

3D培養観察用デバイスを用いた 細胞の培養方法



【キットの仕様】

- ・ 3D培養観察用デバイスは10mm、5mm、3mmともに8個/セット
- ・ サポートゲル



左：サポートゲル（瓶） 右：3Dデバイス

【キット以外に必要な実験材料、器具等】

※培養細胞を扱うため、全ての道具は滅菌済のものを使用して下さい。

- ・ 培養する対象細胞
実験例：Human umbilical vein endothelial cells（HUVEC）
- ・ EGM-2 Bulletkit medium (Lonza CC-3162) (各細胞に適した培地をご準備ください)
- ・ PBS (-)
- ・ 0.25%トリプシン-EDTA
- ・ Cellmatrix Type I -A (新田ゼラチン) (各施設でご使用の試薬をご準備ください)
- ・ 5mL、10mL ピペット
- ・ ピンセット（デバイスを取り扱える大きさ）2～3本
- ・ 無菌シャーレ
- ・ 24well細胞培養プレート
- ・ 濾紙
- ・ 先端を0.5cm程切ったチップ（粘性の高い液体を扱う際に使用します）

各デバイスに適したチップの大きさ参考例
10mmデバイス・・・ 1000 μ L用チップ
5mmデバイス・・・ 200 μ L用チップ
3mmデバイス・・・ 10 μ L用チップ

【プロトコール（実験例）】

【3D培養観察用デバイスの準備】

操 作

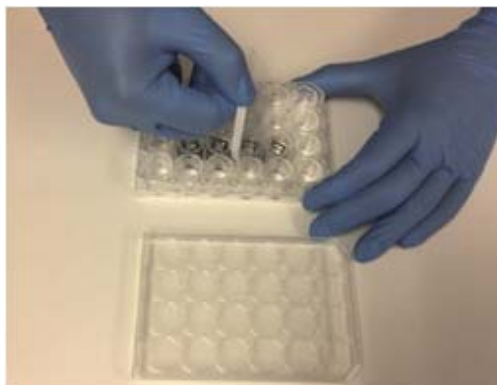
注意点・コツ

1) washing用培地の準備：24well plateの3wellに培養用培地を適量入れておく
（デバイスを洗うため）

2) 滅菌濾紙を無菌シャーレ上に準備して、デバイスを取り出す。

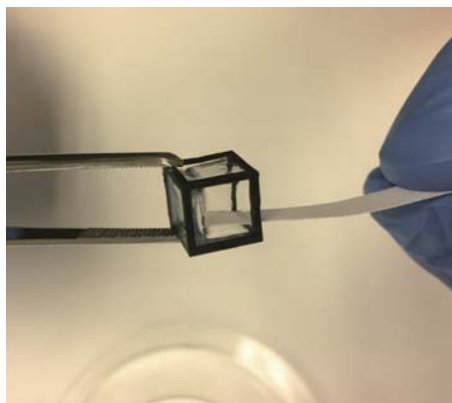
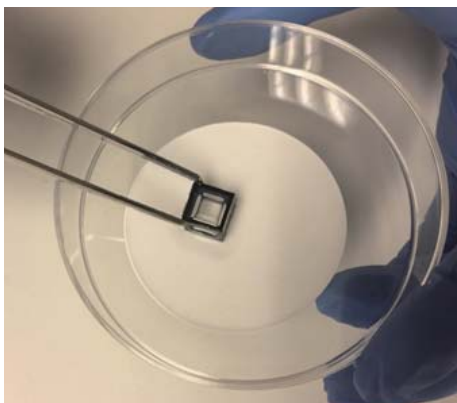


滅菌濾紙

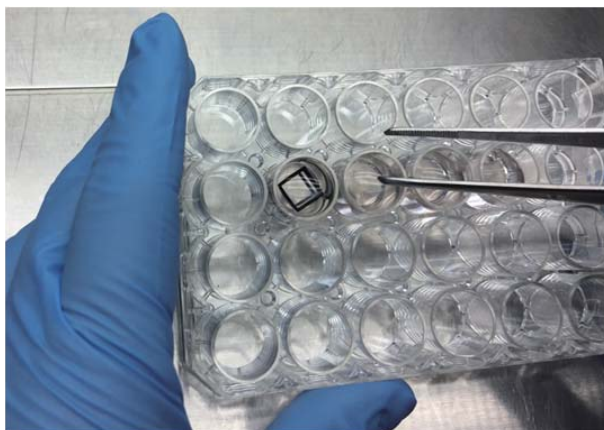


内側シールをはがして、デバイスを取り出す

3) 取り出したデバイスのゲルが無い部分の面を下にしてシャーレにのせ、デバイス内の水をきる。その後、用意した滅菌濾紙上に乗せて、中に溜まった水を濾紙に吸わせる。
（ゲルの無い部分の面の角を濾紙に置くと、自然に水が濾紙に吸い込まれる）



