

CORNING® CELL-TAK™ CELL AND TISSUE ADHESIVE

Catalog No. 354240, 354241

Lot No. _____

Instructions for Use

本製品は基質上に細胞や組織を接着させる研究用試薬です。診断または治療用途には使用しないでください。また、*in vivo* 用途にも使用しないでください。コーニングライフサイエンスは、本製品の臨床または診断用途でのいかなるパフォーマンスについても保証しません。

Discovery Labware, Inc., Two Oak Park, Bedford, MA 01730, Tel: 1.978.442.2200 (U.S.)
CLSTechServ@Corning.com www.corning.com/lifesciences

CORNING

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks
© 2013 Corning Incorporated

目次

CORNING® セルタックについて	3
製品規格	3
コート方法	3
ハンスプレッド法	3
吸着法	4
基本の吸着法	4
各種コート法	5
培養用ディッシュ、フラスコ、ガラススライド、カバースリップ用の吸着法	5
コート方法	6
ブラッドスメア法	6
マルチウェルプレートのコート方法	7
パーミアブルサポート（セルカルチャーインサート）のコート方法	7
細胞や組織の固定	7
細胞の播種方法	7
組織切片の固定	8
参考文献	8

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks

© 2013 Corning Incorporated

CORNING® セルタックについて

Corning セルタックは独自に処方されたタンパク質溶液で、細胞や組織を固定するためのコーティングに用います。以下のような多くの *in vitro* 実験での生物由来材料の取り扱いを簡便にします：

- 初代培養
- *In situ* ハイブリダイゼーション
- イムノアッセイ
- マイクロインジェクション
- 免疫組織化学

Corning セルタックはガラスやプラスチック、金属など様々な素材に容易にコートできます。そのコーティングは透明で、2～8℃で10～14日間安定です。

Corning セルタックの成分は、海洋性のムラサキガイ (*Mytilus edulis*) から抽出したポリフェノールタンパク質です¹。この種のタンパク質は、自然界で貝が自身を固形物に繋ぎとめるために分泌する粘着物の主成分で、類似したアミノ酸配列から成る10ペプチドのユニットが縦列反復してできています²。

製品規格

成分*： _____ mg/mL in 5% 酢酸

包装形態： ポリプロピレンバイアル (1 mg または 5 mg 入り)

保管： 2～8℃で保管。コート済みの容器は2～8℃でおよそ2週間保管可能。

有効期限*：

*ロットごとに発行する品質保証書に記載しています。

コート方法

Corning セルタックには、主にハンドスプレッド法と吸着法の2つのコート方法があります。一般的には、より均質で簡便な方法であることから吸着法を推奨しており、ハンドスプレッド法は特別な場合に使用します。

ハンドスプレッド法

Corning セルタックをガラス棒やマイクロピペッター用のチップを用いてガラスやプラスチックに沈着させます。5%酢酸で調製したセルタックをマイクロリットル単位で薄い膜状に広げ、酢酸が蒸発すると、表面にセルタックが残ります。エタノールや水で洗えば、すぐに使用できます。

ハンドスプレッド法は吸着法に比較すると均一性では劣りますが、ディッシュやガラススライドの一部だけをコートする場合などには便利です。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks

© 2013 Corning Incorporated

吸着法

Corning® セルタックの最も簡単かつコスト効率のよいコート方法は中性溶液での吸着で、この方法は、pHの上昇に伴いセルタックが溶出し、触れた面に吸着するという現象に基づいています。でき上がったコーティングはタンパク質の単層膜のように非常に薄く、ハンドスプレッド法と比較してより均一です。

吸着法の主な利点は次のような点です：

- どのような形の容器でも簡単にコートできます。
- 表面積 (cm²) 当たりのセルタックの必要量を減らすことができます。
- 初期濃度や吸着時間を実験方法に応じて最適化できます。

吸着法を行う際は、下記の点に注意してください。：

1. pHが変わるとすぐに吸着が始まりますので、Corning セルタックを中性バッファーで希釈した後は、10分以内にコートしてください。
2. Corning セルタックの最適な保管条件は5%酢酸中、2～8℃です。使用時のみ原液を希釈してください。水で希釈した場合は当日中に使用し、中性バッファーで希釈した場合はすぐに使用してください。
3. pHは吸着を左右する最も重要な値で、6.5～8.0が最適です。セルタックの中性化には大概のバッファーを使用できますが、重炭酸ナトリウムが最適です。必要であれば、セルタックの半量相当の1N NaOHを中性化バッファーと合わせて加えると、pHが中性になります。
4. 中性化バッファーが付着したピペットなどで、中性化バッファーがCorning セルタックのストック溶液に混じらないようにしてください。ストック溶液に何かが入るとCorning セルタックが保存用バイアルの表面に沈着して、製品をロスする結果となります。

