

ReproNeuro 解凍播種および MEA 測定
取扱説明書

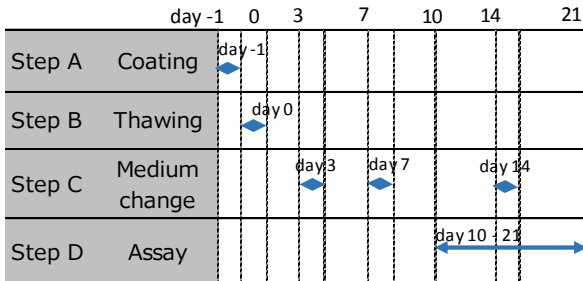
品番：RCDN001N,RCDN002N,RCDN003P

Ver1.1

実験操作の重要ポイント

- 凍結細胞バイアルは液体窒素で保管してください。
- 細胞を解凍する際は液体窒素保管容器から細胞を取り出した後、一度安全キャビネット内で蓋を 1/4 程開け、バイアル内部の圧力を解放してください。このとき、蓋は完全に開けきらないようにしてください。
- 細胞の解凍から培地への移行は 2 分以内、さらに播種までは 40 分以内に行なってください。操作に時間がかかると、生存率が著しく低下します。

Preparing	Thawing	Centrifugation	Seeding
	← 2min →		
		← 40min →	

MEA 測定用細胞培養スケジュール

表 1. 別途ご準備いただく試薬

名称	Catalog number	注意事項
ReproNeuro Culture Medium /ReproNeuro MQ Medium	ReproCELL, RCDN101 RCDN102	4°C 保管
ReproNeuro Coat	ReproCELL, RCDN201	4°C 保管
リン酸緩衝生理的食塩水	-	-

Penicillin/Streptomycin	Life Technologies Corporation (Gibco), Cat. 15140	4°C保管
DMEM/F12	SIGMA D6421	4°C保管
0.01% ポリ-L-リジン (PLL) 溶液	Sigma, Cat. P4832	4°C保管
MED64 メインアンプ	Cat. MED-A64MD1	-
MED64 ヘッドアンプ	Cat. MED-A64HE1	
MED 温度制御付コネクタ	Cat. MED-CP02H	
MED コネクタカバー	Cat. MED-CC01	
計測用 PC システム	Cat. MED-D0T	
Mobius Spike Sorter	Cat. MED-MS64MR1 2	
電極ディッシュ: MED プローブ	アルファメッドサイエンティフィック, Cat. MED-P515A	
直径 10 cm シャーレ	IWAKI, Cat. 36-3411	
クローニングリング	IWAKI, Cat. RING-05	

注1. ReproNeuro はドライシッパーにて輸送されます。製品を受け取りましたら可能な限り早く、凍結細胞バイアルを液体窒素保管容器に移してください。

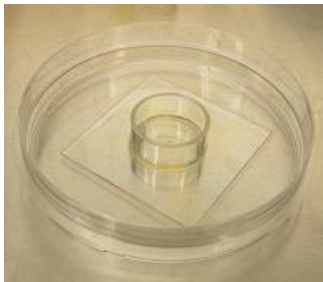
注2. クローニングリング [IWAKI, Cat. RING-05]はあらかじめオートクレーブ等で滅菌しておきます

* ReproNeuro Culture Medium の代わりに ReproNeuro MQ Medium (RCDN102)をお使い頂くことでより電位測定が安定化します。

1. MED プローブのコートニング (細胞播種前日)

MED プローブは使用前に、血清入りの培地 (DMEM などの汎用培地) を 1 mL 程度プローブ内に入れ、一晚 37℃でインキュベーションをお勧めします。その後、培地を除去し滅菌水で数回洗浄後コートニング作業にすすみます。

- 1.1. 下記のコートニング作業の前に付属の Coating Solution を 4℃冷蔵庫に移し、解凍します (約 2 時間)。
- 1.2. 0.01 % PLL 溶液の 3 倍希釈溶液(PBS) を 5 mL 準備します。
- 1.3. ステップ 1.2. で調製した PLL 溶液を直径 10 cm シャーレに入れた MED プローブ内に 500 μ L 加えます。



- 1.4. MED プローブの入ったシャーレを 37℃ CO₂ インキュベーターに移し、2 時間インキュベートします。
- 1.5. 新しい 15 mL チューブに 5 mL の PBS を加え、Coating Solution の全量 (150 μ L) を添加します。
- 1.6. MED プローブをインキュベーターから取り出し、PLL 溶液をウェルから取り除きます。
- 1.7. MED プローブに PBS を 1 mL 加え、取り除くことを 2 回繰り返します。
- 1.8. Coating solution 希釈溶液を 500 μ L 加え、37 °C CO₂ インキュベーターに移し、オーバーナイトでインキュベートします。

2. ReproNeuro Culture Medium (ReproNeuro MQ Medium)の調製

- 2.1. 520 μ L の Additive A を ReproNeuro Culture Medium または ReproNeuro MQ Medium に添加して調製します(以下 Culture Medium)。調製済みの培地は 4 °C で保管し、3 週間以内にご使用ください。再凍結はおこなわないでください。

