

Corning® Elplasia® 12K フラスコ

使用方法

CORNING

はじめに

Corning Elplasia 12K フラスコは、T75 フラスコと同様のフットプリントで、1 cm² あたり 152 個のマイクロキャビティが配置されています。フラスコ底部はガス透過性ポリスチレンフィルムから成り、一つの培養条件下で容易に均一なスフェロイドを多量に形成できるよう設計されています。Corning 超低接着 (ULA) 表面、マイクロキャビティの丸みのある形状、そして重力により、同じ形と大きさのスフェロイドを約 12,000 個形成することができます。フラスコは滅菌済みですぐに使用できます。ダイバーター機能 (図 1) により、液体操作時のスフェロイドへの影響を最小限に抑えることができます。マイクロキャビティの独自の形状は、培地交換時にスフェロイドを定位置に維持することができ、回収時にスフェロイドを損なうこともありません。

細胞の種類、播種密度、目的の培養時間に応じて、細胞培養条件およびハンドリングの最適化が必要となります。ご使用前に本使用方法をよく読むことを強くお勧めします。



図 1. 矢印は Elplasia 12K フラスコにあるダイバーターを示す。

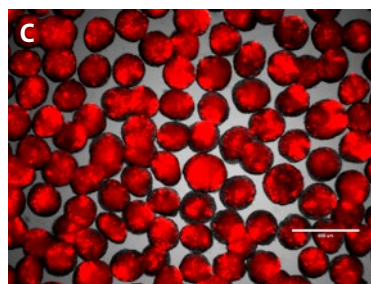
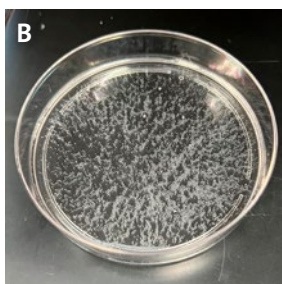
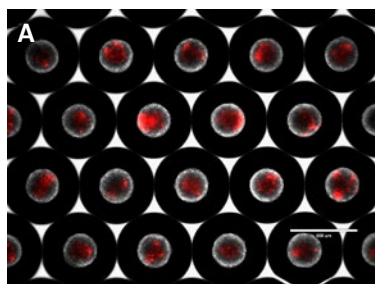
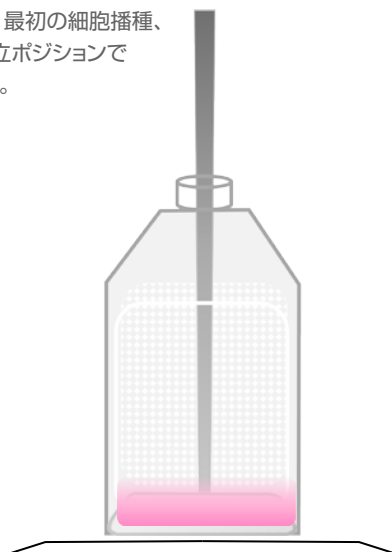


図 2. Elplasia 12K フラスコ中で 14 日間培養した HEK-293/RFP (RFP 発現ヒト胎児由来腎臓細胞、赤色で表示) スフェロイド (A)、および回収後の画像見本 (B および C)。顕微鏡写真は EVOS® FL 顕微鏡で倍率 2 倍の対物レンズを使用して撮影した。

Corning Elplasia 12K フラスコの使用ポジション

直立ポジション プレウェットイング、最初の細胞播種、およびスフェロイドの回収では、直立ポジションで Elplasia 12K フラスコを使用します。



培養ポジション 培養中、フラスコのハンドリングや移動、培地交換では、平坦な培養ポジションで Elplasia 12K フラスコを維持します。



必要なもの

- ▶ Corning® Elplasia® 12K フラスコ
- ▶ 湿潤剤（35%～70% エタノール水溶液）
- ▶ 細胞培養グレードの水
- ▶ 1X リン酸緩衝生理食塩水（PBS）
- ▶ シングルセル懸濁液
- ▶ 培地
- ▶ 70 μm セルストレーナー（推奨）

