

Corning® PuraMatrix™ ペプチドハイドロゲル

Catalog No. 354250

ユーザーガイド

本製品は研究用器材です。臨床、診断または治療の目的には使用しないでください。また、人体には使用しないでください。

CORNING

目 次

用途	3
製品内容	4
本製品には含まれていない必要材料	4
注意事項	4
概説	4
使用方法	5
A) セルカルチャープレートでの平面培養	5
B) セルカルチャーインサートでの平面培養	5
C) Corning® PuraMatrix™ に添加する ECM の調製	6
D) セルカルチャープレートでの 3D 細胞包埋培養 (ECM タンパク質添加 / 無添加)	7
G) 継代培養または生化学分析に使用する細胞の回収	10
H) Corning® PuraMatrix™ で培養したサンプルの蛍光染色法	10
I) 細胞や生物活性分子の <i>in vivo</i> デリバリーに関するヒント	11
安定性	12

用途

Corning® PuraMatrix™ ペプチドハイドロゲル (Corning® PuraMatrix™) は、様々な細胞培養実験において 3 次元 (3D) のマイクロ環境を作ることができる合成マトリックスです。細胞の最適な成長と分化を得るには、本製品と生物活性分子 (例: 成長因子、細胞外マトリックス (ECM) タンパク質、および / または他の分子) の適切な混合比を決定する必要があります。

Corning® PuraMatrix™ は、精製合成ペプチドの 1% (w/v) 溶液です。生理学的条件下では、Corning® PuraMatrix™ のペプチド成分が自己組織化し、ポアサイズが平均 50 ~ 200 nm の微小な繊維構造を持った 3D ハイドロゲルを形成します。このハイドロゲルは、セルカルチャーディッシュ、マルチウェルプレート、あるいはセルカルチャーインサートで簡単に形成できます。

Corning® PuraMatrix™ は簡単な 2 次元 (2D) 培養を行えるだけでなく、細胞の 3D 培養も行える利点があります。Corning® PuraMatrix™ の表面に細胞を播種すると、様々な細胞が適切な 3 次元形態をとることから、細胞の包埋培養やサンドウィッチ培養システムと比較して、3D *in vivo* モデルシステムの構築に必要な手順を簡略化できます。2D で培養した細胞と比較して、3D 構造を形成した細胞は、生体内の同じ細胞に非常に良く似ているという研究結果が報告されています。Corning® PuraMatrix™ は、*in vivo* 環境に似た 3D 微小環境を形成し、ハイスループットを目的としたアッセイの質的な向上に役立つと期待されます。

Corning® PuraMatrix™ は、肝前駆細胞¹、ラット褐色細胞腫 (PC12)²、海馬神経細胞³ の分化を促し、内皮細胞のチューブ形成⁴ を補助することが示されています。また、様々な初代培養細胞 (例: 神経細胞、線維芽細胞、角化細胞) や形質転

換細胞^{5,6} (例: MG-63、SH-SY5Y、HEK293、NIH3T3) の接着を促すことも示されています。さらに、幹細胞増殖、細胞分化、癌細胞の転移、組織再生の *in vivo* 分析などにも応用が期待できます。Corning® PuraMatrix™ は、生体適合性、生体吸収性があり、動物由来の材料や病原体を全く含んでいません。動物を使った *in vivo* 研究の場合、この可溶性材料を体内に注入して生理学的条件下に置くと 3D ハイドロゲルを形成します。

参考文献

1. Semino, C.E., et al., *Differentiation* 71:262 (2003).
2. Holmes, T.C., et al., *PNAS USA* 97:6728 (2000).
3. Semino, C.E., et al., *Tissue Engineering* 10:643 (2004).
4. Narmoneva, D., et al., *Biomaterials* 26:4837 (2005).
5. Zhang, S., et al., *Biomaterials* 16:1385 (1995).
6. Thonhoff, J.R., et al., *Brain Research* 1187:42 (2008).