3. 培地の加温

- 3.1. 15 mL チューブに DMEM/F12 培地を 10 mL 分注します (チューブ A)。
- 3.2. 50 mL チューブに、ステップ 2.1. で調製した Culture Medium を 20 mL 分注します (チューブ B)。
- 3.3. 37 °C のウォーターバスでチューブ A と B を 15 分以上、加温します。
- 3.4. チューブ A だけを安全キャビネット内に移し、すぐに操作ができるようにキャップを緩めて準備しておきます。マイクロピペット (p-1000) を安全キャビネット内に準備し目盛りを 1000 μ L にセットします。チップを使いやすい場所にセットしておきます。

注 2. 細胞の解凍は上記の準備がすべて終わってから始めるようにしてください。解凍操作に時間が掛かると細胞の生存率や状態が悪化します。

4. 細胞の解凍

- 4.1. 凍結細胞バイアル (以下、バイアル) を運ぶための容器 (以下、細胞運搬用容器) を準備し、液体窒素を適量入れておきます。
- 4.2. バイアルを液体窒素保管容器から取り出し、直ちに液体窒素の入った細胞運搬用容器に移し、安全キャビネットの近くまで持ってきます。
- 4.3. バイアルを安全キャビネット内に移し、蓋を 1/4 程度開け、バイアル内部の圧力を解放し、再度、蓋を閉め直します。
- 4.4. 直ちにバイアルをウォーターバスで加温します。バイアルを円を描くように揺すりながら 90 秒間加温し、その後、ウォーターバスから取り出し、急いで安全キャビネットに移します。

注 3. バイアルを安全キャビネット内に入れてからバイアルの蓋を閉め直すまで 1 分以内に実施してください。
注 4. 蓋は完全に開けきらないでください。蓋を開け切るとコンタミネーション等の原因になることがあります。
注 5. ウォーターバスで加温する時間は 90 秒を厳守してください。90 秒では半分程度解凍された状態です。時間超過により細胞が完全に解凍してしまうと細胞の生存率が著しく悪化しますのでご注意ください。

- 4.5. バイアルに付着した水滴をふき取った後に、バイアル内の細胞全量を、デカンタでチューブ A に素早く移します。

注 6. ステップ 4.4. から 4.5. まで 120 秒以内におこなってください。(ウォーターバス 90 秒、デカンタ 30 秒)

- 4.6. さらに、バイアルに残った細胞を回収するために、チューブ A の培地 1 mL を空になったバイアルに加えて、バイアルを洗い、チューブ A に戻します。

4.7. チューブ A を 400×g で 5 分間（室温）遠心します（遠心条件は厳守してください）。

4.8. 遠心している間にチューブ B をウォーターバスから安全キャビネットに移します。

4.9. 遠心が終了したらチューブ A を安全キャビネットに移します。細胞ペレットを吸引しないように培地上清をアスピレーターで注意深く取り除きます。

注 7. 細胞のペレットは目視しにくいので、吸い込まないように注意してください。

4.10. チューブ B から Culture Medium をチューブ A に 1 mL 移し、細胞ペレットを分散させるために目盛りを 1000 μL にセットしたマイクロピペット（p-1000）で 3 秒に 1 回の速度でマイルドに 4 回ピettingsします。

4.11. さらに、2 mL の Culture Medium を加え、約 1.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液を作ります。

注 8. 細胞の解凍から播種までの時間を最小化するために、敢えてセルカウントはしておりません。

5. 神経細胞播種（MED プローブ）

MED プローブ 1 枚あたりの神経細胞量と培地量

number of cells	cell volume	medium
1×10^5 cells	100 μL	1 mL

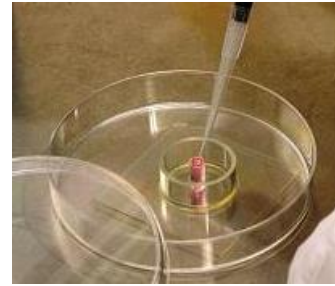
5.1. ステップ 4.11. で調製した細胞懸濁液をディスポーザブルピペット（5 mL）で 4 回、懸濁します。泡が出ないように、1 回 5 秒程度かけてゆっくりピettingsします。

5.2. あらかじめコーティングしておいた MED プローブをインキュベーターから取り出し、安全キャビネットに移します。

5.3. MED プローブ内のコーティング溶液をアスピレーターで取り除きます。

5.4. コーティング液を取り除いた MED プローブの中心にピンセットでクローニングリングを立てます。リングの設置面がなめらかであることを確認してください（MED プローブとの間に隙間があると細胞がもれ出してしまいます）。

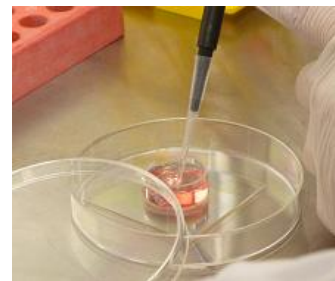
5.5. リングに細胞懸濁液を 100 μL 加えて、細胞を播種します。リングの上でチップ先端に液玉をつくるようにしてゆっくりと滴下して下さい。



