

WILEY

# Current Protocols

ユーザーガイド

---



# INDEX

---

Current Protocols とは?.....	2
Current Protocols を利用するメリットは?.....	3
Current Protocols の対象利用者.....	4
Current Protocols のアクセス方法.....	4
最新情報を得るには?.....	4
Current Protocols の利用方法.....	5
- ホームページ	
- ログインとユーザー登録	
- Current Protocolsプラットフォーム上での検索方法	
- Current Protocol のタイトル内での 検索方法	
- 特定の Current Protocols 内での検索方法	
- Current Protocols コレクションについて	
- Current Protocols の特定タイトルを見る	
- プロトコルの見方	
プロトコルのセクションの説明	
自作のプロトコルを公開するには?.....	11





## Current Protocols とは？

コレクションには、再現性のある結果を出し、科学的発見への道を開くために必要な信頼性の高い方法を研究者の方々に提供する、約25,000の段階的テクニックおよび実験手続きを収載しています。学部生をトレーニングするための基礎的実験テクニック (*Essential Laboratory Techniques*) から科学者として成長するためのリソースまで、当社の代表タイトルである分子生物学の*Current Protocols*などを筆頭とする17の包括的なコレクションを現在揃えています。



Microbiology  
(微生物学)



Cytometry  
(サイトメトリー)



Essential Laboratory Techniques  
(基礎的実験テクニック)



Molecular Biology  
(分子生物学)



Chemical Biology  
(ケミカルバイオロジー)



Plant Biology  
(植物生物学)



Human Genetics  
(ヒト遺伝学)



Immunology  
(免疫学)



Cell Biology  
(細胞生物学)



Stem Cell Biology  
(幹細胞生物学)



Mouse Biology  
(マウス生物学)



Bioinformatics  
(バイオインフォマティクス)



Protein Science  
(タンパク質科学)



Pharmacology  
(薬理学)



Neuroscience  
(神経科学)



Nucleic Acid Chemistry  
(核酸化学)



Toxicology  
(毒物学)





## Current Protocols の対象利用者

Current Protocols は、大規模な研究プログラムを有する研究機関が、着実に効率的な発見を常に維持するために最適です。また、小規模な機関にとっても、機関内で不足している専門知識をCurrent Protocolsから得られ、時間を有効に使えます。さらに、学生、技術者、ポスドク研究員のベンチワークにとっても必要不可欠なリソースとなります。研究室長、主任研究者、部門長の方々は、助成金の作成と予算編成、および長期的な研究プロジェクトの計画などに活用できます。

## Current Protocols のアクセス方法

Current Protocols の下記URLにアクセスください: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/>

## 最新情報を得るには？

Current Protocols は編集委員会が査読し、定期的に更新しています。検索を定期的に行い、またHTML版へアクセスすることにより最新情報を得ることができます。常に最新版を利用できるように、HTMLまたはオンライン上のPDFを利用することをお勧めします。

Current Protocolsページ内の、右側のメニューにある「Get Contents alerts」をクリックして、アラートの配信を申し込むこともお忘れなく。

The screenshot shows the Current Protocols website interface. At the top, there is a search bar and a 'Login / Register' link. Below the navigation menu, the main content area features the Current Protocols logo and a description of the service. A 'LATEST ISSUE' section highlights 'Volume 1, Issue 6 June 2021'. In the 'Articles' section, the 'Get Content alerts' button is highlighted with a yellow box, indicating where users can click to receive notifications. Other buttons like 'Get Access' and social media links are also visible.