手順

マイクロキャビティ面のプレウェットニング

細胞懸濁液が各マイクロキャビティに確実に入るよう、マイクロキャビティ面をプレウェットしてから細胞を播種してください。このステップでは、0.2 μm 滅菌フィルターでろ過したエタノール（EtOH）溶液（細胞培養グレードの水で希釈した 35%～70% エタノール）を湿潤剤として使用することを推奨します。

1. 個別包装から Elplasia 12K フラスコを取り出し、バイオセーフティキャビネットの中にフラスコを置きます。オレンジ色の保護トレーは取り外します。
2. フラスコを直立ポジションに保ちながら、湿潤剤 5～10 mL（0.2 μm フィルターでろ過した 35% 以上の EtOH 溶液）をフラスコの底に添加します。
3. 湿潤剤を添加した後、フラスコをゆっくり倒して培養ポジションにし、湿潤剤がマイクロキャビティ面に完全に行きわたるようにします。
4. 湿潤剤がマイクロキャビティに自然に入るのを待ちます。湿潤剤がマイクロキャビティに入り込むにつれ、マイクロキャビティは透明になります。湿潤剤がマイクロキャビティに入らなかった場合、混入した気泡がマイクロキャビティ面に不透明領域として見えます（図 3）。マイクロキャビティに気泡が残っていると、懸濁液中の細胞がうまく落ちていかない可能性があります。

注：表面を完全に湿らせるためには、フラスコをゆっくり攪拌／回転させるか、フラスコ側面および端を軽くたたくと、うまくいく場合があります。湿潤剤を飛び散らせたり、マイクロキャビティ面の底を直接触ったりしないでください。また、湿潤剤をピペティングして、表面を湿らせることもできます。

5. フラスコを起こして直立ポジションにし、湿潤剤を吸引、除去します。
6. 細胞培養グレードの水 15 mL を添加後、フラスコを倒して培養ポジションにし、マイクロキャビティ面をすすぎます。フラスコをゆっくり攪拌／回転させて、水で表面を完全に覆うようすることで、マイクロキャビティに残留している湿潤剤を除去します。フラスコを起こして直立ポジションにし、液体を吸引、除去します。
7. 1X PBS を使用して、すすぎステップをさらに 2 回繰り返し、残留している微量の湿潤剤を除去します。
8. フラスコは、直ちに細胞を播種することも、細胞の播種の準備ができるまで、バイオセーフティキャビネットまたは細胞培養インキュベーターに一時的に保管することも可能です。

