

3D培養観察用デバイスを用いた 組織の培養方法



【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（実験例：妊娠16日マウス胎児の腎臓）
- ・Lonza初代細胞用培地：Lot No.CC3190
（各施設で適性培地をご検討の上、調整方法を参考にし、準備をしてください）
- ・Culture gel: Conning Matrigel Matrix REF: 356231
（培養目的によって各施設でご検討ください）
- ・氷（マトリゲル等を一時保管する為）
- ・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】

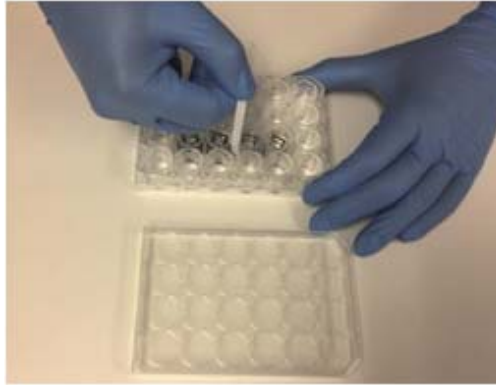
操 作

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。

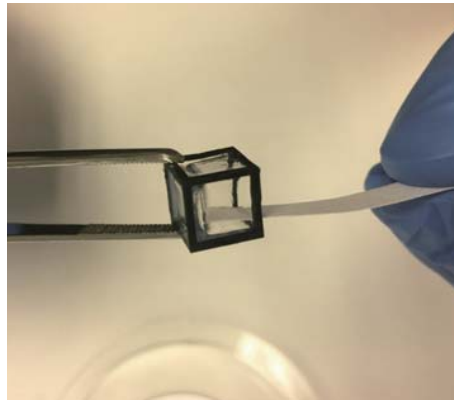
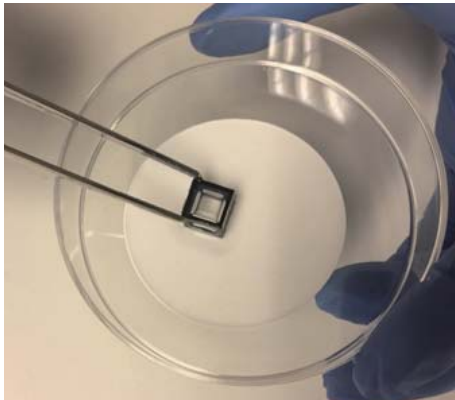


滅菌濾紙

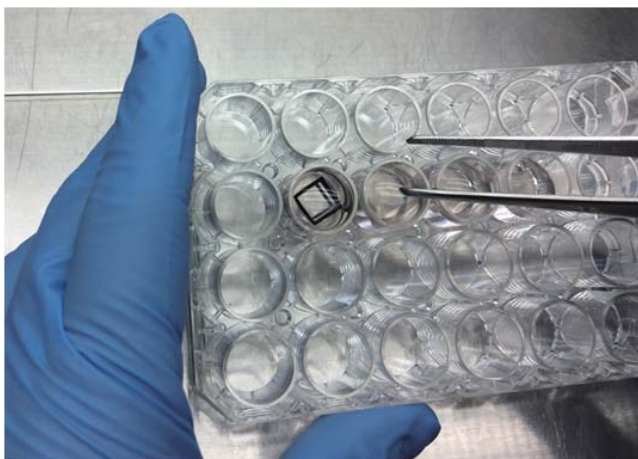


内側シールをはがして、デバイスを取り出す

- 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。	

【マウス組織の準備】

操 作	注意点・コツ
1) マウスを解剖し、組織を取り出す。 2) 培養液で組織を2回洗浄する。 3) 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。	

【マトリゲルの準備】

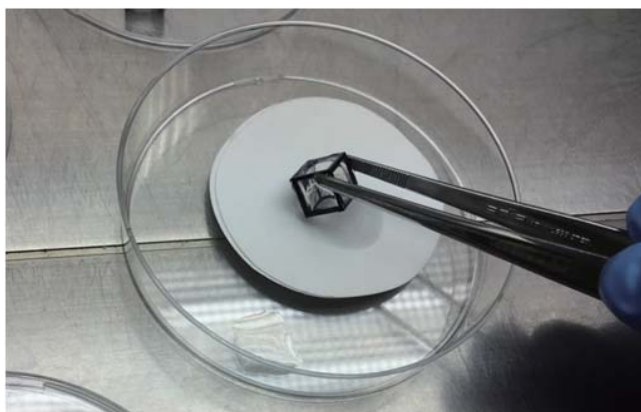
操 作	注意点・コツ
1) マトリゲルの調整は、コーニング(株)の操作方法を参考にして調製する。 2) マトリゲルの量は、実験するデバイスの大きさ・数に合わせて決める。 3) マトリゲルを冷蔵庫から取り出し、氷上で保管する。	