# Current Protocols の利用方法

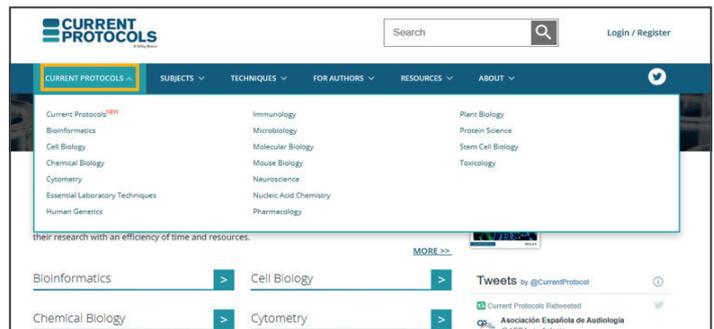
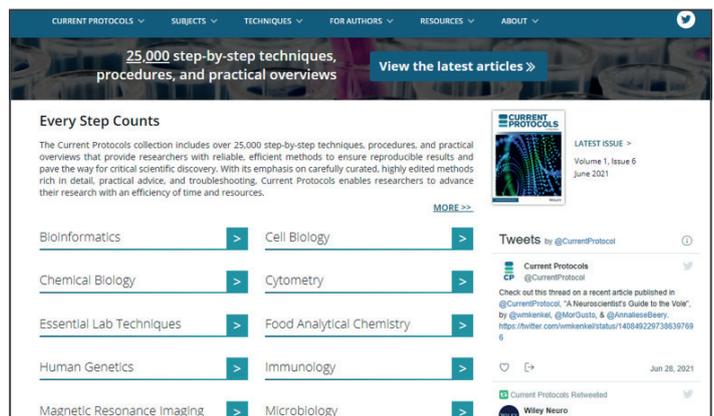
## 1 ホームページ

初めに、以下にアクセスします:

[currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com](http://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com)

ホームページから任意のトピックをクリックすると、各Current Protocolsのタイトルにアクセスできます。上方のドロップダウンメニューの「Current Protocols」メニューからも、各タイトルを選択することもできます。分野またはテクニック別に検索するためのドロップダウンメニューもあります。これについては、以下で詳しく説明します。

下にスクロールすると最新のプロトコルや最もアクセスされているプロトコル等が表示されます。ページ上部の検索バーを使用して、収録プロトコルを横断的に検索することも可能です。



## 2 ログインとユーザー登録

ホームページから画面右上の「**Login/Register**」をクリックしてログインまたはユーザー登録することができます。ユーザー登録は簡単です。

登録には所属機関の電子メールアドレスを利用下さい。より詳細な利用方法についてはWiley Online Libraryトレーニングハブをご覧ください。

お気に入りのプロトコルを保存することでいつでもすばやく必要な情報へ簡単にアクセスできます。保存したプロトコルは「My Account (マイアカウント)」(ログインした後、ページ右上のあなたのお名前をクリックすることによってアクセスすることができます) 検索の保存や保存済み検索へアクセスする場合、またはアラートの設定には、ログインする必要があります。





