

# NanoCulture® Plate のご利用方法

2016年10月13日  
ORGANOGENIX 株式会社

## 目的：

本書は NanoCulture® Plate による 3次元（スフェロイド）培養を円滑に実施していただくため、使用のコツを纏めたものです。

## 培地：

- ・ 10%FBS を添加した基礎培地を推奨しています。
- ・ FBS は必ず非働化済みのものをお使いください。非働化していない FBS を使用した場合、血清中の成分の影響により、2次元化することがあります。
- ・ 抗生剤・抗真菌剤の添加は問題ありません。
- ・ お客様の培地で 2次元化する場合は、NanoCulture® Medium (NCM) をお試しください。NCM-M は基礎的な培地で、NCM-R は、より tight なスフェロイド作成に適しています。
- ・ 終濃度 1%前後のマトリゲル添加がスフェロイド形成に効果的である例もあります。  
[http://www.bdj.co.jp/pdf/matrigel/65-130-00\\_matrigel-application-note.pdf#search='BD scivax'](http://www.bdj.co.jp/pdf/matrigel/65-130-00_matrigel-application-note.pdf#search='BD scivax')
- ・ 10%FBS 濃度で 2次元化する際は、血清濃度を 1～20%で条件検討ください。
- ・ 無血清培地は 2次元化を亢進する可能性もありますので、ご使用の際はご注意ください。また、無血清培地ですと界面活性作用が低く、マイクロバブルを含めて気泡除去が困難となりますので、プレインキュベーションの際はご注意ください。

## プレインキュベーション：

- ・ NCP はプラスチック容器ですので培地の濡れ性が低く、正常にご利用いただくため下記操作をお願いします。
- ・ 目的は培地を well 淵までいきわたらせることと、インプリントパターン上に発生したマイクロバブルを除去するためです。
- ・ プレインキュベーションが不十分な場合は、well の一部分で 2次元化細胞が局在する現象が認められます。
- ・ 推奨プレインキュベーション方法；

- 培養培地を室温までもどします。
- 最終培養量の半量の培養培地を NCP の各 well に添加した後、1000xg で 3-5 分間遠心して well の淵に残る気泡を抜きます。  
(遠心機を利用しない場合は、底面のインプリントパターンにキズをつけないようピペッティングで注意深く気泡を除去します)
- 15-30 分間、室温または CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置します。

### 3 次元培養：

- 最終細胞播種数は 96-well の場合は 10,000 cells/well、24-well の場合は 60,000 cells/well が標準です。細胞により最適播種数は異なりますので条件検討ください。
- NCP スフェロイドは剥がれやすいため、培地交換は可能な限りマイルドに実施する必要があります。1 回の操作は 50%交換を推奨しています。
- 使用しない well は防湿シート (NUNC Cat#241205 など) を貼り、コンタミネーションから防御すれば、その後にご利用できます。
- 推奨培養方法；
  - 予備培養した細胞をトリプシン-EDTA 処理などで回収した後、培養培地に懸濁させて目標播種数の 2 倍濃度とします。
  - プレインキュベーション済みの NCP に、プレインキュベーション培地と同量の細胞懸濁液を播種後、10-15 分間ベンチ内で静置して、細胞を確実に NCP に接着させます。接着前に CO<sub>2</sub> インキュベータ内に移すと、移動時の振動や、インキュベーション時の培地対流によりスフェロイドの well 内形成位置に偏りができます。
  - 培養開始から 3 日前後でスフェロイドの形成が一般的な顕微鏡で確認できます。
  - 培地交換する場合は、培養量の 50%培地を吸引し、室温に戻した同量の培地を添加します。本操作は可能な限りマイルドに実施してください。

以上