追加情報に関しては、CLSJP@corning.com までお問い合わせください。

製品内容

- Corning® PuraMatrix™ (カタログ番号 354250) は、精製合成ペプチドの 1% 溶液 (w/v) で、5 mL 入りのバイアル (1 本) です。

本製品には含まれていない必要材料

- 細胞用の培地
- 蒸留水 (dH₂O) に溶解し、滅菌フィルターを通した 20% スクロース溶液 (滅菌水で希釈して 10% スクロース溶液を調製)
- ECM、成長因子、サイトカイン
- Falcon® セルカルチャーインサート、Falcon® セルカルチャープレート
- Corning Life Sciences から入手できる製品に関しては、WEB サイトをご覧ください

Corning® PuraMatrix™ を使用して最適な結果を得るためのヒント

注意事項

- **ゲル化**：本製品は、1 mM 以上の塩濃度でゲル化するため、ゲル化には塩を含んだ緩衝液や培地を使用します。したがって、ゲル化が必要になるまで Corning® PuraMatrix™ と塩を含んだ緩衝液や培地とを、混合しないでください。一旦ゲルが形成された後に、混合を行うと、ハイドロゲルの構造を破壊することになります。
- **粘度**：Corning® PuraMatrix™ 原液 (1% w/v) を使用する際には必ず、ボルテックスミキサーで攪拌するか超音波浴槽で 30 分間超音波処理を行なって、粘度を下げてください。気泡が見られる場合には、溶液を 1.5 mL マイクロチューブに分注して最高速で遠心してください。
- **pH およびモル浸透圧濃度**：Corning® PuraMatrix™ の pH は 2 ~ 2.5 なので、細胞の包埋培養実験を行なう場合には、培地を加えるまでの、細胞が原液に触れている時間をできるだけ短くするように素早く作業を行なってください。細胞懸濁液と Corning® PuraMatrix™ に等浸透圧のスクロース溶液を加えると、組織培養培地で pH が細胞の適正值になるまでの間、細胞を保護することができます。詳細はパート D とパート E (細胞の包埋培養プロトコール) を参照してください。
- **取り扱い**：
 - Corning® PuraMatrix™ は比較的柔らかい線維マトリックスを形成するため、培地の交換を行なう際には非常に慎重な取り扱いが必要です。ハイドロゲル上部から培地を取り除く際にアスピレーターを使用しないでください。ハイドロゲルには直接触れないでください。
 - サンプルに培地や他の材料を加える際には、ピペットチップの先端を培養容器の壁の上縁に当てて注いでください。
 - 表面積の大きい培養容器 (例：35 mm 以上のディッシュ) を使用する場合には、液体を取り扱う際にハイドロゲルを破壊しないように細心の注意を払って行なってください。

概説

- 使用する Falcon® セルカルチャーインサートまたはマルチウェルプレートに最適な液量に関しては、12 ページの表を参照してください。
- Corning® PuraMatrix™ は、未希釈の 1% (w/v) の濃度でも使用でき、また使用方法に記載されているように希釈した状態でも使用できます。0.5% 以下の濃度は、多くのアプリケーションに適切です。例えば、ほとんどの細胞の播種には 0.25%、神経細胞や内皮細胞の包埋培養には最終濃度 0.15% をお勧めします。
- ハイドロゲルに ECM、成長因子、あるいは他の生物活性分子を加える際には、パート C (ECM 添加プロトコール) を参照してください。
- 細胞培養に無血清培地を使用する場合には、トリプシン処理による細胞剥離の後、トリプシンの不活性化が必要な場合があります。

重要：細胞の最適な成長と分化を得るには、本製品と生物活性分子 (例：成長因子、ECM タンパク質、および / または他の分子) の適切な混合比を決定する必要があります。一般的に、ほとんどの用途で、成長因子はハイドロゲルに包埋培養するよりも培地に加える方が望ましいとされています。