### ③ CURRENT PROTOCOLS のプラットフォーム上での検索方法

ページ上部の検索バーにキーワードを入力して検索できます。検索結果ページの左側メニューから複数のフィルターをかけられます。

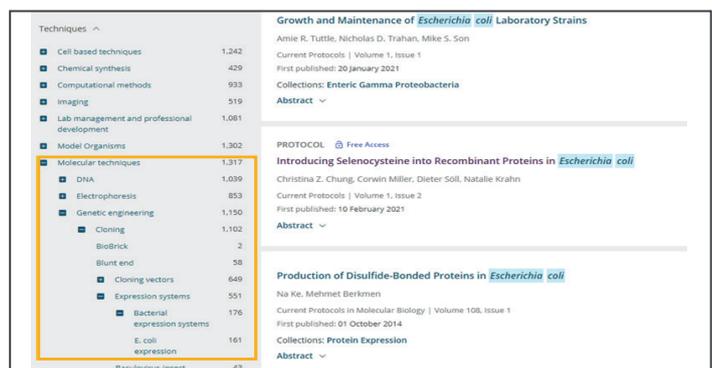
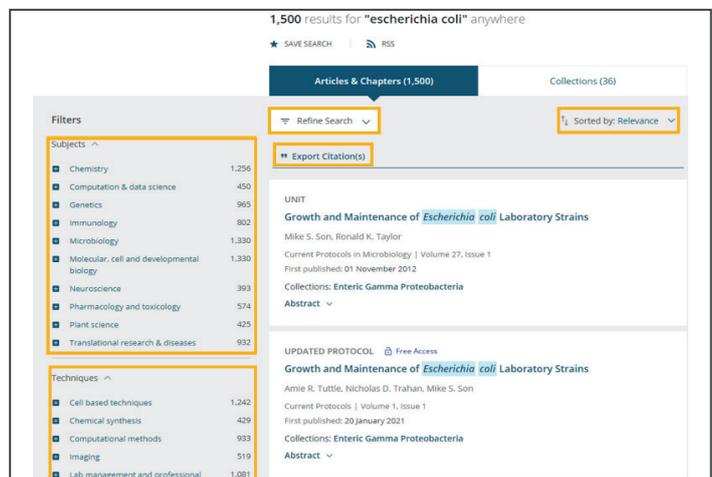
- **Subjects:** 検索結果を分野で絞り込むことができます。分野名を選択すると下位分類が展開され、検索結果をさらに絞り込むことができます。
- **Techniques:** テクニック分類を選択して検索を絞り込むことができます。テクニックを選択すると下位分類が展開され、検索結果をさらに絞り込むことができます。分野とテクニックフィルターを併用することで、研究ニーズに合った結果をすばやく得ることができます。
- **Published in:** 検索結果を特定のCurrent Protocolsのタイトル (例: Current Protocols in Molecular Biology) に絞り込むことができます。「4. 特定のCurrent Protocols内での検索方法」をご参照下さい。
- **Publication type:** すべてのプロトコルは「Journals」として表示されます。
- **Publication date:** 出版時期 (昨年、過去2年間、過去5年間、任意の範囲などで指定) での絞り込みができます。

検索結果リストの各プロトコルの下に表示されている「**Abstract**」をクリックすると、ページを移動することなく抄録を読むことができます。

検索の並べ替え方法は複数あり、関連性または日付 (新しいものから古いものへ、または古いものから新しいものへ) のいずれかを選択することができます。

「**Export citations**」をクリックして検索結果の文献情報を様々な形式でエクスポートできます。

より検索を絞り込みたい場合は、結果ページの上部にある「**Refine Search (検索の絞り込み)**」をクリックしてください。**Advanced Search**のように、検索条件やキーワードの追加が可能になります。





## 4 特定のCURRENT PROTOCOLS内での検索方法

ページ上部の検索バーを利用してCurrent Protocolsの全コンテンツを検索した後、検索結果を特定のCurrent Protocolsに限定できます。右のスクリーンショットをご参照ください。

「Advanced Search (検索バーから利用可能)」では著者名、タイトル、キーワードなどを検索条件を設定したり、出版日の範囲を指定できます。「Citation Search (引用の検索)」のタブをクリックすると、引用から検索することも可能です。

これら検索方法の詳細については、**Wiley Online Library**ユーザーガイドをご参照ください。

## 5 CURRENT PROTOCOLS コレクションについて

2021年の時点で、Current Protocolsは学際的な号を毎月出版すると同時に、各プロトコルはそれぞれ該当するCurrent Protocolsタイトルに振り分けられます。ここでは、Current Protocolsのコンテンツを閲覧する様々な方法をお知らせします。

新しく出版されたプロトコルを表示するには、ホームページ上にある「View the latest articles」ボタンをクリックします。これにより、最新コンテンツが表示されます、下にスクロールすると、この号の内容を閲覧できます。

ドロップダウンメニューの「Browse Articles」から過去の号を閲覧することもできます。

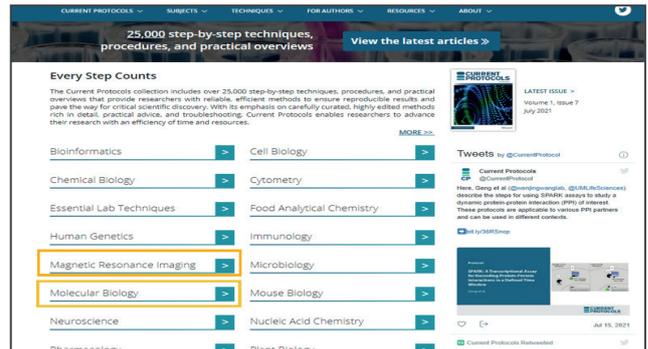
プロトコルの特集号を表示するには、「Special Issues」タブをクリックします。ここでは、新しい分野および学際的なコレクションのプロトコルが表示されます。Current Protocolsの編集者は、分野トップの研究者達にプロトコルの詳細を出版するよう依頼し、各分野で最重要なプロトコルの包括的コレクションを提供することを目的とし、各タイトルのコンテンツを厳選しています。トピックコレクションでは、タスクを実行したり、研究の具体的な疑問に答えるために重要な背景的情報を提供します。



