

Then using calculated coefficient factors and measured F0, F1 and F2, you can calculate G, O and R-value as follows.

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{R56} & \kappa O_{R56} & \kappa R_{R56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix}$$

This calculation can be performed using the functions "MINVERSE" and "MMULT" in Microsoft Excel. These calculations are integrated in the Data Sheet.

## Appendix 2 Validation of reagents and equipment

### 5-1 Measurement of transmittance of optical filter for multicolor measurement

For color discriminations in the multi-color reporter assay, detectors (luminometer and plate reader) are usually equipped with optical filters, such as sharp-cut (long-pass) filters and band-pass filters. The transmittance factors of these filters for each bioluminescence signal color have to be calibrated prior to all experiments by following the protocols below.

#### 5-1-1 Reagents

- Single reference samples:
  - Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLG
  - Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLO
  - Lyophilized luciferase enzyme reagent of SLR
- Assay reagent:
  - Tripluc<sup>®</sup> Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)
- B medium: for luciferase assay (30 mL, stored at 2 – 8°C)

Reagent	Company	Conc.	Final conc. in medium	Required amount
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	27 mL
FBS	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot: 715004	-	10 %	3 mL

#### 5-1-2 Calibration

##### 5-1-2-1 Preparation of luminescence reaction solution

Thaw Tripluc<sup>®</sup> Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature by bathing in water or ambient air. Start the luminometer 30 min before starting the measurement for stabilization of the photomultiplier.

Add 200  $\mu$ L of 100 mM Tris-HCl (pH8.0) contains 10% glycerol to each tube of the lyophilized reference samples to dissolve the enzymes, followed by separating them into 1.5 mL disposable tubes at 10  $\mu$ L each and storing in a freezer at -80°C. The stored frozen solution of the reference samples can be used for one half year.

Add 1 mL of the the B medium to each tube of the frozen reference sample (10  $\mu$ L in a tube) and label them as SLG1/1, SLO1/1 and SLR1/1. Keep the reference samples on ice to prevent deactivation.

Prepare dilution series of the single reference samples of SLG, SLO and SLR as follows. Dilute 0.3 mL of each 1/1 solution with 0.9 mL of the B medium to make SLG1/4, SLO1/4 and SLR1/4. In the same manner, prepare 1/16 and 1/64 solution of each. Keep diluted reference samples on ice.

##### 5-1-2-2 Bioluminescence measurement

Transfer 100  $\mu$ L of the diluted reference samples to a black 96 well plate (flat bottom) as shown below.

Figure 28

flat-bottom black	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	SLG 1/1	SLG 1/1	SLG 1/1	SLG 1/4	SLG 1/4	SLG 1/4	SLG 1/16	SLG 1/16	SLG 1/16	SLG 1/64	SLG 1/64	SLG 1/64
C												
D	SLO 1/1	SLO 1/1	SLO 1/1	SLO 1/4	SLO 1/4	SLO 1/4	SLO 1/16	SLO 1/16	SLO 1/16	SLO 1/64	SLO 1/64	SLO 1/64
E												
F	SLR 1/1	SLR 1/1	SLR 1/1	SLR 1/4	SLR 1/4	SLR 1/4	SLR 1/16	SLR 1/16	SLR 1/16	SLR 1/64	SLR 1/64	SLR 1/64
G												
H												

Transfer 100  $\mu$ L of pre-warmed Tripluc to each well containing the reference samples of the plate using a pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) with a plate shaker. Remove bubbles on the solutions in wells if they appear. Place the plate into the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1, F2) of the optical filters.

Copy the results of the F0, F1 and F2 measurement (values are expressed as counts) and paste it to the appropriate area in the “Data Input” sheet of the data sheet for data analyses shown below.

Figure 29

MultiReporter Assay System -Tripluc® - Calculation Sheet

Input measured data (counts)

Data without filter

Null	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Data using Filter 2

F2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Record all the results for quality control.

## 5-2 Quality control of equipment

In order to confirm the detector stability as the quality control, the reference luciferase sample, optical property, the protocol described here should be performed at the beginning of the experiments every day.