マトリゲルは氷上で保管する

【培養方法】

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) マトリゲルをデバイスの半分の高さまで添加する。

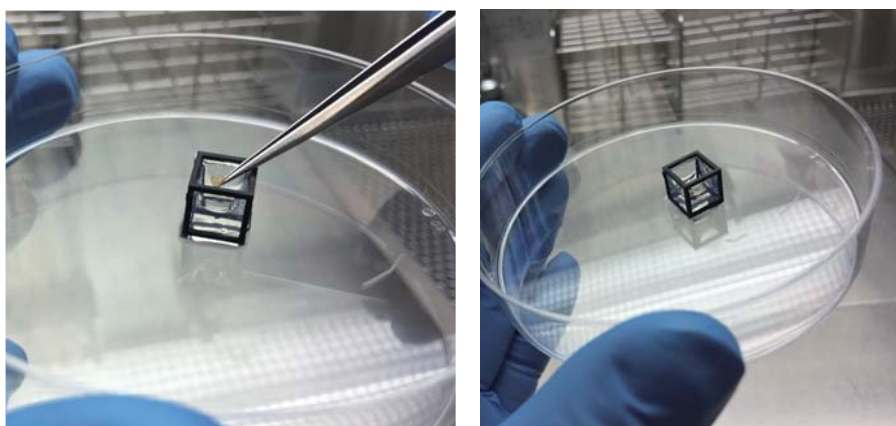


※この時、使用するピペットはあらかじめ先を切っておくと粘度の高いセルマトリックス溶液でも操作が容易になる。

※デバイスの内部までピペットの先端を入れ、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マトリゲルが固まるまで待つ。(約10分)

6) 固まった半分量のマトリゲルの中心に組織を入れる



7) チップで、残り半分のマトリゲルをデバイス上面のフレームの下部までに入れる。

8) シャーレに蓋をし、マトリゲルが固まるまで37℃、5%CO₂インキュベーターにて静置する。(約10分)

8) 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。

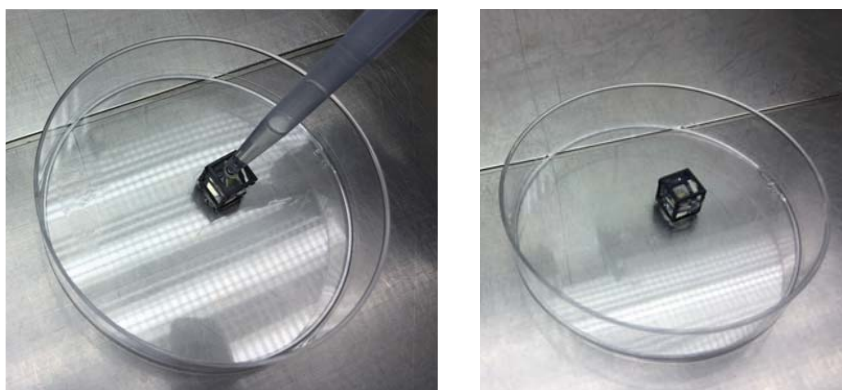
(より安全な方法として恒温器で加温する方法を薦める)

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。



- 9) ある程度マトリゲルが固まったら、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。



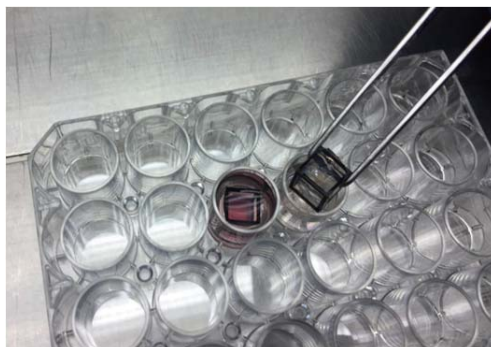
注意：
サポートゲルを滴下する前に、サポートゲルの温度が38℃以下まで冷めていることを確認してください。（細胞や組織への影響を抑えるため）

- 10) 24wellプレートにデバイス进行、乾燥防止の為、準備していた用培地をデバイス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）



デバイス上面をサポートゲルで覆う。

- 11) 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）



- 12) 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しての責任を負いかねますのでご了承下さい。