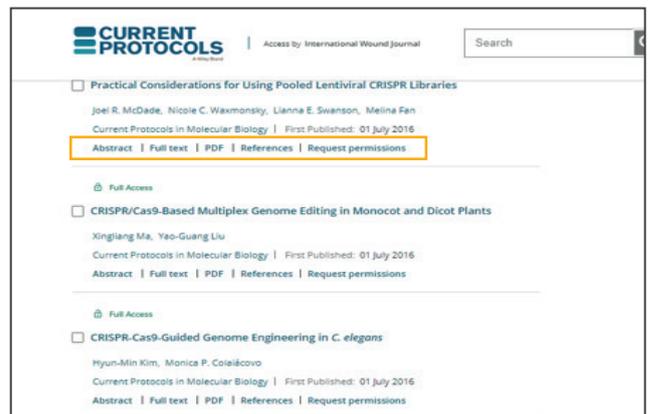
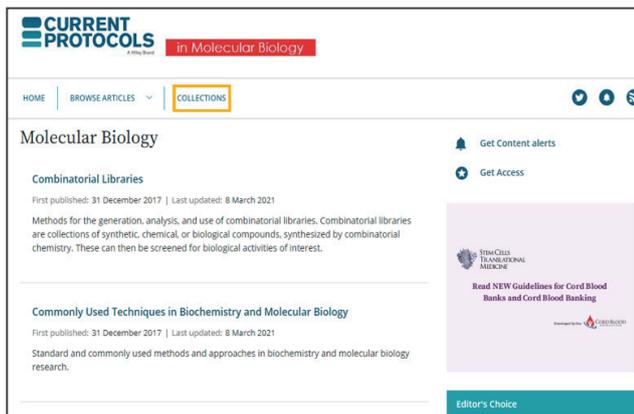
## 6 CURRENT PROTOCOLS 特定タイトルを見る

特定のCurrent Protocolsタイトルを見たい時はホームページ上のタイトルをクリック、上部のドロップダウンメニューから選択します。

例えばCurrent Protocols in Molecular Biologyをクリックすると分子生物学のCurrent Protocolsのページに移動します。ここから、「Browse Articles」ドロップダウンメニューをクリックして最新の分子生物学のプロトコルを表示するか、過去の号が掲載されているリストを表示します。

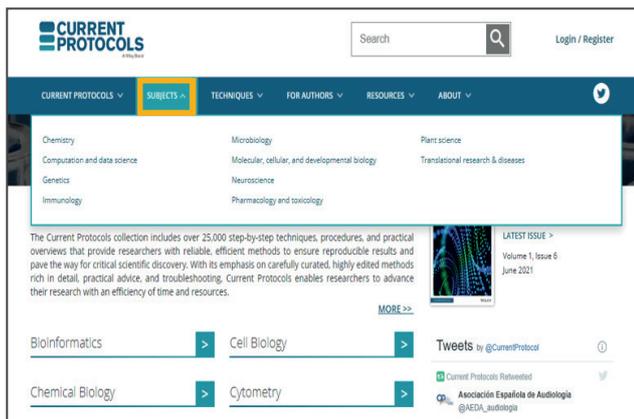


「Collections」タブをクリックすると、コレクション（以前のトピックまたは章に該当）に移動します。これにより、分子生物学のCurrent Protocolsに出版された全プロトコルがトピックごとに整理されて表示されます。