使用方法

A) セルカルチャープレートでの平面培養

留意：Corning® PuraMatrix™ の表面に播種した多くの細胞タイプは、期待通りの適切な 3 次元構造を取ります（例：肝細胞スフェロイド、胚性幹細胞コロニー、胚様体、神経細胞の分岐）。2D 培養法は、あらゆる種類の細胞の形態学的特性および機能的特性スクリューニングに理想的な方法です。

Corning® PuraMatrix™ の調製とゲル形成

1. 概説のように、ボルテックスミキサーか超音波処理を用いて Corning® PuraMatrix™ 原液（1% w/v）の粘度を下げます。原液を滅菌水で希釈して、適切な液量をマイクロチューブ中で調製します。
2. 滅菌水で希釈して、希望する濃度の Corning® PuraMatrix™ を十分な液量調製します（例：24 ウェルプレートには 250 μL 、96 ウェルプレートには 50 μL ）。各ウェルの表面に慎重にゆっくりと培地を添加することによって、ゲル化を開始させます（例：24 ウェルプレートには 500 μL 、96 ウェルプレートには 100 μL ）。
3. プレートをインキュベーター内に 30 ~ 60 分置き、Corning® PuraMatrix™ のゲル化を完了させます。ハイドロゲルの濃度が高い場合には 30 分で十分です。0.15 ~ 0.25% のハイドロゲルに対しては 1 時間が適切です。ハイドロゲルが形成された後、慎重に記載されているように慎重に培地を交換します。培養環境が生理的 pH になるように、1 時間の間に 2 回培地を交換します。必要に応じ、pH 調整したゲルは最後の培地交換の後、37°C で一晩保存することができます。

細胞の播種

細胞をトリプシン処理し、必要な量の細胞を遠心して沈殿させます（多くの細胞タイプで、通常、最終濃度 $4 \sim 16 \times 10^4$ cells/cm² です）。適切な濃度で最終液量が 200 - 350 μL になるように、組織培養培地で細胞を懸濁します。ハイドロゲル上に慎重に細胞懸濁液を添加します。

B) セルカルチャーインサートでの平面培養

以下のプロトコールは、Falcon® 24 ウェルセルカルチャーインサート（カタログ番号 353095）および Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート（カタログ番号 353504）の使用を前提としています。

Corning® PuraMatrix™ の調製とゲル形成

1. 概説のように、ボルテックスミキサーか超音波処理を用いて Corning® PuraMatrix™ 原液（1% w/v）の粘度を下げます。原液を滅菌水で希釈して、適切な液量をマイクロチューブ中で調製します。ほとんどの細胞タイプに対して、セルカルチャーインサート 1 枚あたり最終濃度 0.25% の液を 100 μL 使用することをお勧めします。穏やかにピペティングして混合します。
2. インサートコンパニオンプレートに必要な数のセルカルチャーインサートをセットします。ウェル壁面にピペットを当て、インサートとウェルの隙間から 24 ウェルインサートの下部チャンバーに 250 μL の培地を注入します。インサートの下に泡ができないように慎重に注入してください。培地はインサート底部に丁度触れる程度の量を入れます。セルカルチャーインサートの液量の推奨値に関しては、**12 ページの表を参照してください**。
3. 希釈した Corning® PuraMatrix™ 100 μL を、インサート中央にピペットで注ぎます。Corning® PuraMatrix™ がゲル化するまで、最低 30 分待ってください。
4. ピペットの先をインサートの内壁に当てて、培地 400 μL をゆっくりと壁面に伝うように流し入れ、ゲルの表面を乱さないように慎重に添加します。（一度に添加する液量を少なくするために、P200 ピペットを使用して 200 μL ずつ 2 回注入します）。
5. 細胞の播種の前に Corning® PuraMatrix™ を適切な生理的環境の pH にするために、**パート E のステップ 10 ~ 13 にしたがってください**。