### 5-2-1 Light source

LED Plate: Reference LED light source plates equipped with stabilized red, green, and blue LEDs are commercially available. For example,

TRIANANT® (wSL-0001) by ATTO (Tokyo, Japan)

L12367 by Hamamatsu Photonics (Shizuoka, Japan)

### 5-2-2 Data collection (an example using TRIANANT® by ATTO)

- 1) Start luminometer 30 min before starting the measurement for stabilization of the photomultiplier.
- 2) Start LED plate and select “PMT” mode.
- 3) Select three-color (BRG) mode and adjust light intensity to 1/10 ( $10E-1$ ).
- 4) Place the LED plate into the luminometer. Light intensity is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F2) of the optical filter.
- 5) Blue, green, and red LEDs are located at the position of #F6, #E6, and #D6, respectively. Copy the collected data of each position to the appropriate area on Sheet “LED” in the excel file of the data sheet.
- 6) Check the photo-detector performance by comparing with old data of the LED plate. For quality control purpose, every collected data should be recorded.
- 7) LED plate data typically fluctuates up to 1.5% ( $\sigma$ ). Disagreement to the old data should be less than  $3 \times \sigma$  (= 4.5%).

Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 006, Face sheet

**Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells**

Ver. 006

<b>Laboratory</b>		<b>Round</b>	
-------------------	--	--------------	--

<b>Exp.</b>	<b>1st exp.</b>
-------------	-----------------

<b>Date:</b> (YYYY/MM/DD)		<b>Operator:</b>	
------------------------------	--	------------------	--

<b>Code</b>	<b>Chemical 1</b>	
	<b>Chemical 2</b>	

<b>Dissolution</b>	<b>Chemical 1</b>		<b>mg/ml in</b>	
	<b>Chemical 2</b>			

<b>Molecular weight</b>	<b>Chemical 1</b>	
	<b>Chemical 2</b>	

<b>Comment:</b>	
-----------------	--

Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 006, Data input sheet

MultiReporter Assay System -Tripluc<sup>®</sup>- Calculation Sheet

Transmittance Data

	SLG	SLO	SLR			
T1	1	1	1	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
T2				#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
T3				#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!

Filter 1 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 2 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Filter 3 Data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												







## Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for #2H4 cells Ver. 006, Update record

- 2016年2月2日 Ver. 006  
phase 0用
- 2015年11月17日 Ver. 005. 2  
FaceSheetを追加  
EC30、Lowest-Observed-Effect Level (LOEL)、Max %suppression、Min %suppressionが算出されるように改変
- 2014年11月26日 Ver. 005. 1  
コントロール用のシートを修正
- 2014年11月17日 Ver. 005  
Multi-Immuno Tox Assayバリデーションプロトコール20141117 Ver. 004J案の変更に合わせ、コントロール等のプレート配置を変更  
%suppressionのグラフを削除
- 2013/11/6 Ver. 004  
統計処理用のシートを追加  
Result Format2シートの化学物質の濃度表示を修正 (公比2になるように)
- 未配布 Ver. 003. 1  
グラフの大きさを縮小 (パワーポイントにコピーペーストしやすくするため)
- 2013年9月19日 Ver. 003  
コントロール用のシートを追加 (dexamethasone, cyclosporin A)
- 2012年11月13日 Ver. 002. 1  
%Suppressionのグラフを追加
- 2012年8月31日 Ver. 002  
抑制率の計算方法を変更 (バックグラウンドの値を引き算する方法)
- 2012年8月28日 Ver. 001

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 試薬管理シート

実験名 <u>MITA バリデーション研究</u>						
被試験試薬コード _____						
被試験試薬管理						
受領日 _____ 年 _____ 月 _____ 日		受領者氏名 _____				
保管場所 _____		温度(°C) _____ °C				
備考 _____						
受領量(容器込) _____ g						
月 日	使用量(g)	残存量(g)	実験担当者名	備考	Exp. No.	溶解性検討
H. / /						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 試験者シート

実験名	MITA バリデーション研究	
実験日	_____	
施設名	_____	
実験責任者名	_____	
実験担当者名	_____	
実験担当者名	_____	
実験担当者名	_____	
実験担当者名	_____	
試験物質コード	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目
	_____	回目

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 細胞継代シート

3-1 #2H4培養方法

3-1-1 細胞懸生(P1)