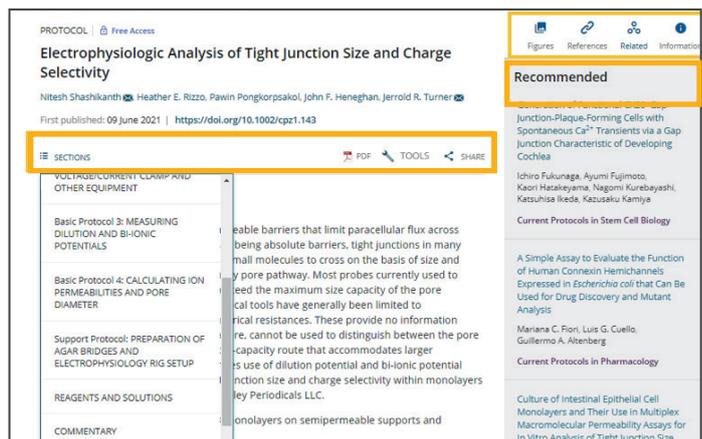
また、Current Protocols全コレクションをホームページのドロップダウンメニューからSubject(分野)、Techniqueごとにブラウズすることができます。分野を選択すると、その下位分野の選択が可能になり、関心のあるトピックに限定することができます。Current Protocols全コレクションから該当するプロトコルが検索結果として表示されます。この検索結果も前述のフィルター機能でさらに絞り込みが可能です。



## 7 プロトコルの見方

各プロトコルのHTML版ではセクション別の表示が可能です。様々な機能があります。

- **Sections:** 出版日の下に表示されている「SECTIONS」をクリックするとドロップダウンメニューが開き、読みたいセクションに直接移動できます。
- **PDF:** PDF形式は、必要に応じてダウンロード、拡大・縮小表示、及び印刷ができます。
- **Tools:** 使用許諾の申請、文献情報のエクスポート、「お気に入り」への追加、引用を追跡することができます。
- **Share:** 他のユーザーとコンテンツを共有できます。



メニュー右側

- **Figures:** プロトコル内の図表を一覧表示し、図表ファイルを.pngまたは.pptファイルとしてダウンロードできます。
- **References:** 当プロトコルを執筆するために引用した一次および二次情報源の引用文献情報が表示されます。
- **Related:** 今見ているプロトコルと関連した主題を扱い、参考になりそうな文献が表示されます。
- **Information:** プロトコルのインパクト指標、文献の詳細情報、関連キーワード(クリックすると関連キーワードを用いた検索結果が表示されます)、出版履歴、著作権情報などの情報が表示されます。



## 8 プロトコルのセクションの説明

- **Title:** タイトル
- **Author(s):** 著者
- **Abstract:** 抄録及び含まれるプロトコルのリスト
- **Introduction:** プロトコルの紹介文

**Electrophysiologic Analysis of Tight Junction Size and Charge Selectivity**  
 Nitesh Shashikanth,<sup>1,3</sup> Heather E. Rizzo,<sup>1</sup> Pawin Pongkorsakol,<sup>1,2</sup> John F. Heneghan,<sup>1</sup> and Jerrold R. Turner<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mucosal Barrier Pathobiology, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts  
<sup>2</sup>Faculty of Medicine and Public Health, HRH Princess Chulabhorn College of Medical Science, Chulabhorn Royal Academy, Bangkok, Thailand  
<sup>3</sup>Corresponding authors: shashikanth@bwh.harvard.edu, jturner@bwh.harvard.edu

Tight junctions form selectively permeable barriers that limit paracellular flux across epithelial-lined surfaces. Rather than being absolute barriers, tight junctions in many tissues allow ions, water, and other small molecules to cross on the basis of size and charge selectivity via the high-capacity pore pathway. Most probes currently used to assess tight junction permeability exceed the maximum size capacity of the pore pathway. As a result, available analytical tools have generally been limited to measurement of transepithelial electrical resistances. These provide no information regarding size selectivity and, therefore, cannot be used to distinguish between the pore pathway and the leak pathway, a low-capacity route that accommodates larger macromolecules. This article describes use of dilution potential and bi-ionic potential measurements for analysis of tight junction size and charge selectivity within monolayers of cultured epithelial cells. © 2021 Wiley Periodicals LLC.