基本の吸着法

後述の各種の容器や器材のコーティングの詳細な方法を参照する前に、下記の注記に目を通してください。

1. 中性バッファーを調製します。無菌的にコートするときは0.1 M 重炭酸ナトリウム (pH 8.0) を推奨します。バッファーはフィルター滅菌してください。
2. 必要な Corning セルタックの量を算出します。コートする容器の大きさと数から総面積を計算してください。Corning セルタックの最適濃度は細胞やアプリケーションにより異なりますので、適した濃度を定めるために用量反応実験を推奨します。もしくは3.5 µg/cm² から検討を始めてみてください。パフォーマンスを上げるために濃度を高くする必要はなく、実験で「効果のある最低限の濃度」を決めるようにしてください。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks
© 2013 Corning Incorporated

3. Corning® セルタックを中性化し、容器に入れます。バッファーの量はコートする容器に依存します。適正量の Corning セルタックをバッファーに加えてしっかり混合し、10 分以内に使用してください。

注記：コーティングバッファーの pH が 6.5 ～ 8.0 の範囲外の場合、セルタックが十分に働かないことがあります。この pH の範囲内に収まるようにするには、中性バッファーと併せてセルタックの半量相当の 1N NaOH を使用してください。例：10 μL セルタック 2 ～ 85 μL 炭酸水素ナトリウム (pH 8.0) と 5 μL 1N NaOH (コートの直前に加える) を用いて 300 μL のセルタック溶液を調製します。

4. インキュベーションして吸着させます。最低 20 分のインキュベーションを推奨します。インキュベーション時間が長くなり、全ての液体が蒸発したとしても、吸着に影響はありません。Corning セルタックを振り捨てるか、吸引してから、重炭酸ナトリウムを除くために滅菌水で洗います。後で使用する場合は、容器を乾燥させます。2 ～ 8℃では 2 週間、デシケーターを使えば 4 週間ほど保管できます。

各種コート法

培養用ディッシュ、フラスコ、ガラススライド、カバースリップ用の吸着法

留意点：

1. 希釈や容器への添加はラミナーフローフードの中で行い、無菌的にコートします。容器は覆いをしてベンチに置き、吸着を行います。Corning セルタックは 37℃あるいは室温で効率よく吸着します。
2. 最低限の容量を加えて吸着を促進します。容器の底面を覆う必要十分量を用いてください。容器の底面が平らになっているかを確認してください。
3. フラスコやディッシュにバッファーを入れ、そこに Corning セルタックを直接加えます。2 種の溶液をよく混ぜることと、Corning セルタックのストックバイアルにチップを入れるときは、チップを新しいものに交換することを忘れないようにしてください。
4. ディッシュの直径ではなく、培養面積で計算して試薬の無駄を減らしてください。Falcon® プラスチック製品とその培養面積は以下の通りです。

容器	培養面積 (cm ²)
ディッシュ	
35mm	9.6
60mm	21.3
100mm	58.1
マルチウェルプレート	
6 ウェル	9.6
12 ウェル	3.8
24 ウェル	1.9
48 ウェル	0.75
96 ウェル	0.32

容器	培養面積 (cm ²)
セルカルチャーインサート	
6 ウェル	4.2
12 ウェル	0.9
24 ウェル	0.3
フラスコ	
T-25	25
T-75	75
T-150	150
T-175	175
T-225	225

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks

© 2013 Corning Incorporated

A. コート方法 - フラスコ、ディッシュ、カバースリップ、スライドグラス

1. コートする面積を計算して Corning® セルタックの必要量を算出します。
2. 容器の底面を覆うのに必要なバッファー量を決めます。
3. フラスコの場合：フラスコに滅菌したバッファーを行き渡らせ、適量の Corning セルタックを加えてよく混ぜます。チップの中性化バッファーが Corning セルタックのバイアルに混入すると、Corning セルタックがバイアルに吸着してしまうので注意してください。
4. ディッシュの場合：バッファーと Corning セルタックをチューブの中で混合し、適量をそれぞれのディッシュに行き渡させます。
5. カバースリップの場合：スライドあるいはカバースリップをディッシュの底面に並べ、中性化した Corning セルタックで覆います。スメア法でもコーティングが可能で、次に紹介しています。
6. 20 分以上置いて吸着させます。
7. Corning セルタック溶液を振り捨てるか、もしくは吸引して、滅菌水で 2 回すすぎます。
8. 保管する場合は、乾かしてから 2 ~ 8°C に保管します。

ブラッドスメア法 (別法)