注：マイクロキャビティ面を乾燥させてしまった場合、ウェットニング手順を再度行ってください。

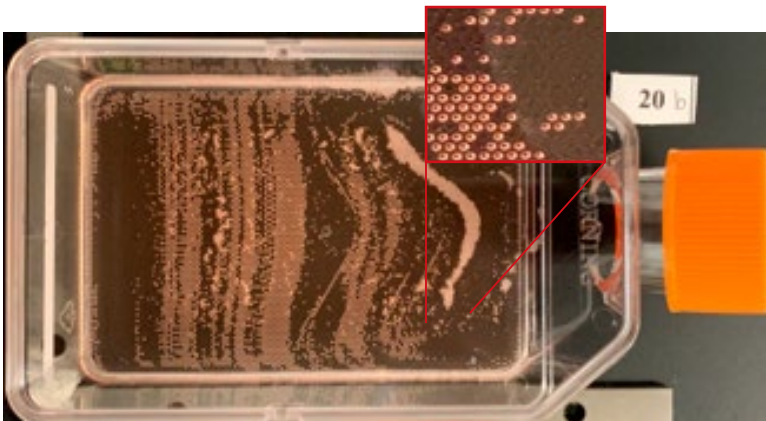


図 3. 培地を添加する前に表面を湿潤剤で処理しなかった場合に見られる、Elplasia 12K フラスコに混入した気泡（不透明領域）の例。

細胞播種

Corning® Elplasia® 12K フラスコの最適な播種密度は、細胞の種類、培養期間、および評価時の目的のスフェロイドサイズによって変わります。

1. 細胞懸濁液を細胞培養用の完全培地を用いて目的の播種密度で調製します（推奨播種量は 25 ~ 30 mL）。
 - マイクロキャビティ密度は 1 フラスコ当たりおよそ 12,160 個（80 cm² の培養面積で 1 cm² 当たり 152 個）です。例：マイクロキャビティ 1 個当たり 800 細胞を播種する場合には、合計 970 万個の細胞（細胞 800 個 x マイクロキャビティ 12,160 個）を使用します。
 - 播種前に細胞を 70 μm セルストレーナーに通してシングルセル懸濁液を準備します。
- 注：**融解後の細胞を直接フラスコに播種できます。
2. フラスコを直立ポジションにし、細胞懸濁液をフラスコの底に添加します。
3. フラスコを直立ポジションに保持しながら、フラスコを細胞培養インキュベーターに移します。
4. フラスコをインキュベーター内に置くときは、フラスコをゆっくり倒して培養ポジションにします。細胞懸濁液がマイクロキャビティ面に完全に行きわたるようにしてから、フラスコを軽く回転させて、細胞懸濁液が等しく分配されるようにします。液面がマイクロキャビティが配置されている基板を完全に覆い、フラスコのカントネックのすぐ下にくるようにしてください。これにより、すべての細胞がマイクロキャビティの中に入ります（図 4）。

注：移動や取り扱いを容易にするため、フラスコの積み重ねは 2 段までにしてください。また、スフェロイド形成を中断させないよう、播種後のフラスコは 24 時間以上静置した状態にしてください。

播種後はフラスコを培養ポジションに維持してください。容器を直立ポジションに動かすと、細胞やスフェロイドがマイクロキャビティから外れる場合があります。こうしたことは避けてください。容器を取り扱う際は液体の動きを最小限に抑えるよう注意を払ってください。



図 4. Elplasia 12K フラスコの培養ポジションでの推奨初期播種量 25 mL の培地によるマイクロキャビティ面の被覆状態。

培地交換

Elplasia 12K フラスコのマイクロキャビティは、やさしく取り扱いながら培地を交換できるような深さであり、また、必要なときにスフェロイドを回収しやすい深さに設計されています。培地交換時、スフェロイドを減らさないよう、フラスコを培養ポジションに保持することが重要です。カントネックおよびダイバーター機能により、培地交換の際の液流をおだやかにすることが可能です。ワーキングボリュームは 25 mL ~ 50 mL を推奨します。ただし、最適な最終容量は細胞の種類および培地交換スケジュールによって変わります。

培地交換では、フラスコの後部を 3 ~ 4 度の角度で持ち上げて、ダイバーターおよびカントネックの方に液体が流れるようにします。これにより、培地が完全に除去され、また、新しい培地をフラスコにゆっくりと流入させることができます。培地の吸引や注入の際に、培地がベントキャップから漏れ出ないように、持ち上げ角度を 10 度以下に抑えることが重要です。移動時にフラスコに取り付けるオレンジ色の保護トレー、または同等の高さ（6.35 mm）のアイテムを使用して、培地交換の際に、フラスコの後部を 3 ~ 4 度の推奨角度で持ち上げることができます。

1. フラスコを培養ポジションに保持しながら、フラスコをバイオセーフティキャビネット内に移し、ベントキャップを緩めます。
2. 推奨角度の位置にするには、フラスコの後部をわずかに持ち上げるか、またはフラスコの後部の下にオレンジ色の保護トレー、50 mL 遠心チューブのキャップ、またはピペットなどを置くことで、3 ~ 4 度の持ち上げ角度が得られます（10 度を超過して持ち上げないでください）。
 - オレンジ色の保護トレーを使用する場合は、オレンジ色の保護トレーの端を、フラスコの底にある積み重ね用くぼみと位置合わせすることを推奨します（図 5）。
3. 使用済みの培地を除去するには、ピペット先端を（図 6 のように）ダイバーターに突き当てて、培地の吸引を開始します。
4. 培地を注入するには、ピペット先端をダイバーターに突き当てて（図 6）、新鮮な培地をフラスコにゆっくりと添加します。
5. 培地交換が完了したら、傾斜をつけるために使用していたアイテムをゆっくりと取り外して、フラスコを平坦な培養ポジションにし、ベントキャップを閉めて、元の細胞培養インキュベーターに移します。