4) 1) で準備した専用培地で2回、デバイスを洗浄する。



デバイスの洗浄

5) 2回洗浄後、新しい専用培地のwellへ移して使用するまで37℃、5% CO₂インキュベーター内で保管する。

※ゲルが濾紙に張り付いてしまうと剥がれてしまう恐れがある。

※10mmデバイス内部は細く切った濾紙を使用するとうまく水を吸うことができる。

※ピンセットでデバイスを取り扱う際は、下の写真のように外枠から挟むとゲルが破れにくい。

【培養用の専用培地の準備】

操 作	注意点・コツ
24well plateに培養用培地を1mL入れて、37℃、5% CO ₂ インキュベーター内で、使用するまで平衡化させる。	

【細胞の回収】

操 作	注意点・コツ
<p>事前に3D培養観察用デバイスに適した必要細胞濃度の確認が必要です。</p> <p>実験例：2.0×10⁵cells/mL</p> <ol style="list-style-type: none">1) PBS (-) で細胞を2回洗浄する。2) 0.25%トリプシン-EDTAを2mL添加する。(T25フラスコの場合)3) 37℃内で3分間静置する。4) 培地を添加し、細胞をピペティングしながらはがした後、15mLチューブに回収する。5) 200g、4℃、5分間遠心する。 (※この間にセルマトリックスの準備操作を行う)6) 上清を捨てる。(細胞のペレットを吸わないように)7) 細胞数をカウントする。8) 細胞数が2.0×10⁵cells/mLになるように、細胞をセルマトリックスに混合させる。	

【セルマトリックスの準備と細胞懸濁液の作成】

操 作	注意点・コツ
<ol style="list-style-type: none">1) セルマトリックス：10倍DMEM：Buffer※ =8：1：1以上の濃度で混合し、氷上で保管する。2) セルマトリックス溶液の量は実験するデバイスの大きさ・数に合わせて決める。3) 準備した細胞に、セルマトリックス溶液を加えて細胞懸濁液を作成する。4) 氷上で保管する。	<p>※セルマトリックス溶液は非常に泡立ちやすいのでゆっくりと混ぜる。(1度泡ができるとなかなか消えません)</p>