1. この方法では中性化した 20 μL の Corning セルタックをスライドやカバースリップに広げます。
2. コートするスライドあるいはカバースリップの数を決めます。この時、汚れや脂が付いていないか確認してください。1 枚当たり 20 μL または以前に実験で定めた量の Corning セルタックをコートしていきます。
3. 適量の Corning セルタックをチューブに分注し、1/4 容量の **2M Sodium Carbonate** (炭酸ナトリウム) を加えて中性にします。使用する容量が少ないため、0.1M Sodium Bicarbonate (重炭酸ナトリウム) の代わりに 2M Sodium Carbonate (炭酸ナトリウム) を使用します。混ぜた時に泡が出ますので、大きめのチューブを使用してください。Corning セルタックの原液に 2-3% のイソプロパノールを加えると表面張力が減り、ガラススライドやカバースリップを覆いやすくなります。
4. スライドガラスの中央に中性化した Corning セルタックを 20 μL 乗せコートします。コート液は血液塗抹標本を作るときと同様に、別のスライドガラスの短い方の辺を 45 度の角度で当てて均一に広げます。2 枚目以降のスライドガラスも同じようにコートしてください。カバースリップは、中性化した Corning セルタックを滴下した後上からもう一枚のカバースリップを乗せて、2 枚のカバースリップ間に溶液を広げます。カバースリップ同士を滑らせてずらし、2 枚を分けます。
5. ガラススライドもしくはカバースリップを風乾します。溶液は室温で 5 分以内には蒸発します。滅菌水でガラススライドやカバースリップをリンスしてください。
6. コートしたガラススライドもしくはカバースリップをすぐに使用する場合は、滅菌水でリンスしたら細胞や組織を乗せることができます。風乾した後は 2 ~ 8°C で保存可能です。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks
© 2013 Corning Incorporated

B. マルチウェルプレートのコート方法

1. コートする面積を計算して Corning® セルタックの必要量を算出します。
2. 容器の底面を覆うのに必要なバッファー量を決めます。
3. 大きなウェルのプレートの場合、チューブの中でバッファーと Corning セルタックを混合して各ウェルに加えます。
4. 48 ウェルや 96 ウェルのように小さなウェルのプレートの場合、必要量の Corning セルタックに水を加えて調製したコート液を各ウェルに 10 μ L 入れ、そこに少なくとも 20 μ L の重炭酸塩バッファーを加えます。
5. 20 分以上置いて吸着させます。
6. Corning セルタック溶液を振り捨てるか、吸引して、滅菌水ですすぎます。
7. 保管する場合は、乾かしてから 2 ~ 8°C に保管します。

C. パーミアブルサポート（セルカルチャーインサート）のコート方法

1. コートする面積を計算して Corning セルタックの必要量を算出します。インサートには様々なサイズがありますので、正確な面積を計算するようにしてください。
2. 容器の底面を覆うのに必要なバッファー量を決めます。
3. バッファーと Corning セルタックをチューブの中で混合し、適量をそれぞれのインサートに加えます。
4. 20 分以上置いて吸着させます。
5. Corning セルタック溶液を吸引して、滅菌水ですすぎます。
6. 保管する場合は、風乾後に 2 ~ 8°C で保管します。

細胞や組織の固定

細胞の播種方法

接着細胞、非接着細胞共に Corning セルタックでコートした表面に接触すると接着します。

実際には細胞が生きている必要はなく、固定した細胞も、酵母やバクテリアのような微生物同様に接着させることができます。脂肪細胞や HL-60 のような細胞や、なかなか沈降してこない微生物では、時折接着に問題が見られることがあります。このような場合は培地量を減らして、容器の底をちょうど覆うように播種してください。もしそれでも改善が見られない場合は、遠心してコートした表面に落としてください。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks
© 2013 Corning Incorporated

細胞は血清入り培地で培養している場合、Corning® セルタックをコートした容器を培地で前処理しないでください。血清タンパク質が接着部位をブロックしてしまいます。細胞の接着を促進するには、無血清培地をお試しください。細胞の接着後は、すぐに血清入り培地に交換してください。

非接着細胞は Corning セルタックでコートした表面にすぐに接着しますが、数時間で剥がれ始めることがあります。剥がれの原因は、細胞膜タンパク質の代謝回転や細胞増殖によるものと考えられます。ハイブリドーマなどの非接着細胞は Corning セルタック上で培養してもコロニー形成はしません。

組織切片の固定

凍結切片やパラフィン切片を Corning セルタックをコートしたスライドガラスに置きます。切片を乗せたらペーパータオルで余計な水分を除き、スライドガラスを 45°C に温めた台に最低 1 時間おきます。その後目的に応じて処理します。

参考文献

1. Waite, J.H. and M.L. Tanzer (1981) Science, **212**:1038-1040.
2. Waite, J.H. (1983) Journal of Biological Chemistry, **258**:2911-2915.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks
© 2013 Corning Incorporated