**Basic Protocol 1:** Culture of MDCK monolayers on semipermeable supports and induction of claudin-2 expression  
**Basic Protocol 2:** Configuring voltage-clamp circuit and other equipment  
**Basic Protocol 3:** Measuring dilution and bi-ionic potentials  
**Basic Protocol 4:** Calculating ion permeabilities and pore diameter  
**Support Protocol:** Preparation of agar bridges and electrophysiology rig setup  
 Keywords: barrier function • claudin • ion conductance • permeability • tight junction

**How to cite this article:**  
 Shashikanth, N., Rizzo, H. E., Pongkorsakol, P., Heneghan, J. F., & Turner, J. R. (2021). Electrophysiologic analysis of tight junction size and charge selectivity. *Current Protocols*, 1, e143.  
 doi: 10.1002/cp.1.143

**INTRODUCTION**  
 Epithelial cells balance barrier function with transport of solutes and water between internal and external compartments. The bulk of transport is mediated by active transcellular

- 基本プロトコル、代替プロトコル及び各種支援プロトコル。各プロトコルには、個別のタイトル、紹介文および試薬の入手に関する情報を含む器具・材料リストが記載されています。

**RECOMMENDING AND COUNTERELECTION IN E-CO2**

After the experimental DNA and counterselection plasmids have been identified and constructed, performing various E-co2-based counterselection is straightforward. The first function of the method shown in Figure 2.8.1 is to require the sequential transformation of plasmids pEco2 and pE2/URA, followed by transformation of donor DNA. Here we detail the experimental steps required for transformation of the host strain, accounting potential counterselection, and finally plating control.

**Materials**  
 pEco2 (Addgene, cat. no. 62855)  
 E. coli host strain (e.g., MG1625)  
 LB broth and agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol (CAM) (Sigma and Becton, Dickinson)  
 Super Optimal broth with catalase expression (SOC) (Fisher Scientific, cat. no. 1000000000)  
 pE2/URA (made in Basic Protocol 1)  
 LB agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin (Fisher Scientific, cat. no. 1000000000)  
 LB agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol, 50 mg/ml spectinomycin, and 50 mg/ml uridylyltransferase (URA)  
 Plasmid for DNA sequencing or ability-specific PCR  
 SOC medium (see recipe) with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin

- **プロトコルの手順:** 実験手続きを分かりやすく番号順にステップを踏んで詳細に示されます。
- 役立つヒント、代替案および追記等がイタリックの注釈で捕捉されています。

1. Grow the host strain in SOC medium with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin for 16 h at 37°C. Wash the cells in LB broth and resuspend in LB broth.

2. Transform the host strain with pEco2. Plate 100 µl of the transformation mixture on LB agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Incubate for 16 h at 37°C.

3. Pick a single colony and inoculate into 10 ml of LB broth with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Grow overnight at 37°C.

4. Transform the host strain with pE2/URA. Plate 100 µl of the transformation mixture on LB agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Incubate for 16 h at 37°C.

5. Pick a single colony and inoculate into 10 ml of LB broth with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Grow overnight at 37°C.

6. Transform the host strain with donor DNA. Plate 100 µl of the transformation mixture on LB agar plates with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Incubate for 16 h at 37°C.

7. Pick a single colony and inoculate into 10 ml of LB broth with 10 mg/ml chloramphenicol and 50 mg/ml spectinomycin. Grow overnight at 37°C.

8. Perform DNA sequencing or ability-specific PCR on the resulting colonies.

- **Reagents and Solutions:** 試薬と溶液のセクションでは、準備を要するバッファの処方を提供しています。
- **Commentary:** 全般的な背景、重要なパラメータ、トラブルシューティング、予測結果、所要時間、引用された文献などを掲載しています。

**REAGENTS AND SOLUTIONS**  
 The following are the reagents and solutions used in the protocol. For common stock solutions, see Appendix 1.

