フラスコ、マルチプレート等。コラーゲンコーティングしたものが望ましい。

輸送用に加えてあるメEDIUMを無菌的に吸引除去し、室温に戻した増殖用メEDIUMを各フラスコに5ml ずつ加える。

翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メEDIUMを吸引除去し、室温に戻した滅菌済み PBS(-) 5ml でフラスコ内を洗浄する。

注3) 細胞がフルコンフルエントに達した後に継代を行いますと、細胞が接着しにくくなったり、その後の分化能が低下することがあります。

洗浄に用いた PBS(-)を吸引除去する。

室温に戻したトリプシン溶液 3ml を加えてフラスコ底面全体に行き渡らせ、すぐさま余分なトリプシン溶液を抜き取る。細胞が丸くなったのを位相差顕微鏡で確認後、軽く手のひらでフラスコをたたき、細胞がフラスコから剥がれて流動する様子が観察されるまでトリプシン処理を行う。

注4) 細胞がフラスコから剥がれにくい時は、数分インキュベーターに入れて加温して下さい。

長時間 (15 分以上) のトリプシン処理は、その後の分化能が低下することがあるので避けて下さい。

細胞が剥がれたのを確認後増殖用メEDIUMで細胞を回収し、2100RPM で 10 分間遠心して上清を吸引除去する。

増殖用メEDIUMを加えて細胞懸濁液を調製し、細胞数をカウントする。

細胞懸濁液を翌日細胞がコンフルエントになる細胞密度に増殖用メEDIUMを用いて希釈し、培養容器 (フラスコマルチプレート等) に播種する。  $2 \sim 3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種すると、ほぼ 1 日でコンフルエントに達する。

目安として 1 フラスコから 25cm<sup>2</sup> フラスコを使用する場合 3 フラスコ、24Well プレートの場合 1.5 プレート分に継代可能です。

継代翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メEDIUMを吸引除去し、室温に戻した分化誘導用メEDIUMに交換する (分化誘導用メEDIUMで 48 時間)

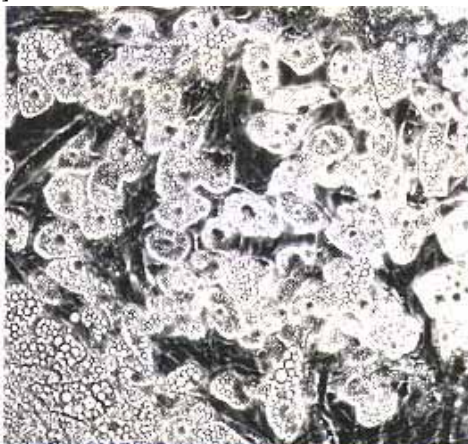
脂肪細胞維持メEDIUMに交換し、5~7 日間培養する。徐々に脂肪滴が蓄積していく様子が観察できる。脂肪細胞維持メEDIUMに交換後、5~7 日間培養以内に実験されることをお勧めいたします。

この間はメEDIUM交換をせずに培養してください。

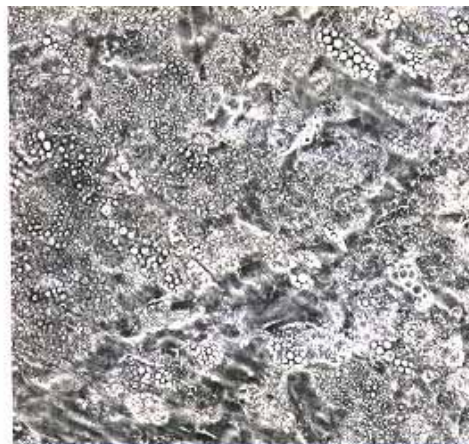
**注意 :** 本培養キットは、1 キット毎 Primary Culture しておりますので、Lot により褐色脂肪細胞の分化率が若干異なる場合があります。

[実験例]

成熟した褐色脂肪細胞



$2 \times 10^{-6}$ M ノルアドレナリン添加 18 時間後の褐色脂肪細胞



## 《 参考文献》

- (1) Rehnmark S., Kopecky J., Jacobsson A., Nechad M., Herron D., et al. Brown adipocytes differentiated in vitro can express the gene for the uncoupling protein thermogenin effects of hypothyroidism and norepinephrine. *Exp. Cell Res.*, (1989) 182:75-83
- (2) G.Ailhaud, P. Grimaldi, and R. Negrel, Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.*, (1992) 12:207-233
- (3) 吉田 俊秀、褐色脂肪と  $\alpha$ -adrenoceptor agonist. *医学のあゆみ* (1991) 156:707-710
- (4) Yasutake Shimizu and Takashi Shimazu, Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin and norepinephrine in primary culture of brown adipocytes. *B.B.R.C.*, (1994) 202 No.2 July 29 660-665
- (5) Yasutake Shimizu, Danuta Kielar, Yasuhiko Minokoshi and Takashi Shimazu, Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem. J.*, (1996) 314:485-490
- (6) Hideki Nikami, Yasutake Shimizu, Michihiro Sumida, Yasuhiko Minokoshi, Toshihide Yosida, Masayuki Saito, and Takashi Shimazu. Expression of  $\alpha$ -adrenoceptor and stimulation of glucose transport by  $\alpha$ -agonists in brown adipocyte primary culture. *J. Biochem.* (1996) 119:120-125

## 《 各種細胞培養キット》

メーカーコード	品名	キット構成	希望納入価格
BAT01	褐色脂肪細胞培養キット F-1 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 1本) 専用培地	113,000 円
BAT02	褐色脂肪細胞培養キット F-8 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 8本) 専用培地	154,000 円
WAT01	白色脂肪細胞培養キット F-1 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 1本) 専用培地	113,000 円
WAT02	白色脂肪細胞培養キット F-8 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 8本) 専用培地	154,000 円
VAC01	内臓脂肪細胞培養キット V-1 (ラット)	細胞 (凍結バイアル 1本) 専用培地	135,000 円
MYB01	筋芽細胞培養キット F-12 (ラット)	細胞 (12.5cm <sup>2</sup> フラスコ 12本) 専用培地	138,000 円
MYB02	筋芽細胞培養キット F-6 (マウス)	細胞 (12.5cm <sup>2</sup> フラスコ 6本) 専用培地	139,000 円
OBC01	頭蓋骨由来骨芽細胞培養キット F-1 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 1本) 専用培地	112,000 円
BMC01	骨髄細胞培養キット F-8 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 8本) 専用培地	156,000 円
HPC01	肝細胞培養キット F-8 (ラット)	細胞 (25cm <sup>2</sup> フラスコ 8本) 専用培地	148,000 円

注：希望納入価格に消費税は含まれておりません。

## 株式会社プライマリーセル (Primary Cell Co., Ltd.)

URL : <http://www.primarycell.com>

《 在庫・納期や製品に関するお問い合わせ 》

TEL 011-706-0205

FAX 011-706-0206

E-Mail : [tech@primarycell.com](mailto:tech@primarycell.com)

《 製品・サービスに関するご意見、お問い合わせ 》

E-Mail : [tech@primarycell.com](mailto:tech@primarycell.com)

または

WEB サイト [www.primarycell.com](http://www.primarycell.com) お問い合わせリンクにて入力をお願い致します。

《 プライマリーセル社製品をご利用になられた文献、発表データ 》

プライマリーセルでは、当社製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

〒001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 12 丁目 2 北大ビジネス・スプリング 3 階  
株式会社プライマリーセル マーケティング係 あて郵送  
または [tech@primarycell.com](mailto:tech@primarycell.com) あて PDF ファイル送信