細胞のリング内への播種密度は、約 $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/cm² です。

注 9. 0.5×10^6 cells/cm² 以下の密度では良好な電位結果を得ることが困難です。ご注意ください。

5.6. Culture Medium 1 mL を MED プローブ内のクローニングリングの周囲に静かに入れます。クローニングリングがずれたり倒れたりしないようご注意ください。



5.7. シャーレの蓋をして 37℃ 5% CO₂ インキュベーターに移して 1 時間静置します。

注 10. 細胞の解凍ステップ 4.1. から細胞播種ステップ 5.7. までを 40 分以内でおこなってください。

6. 培地交換

day 3, day 7, day 14 に培地交換をおこないます。培地交換は半量です。

6.1. 必要量の Culture Medium を 15 mL チューブに分注し、予め 37℃ のウォーターバスで 15 分以上加温し、安全キャビネットに移しておきます（MED プレート 1 枚あたり 1 mL 必要です）。

6.2. 37℃ 5% CO₂ インキュベーターから細胞を培養しているプレートを取り出し、安全キャビネットに移します。P1000 ピペットを使用して培地の半量弱（700 μL）を取り除きます。

6.3. P1000 ピペットを使用して、新しい培地 1 mL を、チップの先をウェルの壁に添わせるようにして、ゆっくりと加えてください。液の添加スピードの衝撃で細胞が剥がれることがあります。

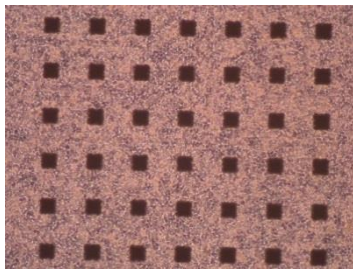
6.4. プレートを 37℃ 5% CO₂ インキュベーターに戻します。プレートを安全キャビネットから出す時間（ステップ 6.2. ~6.4.）は 15 分以内にして下さい。

解凍播種後の細胞の状態

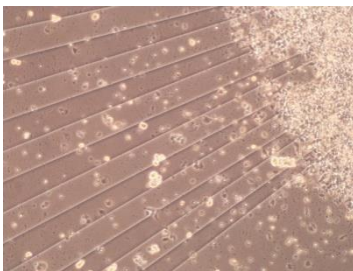
1. 播種直後

ほとんどの細胞がシングルセルです。細胞が電極上に密に接着しています。グリア細胞も丸い形状です。

電極中心



電極の周囲

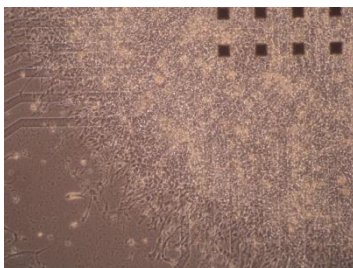


播種方法に問題がなければ播種後30分程度で接着し、24時間後には神経線維が伸長しはじめます。

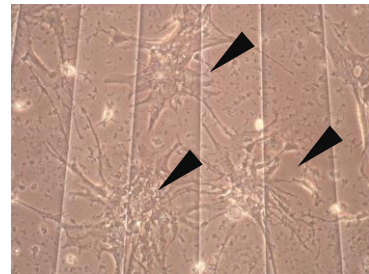
2. 播種3日後

3日後には神経線維が伸張している様子がほとんどの細胞で確認され、周囲にもアストロサイト様のグリア細胞が観察されます。

電極周囲



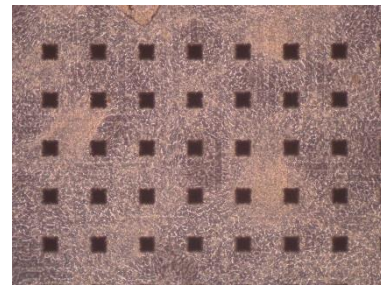
グリア細胞



3. 播種10~14日後

播種10日目ごろから測定が可能です。

14日目 電極中心



よくある質問

Q1. 解凍時間が 90 秒より長いとどうなりますか？

A1. ウォーターバス内で細胞が完全に解凍されると、生存率および生着率が著しく低下しますのでご注意ください。

Q2. ピペッティング後も細胞の凝集塊が多く認められますが、シングルセル
になるまでピペッティングを繰り返したほうがいいですか？

A2. 生存率および生着率が低下するため、ピペッティングを繰り返すことはお勧め致しません。凝集塊がありましても培養が可能です。

Q3. 細胞の遠心をアングルローターの遠心機で行ってもいいですか？

A3. 細胞のロスをふせぐために、遠心機はスウィングローターのものをお勧めします。

製品の使用について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また本品を当社からの許可なしに、第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

株式会社リプロセス

Website: <https://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com

指導、情報提供

東北工業大学 工学部 知能エレクトロニクス学科

鈴木郁朗 講師

協力

アルファメッドサイエンティフィック株式会社