**SOC medium**  
 6.5% (w/v) yeast extract  
 2% (w/v) tryptone  
 10 mM NaCl  
 2.5 mM KCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM MgSO<sub>4</sub>  
 Sterile individually at room temperature

**COMMENTARY**  
 The development of CRISPR/Cas9 has revolutionized the ability to perform targeted genome editing in eukaryotic cells. CRISPR/Cas9 can be used to generate knockouts of genes of interest. In the case of the yeast strain used in this protocol, the CRISPR/Cas9 system was used to generate a knockout of the gene encoding the protein that binds to the cell wall, resulting in a cell wall defect. This mutation is lethal in the absence of the cell wall, and thus provides a powerful selection for the desired mutant. However, the CRISPR/Cas9 system can also be used to generate knockouts of genes that are not essential for cell viability. In this case, the CRISPR/Cas9 system was used to generate a knockout of the gene encoding the protein that binds to the cell wall, resulting in a cell wall defect. This mutation is lethal in the absence of the cell wall, and thus provides a powerful selection for the desired mutant.



- トラブルシューティングの項目では物事が予測どおりに進まない場合の対処方法を紹介しています。
- **Understanding Results:** 結果の理解

Variable electrical potential shifts in different organic cation buffers	Osmolality is not balanced	Confirm osmolality with an osmometer and adjust as needed with ~mannitol or water
Large (>20 mV) electrical potential difference when transferring monolayer to wells with organic cations	Low permeability of organic cations has caused large electrical potential shift	Instead of 138 mM organic cation-Cl, use basal chamber buffers with 69 mM NaCl and 69 mM organic cation-Cl

\*This will, however, result in smaller potentials and possibly less accurate measurements.

expression in MDCK 1 cells converts this pattern to that of MDCK 2 cells. Changes induced by claudin-2 expression therefore vary and can be maximized or minimized depending on the time after plating at which barrier function is measured. TER development can be monitored using an EVOM or similar device in which the electrodes can be sterilized by dipping in 70% ethanol.

**Troubleshooting**

For 2 "big" or common problems, their possible causes, and suggested solutions, see Table 1.

**Understanding Results**

An exemplary data MDCK 1 monolayers with inducible claudin-2 expression were studied. Claudin-2 expression and colocalization with ZO-1 at tight junctions was assessed.

mine absolute and relative permeabilities of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>. Claudin-2 expression increased Na<sup>+</sup> permeability ~40-fold (Fig. 6C), but only increased P<sub>Cl<sup>-</sup></sub> ~7-fold (Fig. 6D). The difference between these two values indicates the extent to which claudin-2 channels exclude anions (i.e., Cl<sup>-</sup>). Claudin-2 is less effective at discriminating between monovalent cations such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, and Cs<sup>+</sup>, as well as organic cations (Yu et al., 2009). This relatively poor selectivity allows organic cations to permeate claudin-2 channels on the basis of size and enables the bi-ionic potential approach described here. In contrast, transmembrane ion channels such as the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase would not be functional if they were unable to discriminate between Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. Even CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), which has a relatively high anion selectivity, excludes large anions.

## 自作のプロトコルを公開するには？

自作のプロトコルを投稿したい場合は、まず該当するプロトコルタイトルにアクセスしてください。上部のナビゲーションメニューから「For Authors (著者用)」セクションをクリックします。ドロップダウンメニューから「Submit a proposal (提案を投稿)」を選択してください。編集委員会が投稿された提案を検討し、承認されましたら、より詳細な手法を示した原稿を投稿いただくよう連絡がきます。

The screenshot shows the Current Protocols website interface. At the top, there is a search bar and navigation tabs for 'CURRENT PROTOCOLS', 'SUBJECTS', 'TECHNIQUES', 'FOR AUTHORS', 'RESOURCES', and 'ABOUT'. The 'FOR AUTHORS' tab is active, displaying a dropdown menu with options: 'Author Guidelines', 'Cover Submission Guidelines', 'Open Access', 'Submit an article', and 'Submit a proposal'. Below the menu is a banner image of a scientist in a lab coat using a microscope. The Current Protocols logo and website URL 'currentprotocols.com' are visible. A paragraph of text describes the journal's editorial process and provides contact information for submitting proposals.



次のQRコードをスキャンして提案を投稿することもできます。