注：移動中、フラスコは培養ポジションで保ってください。容器を直立ポジションに動かすと、スフェロイドがマイクロキャビティから外れる場合があります。

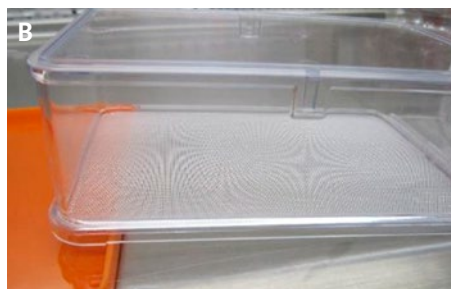


図 5. Corning® Elplasia® 12K フラスコの底にある積み重ね用くぼみ (A、矢印) を、オレンジ色の保護トレーの端と位置合わせした推奨例。これにより、培地交換時にフラスコの後部を推奨角度で持ち上げ、固定することができる (B)。

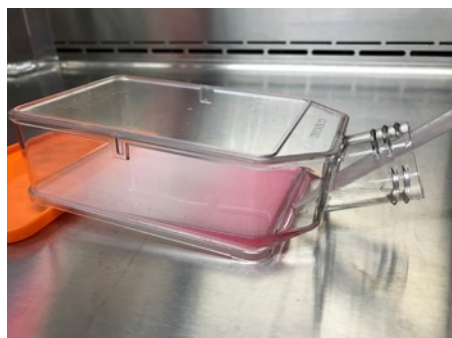


図 6. 培地交換時のピペット先端の推奨位置。

スフェロイドの回収

回収量は目的の最終濃度および最終的な用途によって変わります。回収には、最低でも 15 mL の 1X PBS の使用を推奨します。ただし、培地を使用することもできます。

1. 培地交換の項で説明したように、Elplasia 12K フラスコから使用済みの培地を除去します。
2. 回収液 15 mL を添加して、フラスコをゆっくりと傾けたり、軽くたたいたりして、マイクロキャビティからスフェロイドを外します。
3. フラスコを直立ポジションにし、スフェロイドを分離させ、スフェロイドがマイクロキャビティに再び入らないようにします。スフェロイド懸濁液を回収し、別の容器に移すことができます。
 - すべてのスフェロイドを回収するために、新たな回収液でマイクロキャビティ面をさらにすすぐ必要がある場合もあります。回収液を培養面に沿って (ワイパーのように) 前後に動かして、スフェロイドをすすぎ落とすことを推奨します。

フラスコ中でのスフェロイドの解離

スフェロイドの使用アプリケーションに応じて、上述したように Elplasia 12K フラスコからスフェロイドを回収する他に、フラスコ内で直接シングルセルに単離させることも可能です。

1. 培地交換の項で説明したように、使用済みの培地を除去し、15 mL の 1X PBS に置き換えます。
 - 微量の培地を除去するには、1X PBS で 2 回すすぐ必要がある場合もあります。
2. フラスコを培養ポジションに保持しながら、緩衝液を除去し、次いで解離用試薬を 5 ~ 10 mL 添加します。解離液がマイクロキャビティ面に完全に行きわたるようにしてから、フラスコを軽く回転させます。
3. スフェロイドの解離用試薬プロトコールに従って、スフェロイドをインキュベートします。
 - 解離の準備が整ったときには、スフェロイドは大きく見え、形状が失われます (図 7)。
4. フラスコを直立ポジションにし、スフェロイドを分離させます。懸濁液のピペッティングを数回繰り返して、スフェロイドを解離させます。
5. 解離液を等量の血清含有培地で反応停止 / 希釈し、次いで細胞懸濁液を別の回収容器に移します。
 - さらにマイクロキャビティ面をすすいで、すべてを回収する必要がある場合もあります。解離液を培養面に沿って (ワイパーのように) 前後に動かして、表面を完全にすすぐことを推奨します。
6. 確実にシングルセル懸濁液を得るために、細胞を 70 µm セルストレーナーに通します。