細胞の播種

1. 細胞をトリプシン処理し、必要な量の細胞数を遠心し沈殿させます（多くの細胞タイプで、通常、最終濃度 $4 \sim 16 \times 10^4$ cells/cm² です）。適切な細胞数で最終液量が 200 ~ 350 μL になるように、組織培養培地で細胞を懸濁します。
2. 慎重にウェル内のハイドロゲル上の培地を取り除きます。
3. P200 ピペッターを使用して、ハイドロゲルを乱さないように注意しながら、インサートに細胞を穏やかに注ぎます。
4. 各インサートの下のウェルに 700 ~ 900 μL の培地を添加します。
5. 細胞への栄養補給のために、およそ 2 日に 1 回、上記のように慎重に培地を交換します。

C) Corning® PuraMatrix™ に添加する ECM の調製

留意：Corning® PuraMatrix™ の原液（1% w/v）を使用する前に、ボルテックスミキサーで攪拌するか超音波浴槽で 30 分間超音波処理を行なって、粘度を下げてください。気泡が見られる場合には、溶液を 1.5 mL マイクロチューブに分注して最高速で遠心してください。

細胞播種のためのECM添加

フィブロネクチンプロトコール：（塩が存在しないとフィブロネクチンは水に溶けないため、Corning® PuraMatrix™ ペプチドハイドロゲル上に「コーティング」する必要があります）。

1. 5 mg の Corning® フィブロネクチン（カタログ番号：354008/356008）を滅菌水 5 mL に懸濁します。
2. 10,000 MW カットオフの Slide-A-Lyzer™（カタログ番号：66453, Pierce）を使用して、Ca²⁺ と Mg²⁺ を含まない dPBS で、室温（RT）で一晩透析を行ないます。
3. フィブロネクチンを加える前に、Corning® PuraMatrix™ を穏やかにピペティングして十分攪拌し、適切なプレートのウェルに希望する濃度で注入します。液量に関しては 12 ページの表を参照してください。
4. Corning® PuraMatrix™ のゲル上にフィブロネクチン/PBS 溶液（1 mg/mL）を加え、60 分間おいてゲル化させます。
5. 培地で 5 分間洗浄し、取り除いた後にマトリックス上に注意深く細胞を添加します。

コラーゲン I プロトコール：（コラーゲン I は 1 mM HCl に溶けるので、ゲル化前に Corning® PuraMatrix™ に添加することが可能です）。

1. 10,000 MW カットオフの Slide-A-Lyzer を使用して、コラーゲン I（カタログ番号：354236, 酢酸で溶解）を 1 mM HC で、4℃で一晩透析を行ないます。
2. Corning® PuraMatrix™ に必要量のコラーゲン I/HCl 溶液を加え、穏やかにピペティングして混合します。
3. ウェルに加えます。
4. 培地をセルカルチャーインサートまたはプレートの壁面に沿って注意深く加え、ゲル化させます。
5. ゲルが形成されたらピペットで注意深く培地を取り除き、培地を取り除いたらすぐに 1 時間に 2 回の培地交換を行い、Corning® PuraMatrix™ を生理的 pH に調整した後、マトリックス上に細胞を播種します。

ラミニンプロトコール：（ラミニンは、0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl、pH7.4 の溶液で販売しています）。

1. 低濃度のラミニンの場合 [ラミニン、マウス（カタログ番号 354232）およびウルトラピュアラミニン、マウス（カタログ番号 354239）]。
 - a. 希望する濃度で培地と混合します。
 - b. セルカルチャーインサートまたはプレートの Corning® PuraMatrix™（細胞を含んだ状態あるいは含まない状態で調製）上に注意深く混合液を加え、ゲル化を開始させます。
2. 高濃度ラミニン/エンタクチン（10 mg/mL）の場合（カタログ番号 354259）。
Corning® PuraMatrix™ 上に希望する濃度の高濃度ラミニン溶液を直接、加えます。高濃度ラミニン溶液の希釈後の最終塩濃度が 1 mM 以下になるような場合は、Corning® PuraMatrix™ のゲル化が始まりません。ラミニン添加後にゲル化を開始させるためには、コラーゲン I プロトコールに記載されているように、培地を加えて pH を調整します。