あらかじめ、#2H4用C培地15 mLを37°C恒温槽で温めておく(培養用)。

凍結細胞を37°C恒温槽で融解し、#2H4用C培地9 mLを入れておいた15 mLの遠沈管に加える(細胞液0.5 mL+C培地 9 mL=計9.5 mL)

遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。

上清を吸引除去し、先に温めておいた#2H4用C培地15 mLに細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養を開始する(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)。

上記より一部細胞浮遊液を採取し、培養開始時の細胞生存率を計測する。(計算)

生細胞数:  
死細胞数:

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

3-1-2 選択抗生剤での培養開始(P2)

あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。

細胞懸生して3日~4日後に、選択抗生剤を入れた培養(#2H4用A培地)を開始する。フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

( + ) / x = x 10<sup>4</sup>/mL-A液

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた#2H4用A培地15mLに3 x 10<sup>5</sup>/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。

※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

3-1-3 通常の継代培養(P3以降)

P-

あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

継代細胞濃度は3 x 10<sup>5</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。

( + ) / x = x 10<sup>4</sup>/mL-A液

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 x 10<sup>5</sup>/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。

※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

---

P-

あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

継代細胞濃度は3 x 10<sup>5</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。

( + ) / x = x 10<sup>4</sup>/mL-A液

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 x 10<sup>5</sup>/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。

※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

---

P-

あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

継代細胞濃度は2 x 10<sup>5</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。

( + ) / x = x 10<sup>4</sup>/mL-A液

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 x 10<sup>5</sup>/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。

※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

---

P-

あらかじめ、#2H4用A培地必要量を37°C恒温槽で温めておく。

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

継代細胞濃度は2 x 10<sup>5</sup>/mL、継代間隔は3~4日程度で行う。

( + ) / x = x 10<sup>4</sup>/mL-A液

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに3 x 10<sup>5</sup>/mLで細胞を懸濁してT-75 Flaskで培養する。

※ 継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

## Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 細胞調製シート

実験名	MITA バリデーション研究		
実験日	_____		
施設名	_____		
細胞調製	室温	_____	°C
予定プレート数	_____ 枚	x	2.0x10 <sup>7</sup> cells/枚 x1.5= _____ cells (必要細胞数)
細胞調製(試験物質用)			
細胞蘇生年月日	_____	年	_____ 月 _____ 日
前回継代年月日	_____	年	_____ 月 _____ 日
前回継代時 細胞濃度・培養液量	_____	cells/mL	X _____ mL
実験当日細胞濃度	_____	cells/mL	-①
遠心した細胞数	_____	cells*1	①を _____ mLを採取
再懸濁した培地量	_____	mL (*1の細胞数÷(4x10 <sup>6</sup> ))	
それぞれのプレートに50 μL /wellで分注	<input type="checkbox"/>	( : )	_____
細胞調製(コントロール(dexamethasone, cyclosporine A)用)			
上で調製した細胞を別のプレートの#A1-#D5に50 μL/wellで分注	<input type="checkbox"/>	( : )	_____

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 被試験試薬の調製①シート

実験名	MITA バリデーション研究		
実験日	_____		
施設名	_____		
被試験試薬コード	_____	回目	_____
被試験試薬の調製①（溶媒への溶解）			
25mg/mL水溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解せず	<input type="checkbox"/> 完全に溶解	
	↓		
50mg/mL水溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解せず	<input type="checkbox"/> 完全に溶解	→25mg/mL水溶液を調製
	↓		
100mg/mL水溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解せず	<input type="checkbox"/> 完全に溶解	→50mg/mL水溶液を調製 →100mg/mL水溶液として調製を継続
	↓		
500mg/mL DMSO溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解 <input type="checkbox"/> 完全に溶解せず		→500mg/mL DMSO溶液として調製を継続
	↓		
250mg/mL DMSO溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解 <input type="checkbox"/> 完全に溶解せず		→250mg/mL DMSO溶液として調製を継続
	↓		
125mg/mL DMSO溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解 <input type="checkbox"/> 完全に溶解せず		→125mg/mL DMSO溶液として調製を継続
	↓		
62.5mg/mL DMSO溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解 <input type="checkbox"/> 完全に溶解せず		→62.5mg/mL DMSO溶液として調製を継続
	↓		
31.25mg/mL DMSO溶液で	<input type="checkbox"/> 完全に溶解 <input type="checkbox"/> 完全に溶解せず		→31.25mg/mL DMSO溶液として調製を継続
	↓		