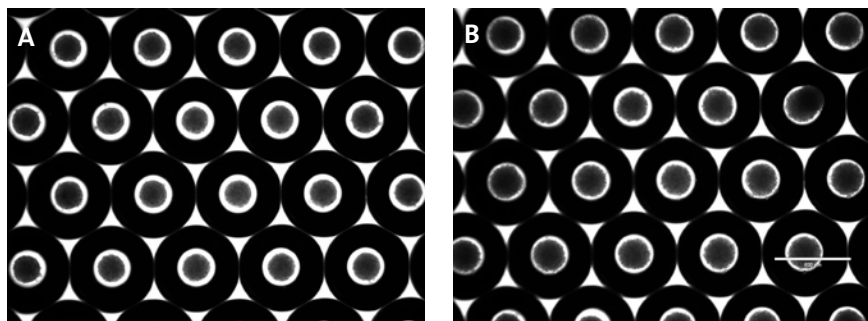


図 7. 解離処理前 (A) およびトリプシン / EDTA 溶液で 10 分間処理した後 (B) の Corning® Elplasia® 12K フラスコ中で 7 日間培養した HT-29/GFP (ヒト結腸がん) スフェロイド。画像は対物レンズ 2 倍の EVOS FL 顕微鏡で撮影した。

仕様

1 フラスコ当たりのおおよそのマイクロキャビティ数	12,160
培養表面積	80 cm ²
マイクロキャビティの寸法 (直径 x 深さ)	850 x 650 μm
マイクロキャビティのスフェロイド [®] ワーキングサイズ (直径 x 深さ)	500 x 600 μm
推奨プレウェット量	5 ~ 10 mL
推奨播種量	25 ~ 30 mL
推奨培地交換 / 使用量	25 ~ 50 mL

製品情報

カタログ番号	仕様	フラスコ当たりの スフェロイド数	マイクロキャビティサイズ (直径 / 深さ) (μm)	包装	1 ケース
4537	Corning Elplasia 12K フラスコ ラウンドボトム 超低接着表面	12,000	850 x 650	個別包装	5

CORNING

Corning Incorporated Life Sciences

836 North St.
Building 300, Suite 3401
Tewksbury, MA 01876
t 800.492.1110
t 978.442.2200
f 978.442.2476

www.corning.com/lifesciences

アジア太平洋

オーストラリア/ ニュージーランド

t 61 427286832

中国本土

t 86 21 3338 4338

f 86 21 3338 4300

インド

t 91 124 4604000

f 91 124 4604099

日本

t 81 3-3586 1996

f 81 3-3586 1291

韓国

t 82 2-796-9500

f 82 2-796-9300

シンガポール

t 65 6572-9740

f 65 6735-2913

台湾

t 886 2-2716-0338

f 886 2-2516-7500

ヨーロッパ

CSEurope@corning.com

フランス

t 0800 916 882

f 0800 918 636

ドイツ

t 0800 101 1153

f 0800 101 2427

オランダ

t 020 655 79 28

f 020 659 76 73

英国

t 0800 376 8660

f 0800 279 1117

その他ヨーロッパ諸国

t +31 (0) 206 59 60 51

f +31 (0) 206 59 76 73

中南米

grupoLA@corning.com

ブラジル

t 55 (11) 3089-7400

メキシコ

t (52-81) 8158-8400

詳しい製品情報または技術情報については、www.corning.com/lifesciences をご覧いただくか、
または 800.492.1110 までお問い合わせください。米国以外の地域では、+1.978.442.2200 に
お問い合わせいただくか、最寄りのコーニングの営業所にご連絡ください。