細胞の包埋培養のためのECM添加

Corning® PuraMatrix™ ペプチドハイドロゲルへの細胞の包埋培養に関する詳しい情報はパート D およびパート E に記載されています。細胞の包埋培養混合液に ECM を添加する場合、パート D と E の説明、および下記の説明に従って行う必要があります。

神経細胞や内皮細胞の包埋培養には、0.25% 以下の濃度をお勧めします。Corning® PuraMatrix™ の濃度が 0.25% 以下の場合、ハイドロゲルを乱さずに培地交換するにはセルカルチャーインサートをお勧めします。他の細胞タイプの包埋培養には、適切なハイドロゲル濃度をあらかじめ確認してください。

セルカルチャープレートまたはセルカルチャーインサートで細胞の包埋培養混合液に ECM を添加する方法：

1. 上に記載されているように ECM を調製します。
2. 濃度が 1 ~ 5 µg/ml (最終濃度の 2 倍) になるように、ラミニンまたはコラーゲンを細胞 / スクローズ混合液に加えます (フィブロネクチンは包埋培養に適しませんが、Corning® PuraMatrix™ に包埋培養されている細胞にコートすることは可能です)。
3. 細胞の包埋培養には、パート D (セルカルチャープレート) あるいはパート E (セルカルチャーインサート) のプロトコールにしたがってください。

D) セルカルチャープレートでの 3D 細胞包埋培養 (ECM タンパク質添加 / 無添加)

1. Corning® PuraMatrix™ の原液 (1% w/v) を使用する際には必ず、ボルテックスミキサーで攪拌するか超音波浴槽で 30 分間超音波処理を行なって、粘度を下げてください。気泡が見られる場合には、溶液を 1.5 mL マイクロチューブに分注して最高速で遠心してください。
2. マイクロチューブ内で Corning® PuraMatrix™ 原液を滅菌 20% スクローズ溶液で希釈して、希望する濃度の 2 倍濃度の Corning® PuraMatrix™ / 10% スクローズ溶液をつくります。セルカルチャープレートに推奨される液量に関しては、12 ページの表を参照してください。
3. 細胞をトリプシン処理し、必要な数の細胞を遠心し沈殿させます (多くの細胞タイプで、通常、最終濃度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL です)。
4. 細胞のペレットから培地を取り除き、滅菌 10% スクローズ溶液で希望する濃度に懸濁します。
5. 再度遠心して細胞を沈殿させ、希望する最終濃度の 2 倍濃度になるように 10% スクローズ溶液で懸濁します。
6. 2 倍濃度の Corning® PuraMatrix™ と 2 倍濃度の細胞 / スクローズ懸濁液を等量混合し、攪拌して、ウェルの中央に気泡を作らないように注意深く加えます。
7. ハイドロゲルの上に、培地をウェルの壁面に沿って穏やかに流し、Corning® PuraMatrix™ のゲル化を開始させます。
8. 全てのウェルに細胞が播種されるまで繰り返します。
9. 播種に続いて 1 時間のうちに、培地交換を慎重に 2 回行い、ハイドロゲルの pH を調整します。アスピレーターは使わず、Corning® PuraMatrix™ を乱さないように培地を約 2/3 から 3/4 取り除くだけにします。
10. 必要であれば、ステップ 9 に記載された方法で培地交換することが可能です。

E) セルカルチャーインサートでの 3D 細胞包埋培養 (ECM タンパク質添加 / 無添加)

以下のプロトコールは、Falcon® 24 ウェルセルカルチャーインサート (カタログ番号 353095) および Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート (カタログ番号 353504) の使用を前提にしています。

Corning® PuraMatrix™ ペプチドハイドロゲルの濃度が 0.25% 以下の場合、ハイドロゲルを乱さずに培地交換を行うにはセルカルチャーインサートをお勧めします。神経細胞や内皮細胞の包埋培養には、0.25% 以下の濃度をお勧めします。他の細胞タイプの包埋培養の場合、適切なハイドロゲル濃度をあらかじめテストしてください。