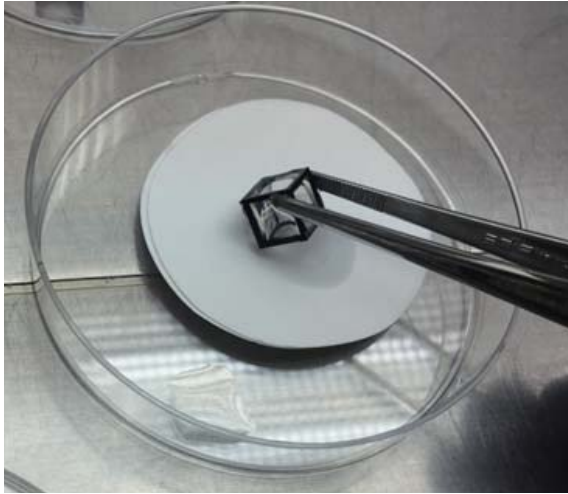
調製したセルマトリックス溶液は氷上で保管する

【3Dデバイスへの細胞の播種】

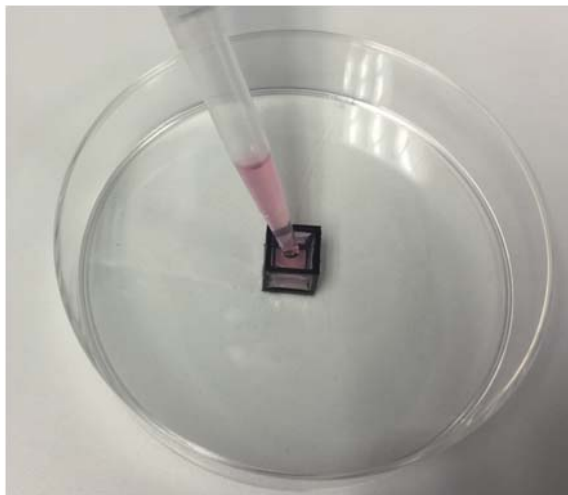
操 作

注意点・コツ

- 1) 専用培地に入れて保管していたデバイスを取り出す。
- 2) 滅菌濾紙上でデバイスのゲルの無い部分の面から培地を吸い取る。

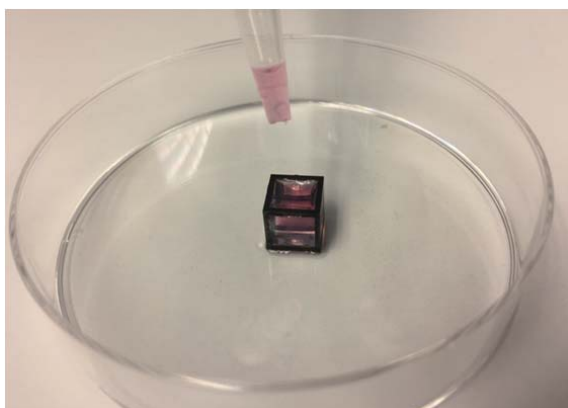


- 3) ゲルが無い面を上に向けて、新しい滅菌シャーレ上にデバイスを置く。
- 4) 細胞懸濁液をデバイス内に添加する。



デバイスへの細胞懸濁液の添加量は、デバイス上面のフレーム下部までを目安とする。

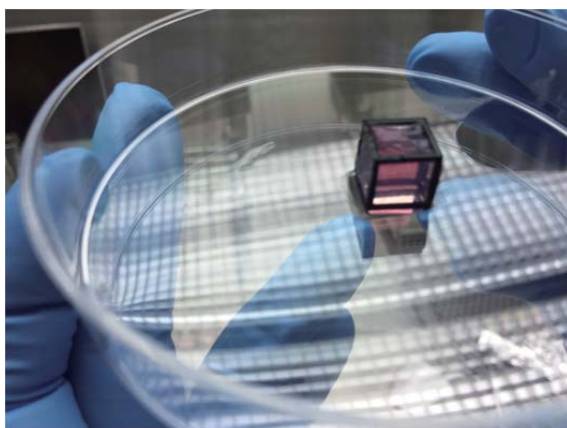
- (参考量) 10mmデバイス・・・約400 μ L
5mmデバイス・・・約100 μ L
3mmデバイス・・・少量



※この時、使用するピペットはあらかじめ先を切っておくと粘度の高いセルマトリックス溶液でも操作が容易になる。

※デバイスの内部までピペットの先端を入れて、泡ができないようにゆっくり添加する。

- 5) シャーレに蓋をし、37℃、5%CO₂インキュベーターにてセルマトリックス溶液が固まるまで待つ。(約10分)



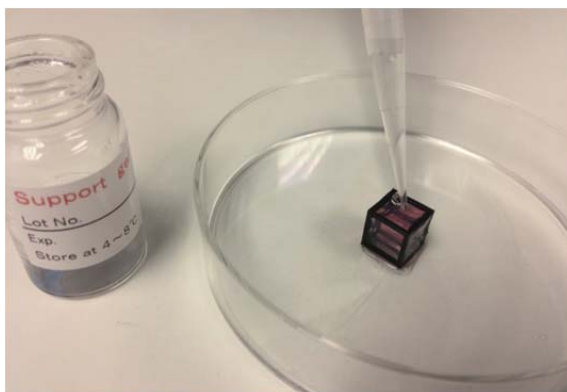
固まった状態

- 6) 5) の操作の間にサポートゲルを溶解させる。白い蓋をゆるめてから、1~10秒ぐらい電子レンジ等で溶かして使用する。
(より安全な方法として恒温器で加温する方法を薦める)



注意：
電子レンジを使用する場合は必ず白い蓋をゆるめてから、500W10秒以内で加温してください。蓋を締めた状態又は長時間電子レンジをかけるとガラスが割れ、爆発する恐れがあり、非常に危険です。

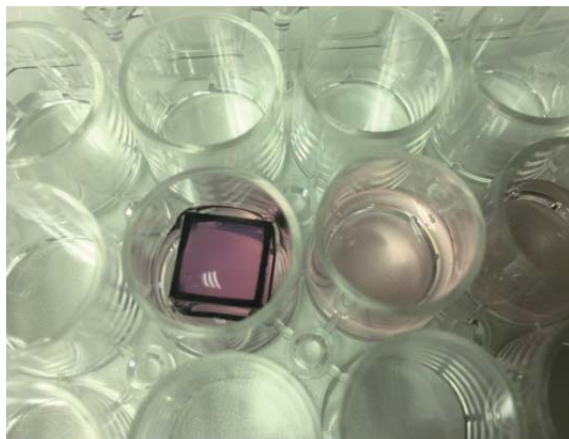
- 7) インキュベーターからデバイスを取り出し、デバイス上面から、フレーム上面と同じ高さまでサポートゲルで覆う。



デバイス上面をサポートゲルで覆う。

注意：
サポートゲルを滴下する前に、サポートゲルの温度が38℃以下まで冷めていることを確認してください。(細胞や組織への影響を抑えるため)

- 8) 24wellプレートにデバイスを移し、乾燥防止の為、準備していた専用培地をデバイスの上面まで到達しない程度に入れ、37℃、5%CO₂インキュベーターにて、サポートゲルが固まるまで静置する。(約60分)



専用培地の量は、デバイスの上面まで到達しない程度

- 9) サポートゲルが固まったら、準備していた専用培地内に入れ、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養する。
(専用培地をデバイスが十分漬る程度追加する)



37℃、5%CO₂インキュベーターで培養中の3D培養観察用デバイス

- 10) 24hr 後、培地を半分交換する。その後、3 日間に 1 回培地交換を行う。
(各施設培養状況に応じて培地交換をしてください)

【デバイス取扱注意点】

※デバイスのゲルを突き破らないように、デバイスをピンセットでつかむときは外枠のフレーム部分をつかむようにして下さい。

※3mm と 5mm のデバイスは、ゲルのない上面のフレームを塗装しているため、有機溶剤につけないで下さい。

(変色する場合があります)

※本製品は研究用以外の目的で使用しないで下さい。

※弊社は、本製品の使用に起因する事故や損害に対する責任を負いかねますのでご了承下さい。