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 被試験試薬の調製②(DW)シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 回目 \_\_\_\_\_

水溶液に調製された場合

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 \_\_\_\_\_ mgをDistilled waterに溶解し \_\_\_\_\_ mLとする。 → \_\_\_\_\_ mg/mL 調製時間 ( : )

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDistilled water、被試験試薬水溶液を分注する。

丸底・透明	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	Distilled water 50uL	被試験試薬水溶液 100uL
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

well#A11から#A3までDistilled waterで公比2で段階希釈を9段階おこなう。 添加時間 ( : )

アッセイブロックにB培地480 μLを分注し、上図の希釈液を20 μL添加して25倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。 □ ( : )

プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。 □

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。 □

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

1mM PMAストックをB培地で10倍希釈し100 μM溶液を作製する。(1mM PMA 10 μL + B培地 90 μL) □

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を作製する。 □

	B medium	1 mM Ionomycin	100 μM PMA	Ethanol	Total
Control	990 μL	-		10 μL	1000 μL
x10 PMA/ionomycin solution	2370 μL	24 μL	6 μL	-	2400 μL

コントロール溶液を#A1-#H1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#H12に10 μLずつ分注する。 □ ( : )

プレートシェーカーを使用し、撹拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。 □

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30分前には電源を入れる。 □

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに100 μL/wellずつ分注する。 □ ( : )

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)撹拌し、細胞を溶解させる。 □ 撹拌中温度 ( °C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。) □ 測定時間 ( : )

フィルタ無し、フィルタ有りで各々3秒/well測定する(アトー社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。 測定中温度 ( °C)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 被試験試薬の調製③(DMSO)シート

実験名 MITA バリデーション研究 \_\_\_\_\_

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 回目 \_\_\_\_\_

DMSO溶液に調製された場合

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 \_\_\_\_\_mgをDMSOに溶解し \_\_\_\_\_mLとする。 → \_\_\_\_\_mg/mL 調製時間 ( : )

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDMSO、B培地、被試験試薬DMSO溶液を分注する。

丸底・透明	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	DMSO 50μL	被試験試薬 DMSO溶液 100μL
B	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL	B培地 90μL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

well#A11から#A3までDMSOで公比2で段階希釈を10段階おこなう。 □

段階希釈した被試験試薬DMSO溶液 10 μLを8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して下のB培地90 μLにうつつ10倍に希釈する。 □

希釈した段階での沈殿の有無、性状

#B1	#B2	#B3	#B4	#B5	#B6	#B7	#B8	#B9	#B10	#B11	#B12
有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口

沈殿の性状 (例: 粉状、泥状、膜状、ミセル様) \_\_\_\_\_ ) □

アッセイブロックにB培地490 μLを分注し、上図の希釈液を10 μL添加して50倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。 □ 添加時間 ( : )

プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。 □

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。 □

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

1mM PMAストックをB培地で10倍希釈し100 μM溶液を製作する。(1mM PMA 10 μL + B培地 90 μL) □

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を製作する。 □

	B medium	1 mM Ionomycin	100 μM PMA	Ethanol	Total
Control	990 μL	-		10 μL	1000 μL
x10 PMA/ionomycin solution	2370 μL	24 μL	6 μL	-	2400 μL

コントロール溶液を#A1-#H1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#H12に10 μLずつ分注する。 □ 添加時間 ( : )

プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。 □

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30 分前には電源を入れる。 □ 添加時間 ( : )

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに100 μL/wellずつ分注する。 □

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、細胞を溶解させる。 □ 攪拌中温度 ( °C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。) □ 測定時間 ( : )

フィルタ無し、フィルタ有りで各々3 秒/well測定する(アトー社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。 測定中温度 ( °C)



Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver.001, 被試験試薬の調製④ (コントロール) シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 回目 \_\_\_\_\_

コントロールの調製と細胞への処理

dexamethasone, cyclosporine Aの調製  
 96 well clear plate(丸底)に下図のようにDMSO 50  $\mu$ L (#A4)、12 mg/mL cyclosporine A stock 10  $\mu$ L + DMSO 110  $\mu$ L (#A5)、Distilled water 50  $\mu$ L (#B1、#B2)、50 mg/mL dexamethasone stock 50  $\mu$ L (#B3)、B培地 180  $\mu$ l (#B4、#B5)を分注する。  添加時間 ( : )

丸底・透明	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				DMSO 50 $\mu$ L	CyA 12 mg/mL ストック 10 $\mu$ L + DMSO 110 $\mu$ L							
B	Distilled water 50 $\mu$ L	Distilled water 50 $\mu$ L	DEX 60 mg/mL ストック 50 $\mu$ L	B培地 180 $\mu$ L	B培地 180 $\mu$ L							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

#A4のDMSOと#A5のcyclosporine A DMSO溶液 20 $\mu$ Lを下のB培地180  $\mu$ Lにうつつ10倍に希釈する。

アッセイブロックの#A1-#A3にB培地480  $\mu$ L、#A1-#A3にB培地980  $\mu$ Lを分注し、上図の希釈液を20  $\mu$ L添加して混合し、50  $\mu$ L/wellずつ細胞に添加する。  添加時間 ( : )

プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、1時間反応させる。

賦活剤(PMA/ionomycin)の調製と細胞への処理

1mM PMAストックをB培地で10倍希釈し100  $\mu$ M溶液を作製する。(1mM PMA 10  $\mu$ L + B培地 90  $\mu$ L)

下図のようにコントロール溶液と x10 PMA/ionomycin溶液を作製する。

	B medium	1 mM Ionomycin	100 $\mu$ M PMA	Ethanol	Total
Control	990 $\mu$ L	-		10 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
x10 PMA/ionomycin solution	2370 $\mu$ L	24 $\mu$ L	6 $\mu$ L	-	2400 $\mu$ L

コントロール溶液を#A1-#D1、x10 PMA/ionomycin溶液を#A2-#D5に10  $\mu$ Lずつ分注する。  添加時間 ( : )

プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。

細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

測定(コントロール)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。

光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始30 分前には電源を入れる。  添加時間 ( : )

リザーバーにTriplucを移し、8チャンネルもしくは12チャンネルビペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに100  $\mu$ L/wellずつ分注する。

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27  $^{\circ}$ C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、細胞を溶解させる。  攪拌中温度 (  $^{\circ}$ C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31 $^{\circ}$ Cであることを確認する。)  測定時間 ( : )

フィルタ無し、フィルタ有りで各々3 秒/well測定する(アトー社製Pheliosの場合はF0、F1、F2を使用)。  測定中温度 (  $^{\circ}$ C)

Multi-ImmunoTox Assay 記録用紙 Ver. 001, 更新履歴シート

Ver. 001J 2016年02月02日配布

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nitakajima, Y., Ohmiya, Y. Aiba, S.	Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro Nitro test for skin sensitization	Toxicol in Vi	29	1816-1830	2015
Ohmiya, Y	Simultaneous multicolor luciferase reporter assays for monitoring of multiple genes expressions	Comb Chem High Throughput Screen	18	937-945	2015
Watanabe, M., Nomama, H., Kurai, J., Sano, H., Kitano, H., Saito, R., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Shimizu, E	Variation in the Effect of Particulate Matter on Pulmonary Function in Schoolchildren in Western Japan and Its Relation with Interleukin-8.	Int J Environ Res Public Health	12	14229-14243	2015
Watanabe, M., Nomama, H., Kurai, J., Sano, H., Saito, R., Abe, S., Kimura, Y., Aiba, S., Oshimura, M., Yamasaki, A., Shimizu, E.	Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8.	Biomed Res Int	2015	583293	2015

Watanabe, M., Kurai, J., Minato, S., Noma, H., Sano, H., Saito, R., Aiba, S., Oshimura, M., Hatakeyama, K., Yamasaki, A., Shimizu, E.	Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan	J Med Invest	62	145-148	2015
Yasunaga, M., Murotomi, K., Abe, H., Yamazaki, T., Nishii, S., Ohbayashi, T., Oshimura, M., Noguchi, T., Niwa, K., Ohmiya, Y., Nakajima, Y.	Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3	J Biotechnol	194	115-123	2015