Corning® PuraMatrix™ の調製

1. Corning® PuraMatrix™ の原液 (1% w/v) を使用する際には必ず、ボルテックスミキサーで攪拌するか超音波浴槽で 30 分間超音波処理を行なって、粘度を下げてください。気泡が見られる場合には、溶液を 1.5 mL マイクロチューブに分注して最高速で遠心してください。
2. マイクロチューブ内で Corning® PuraMatrix™ 原液を滅菌 20% スクロース溶液で希釈して、希望する濃度の 2 倍濃度の Corning® PuraMatrix™ /10% スクロース溶液をつくります。24 ウェルセルカルチャーインサートには総液量 100 μ L を推奨します (2 倍濃度 Corning® PuraMatrix™ の 10% スクロース溶液 50 μ L と、2 倍濃度の細胞の 10% スクロース懸濁液 50 μ L)。セルカルチャーインサートに推奨される液量に関しては、12 ページの表を参照してください。
 - a. 例えば、最終濃度 0.15% の Corning® PuraMatrix™ で神経細胞や内皮細胞の包埋培養を行なう場合には、10% スクロース溶液で 0.30% の Corning® PuraMatrix™ を調製します (1 mL 調製するためには、500 μ L の 20% スクロース溶液、300 μ L の Corning® PuraMatrix™、200 μ L の滅菌水を混合します)。
3. 穏やかにピペティングして混合します。
4. 細胞と Corning® PuraMatrix™ を混合する際には、セルカルチャーインサートまたはウェルそれぞれに別々のチューブを使用することを推奨します。必要とされる液量の Corning® PuraMatrix™ は、一度に全てのチューブに分注できます。

細胞播種

Corning® PuraMatrix™ は pH が低いので、培地を加えるまでに細胞が接触している時間をできるだけ短くするように素早く作業を行なってください。培地が無い状態で Corning® PuraMatrix™ と細胞を長い間接触させないためには、多数のウェルに播種する場合、細胞をウェルに一度に加えるのではなく、個々のウェル毎にマイクロチューブに細胞と Corning® PuraMatrix™ を調製することをお勧めします。

1. 細胞をトリプシン処理し、必要な数の細胞を遠心します (多くの細胞タイプで、通常、最終濃度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL です)。
2. 必要な数のセルカルチャーインサートをインサートコンパニオンプレートにセットします。
3. インサートとウェルの間のウェル外側壁面にピペットを当て、24 ウェルインサートの下部チャンパーに 250 μ L の培地を注入します。インサートの下に泡ができないように慎重に注入してください。培地はインサート底部に丁度触れる程度の量を入れます (図 1)。
4. 細胞のペレットから培地を取り除き、滅菌 10% スクロース溶液で希望する濃度に懸濁します。
5. 再度遠心して細胞を集め、希望する最終濃度の 2 倍濃度になるように 10% スクロース溶液で懸濁します。
6. マイクロチューブ内で、2 倍濃度の Corning® PuraMatrix™ の 10% スクロース溶液と 2 倍濃度の細胞の 10% スクロース懸濁液を等量ずつ、穏やかにピペティングして混合します。細胞を加えた後にボルテックスミキサーで攪拌したり、転倒混和しないでください。
7. Corning® PuraMatrix™ と細胞の混合液を、24 ウェルインサートに素早く加えます (図 2)。インサートの中央に分注すると、混合液は表面に均一に広がります。
8. ウェル中に Corning® PuraMatrix™ が定着するまで 5 分間待ちます。その間に、ステップ 6 ~ 7 の方法で次のインサートを準備します。
9. 5 分後、最初のインサートに対して、ピペットチップで 400 μ L の培地を (一度に添加する量を少なくするために P200 ピペットを使用して 200 μ L ずつ 2 回注入)、インサートの内壁をゆっくりと伝うようにしながら、慎重にゲルの上に注ぎます (図 3)。



図 1

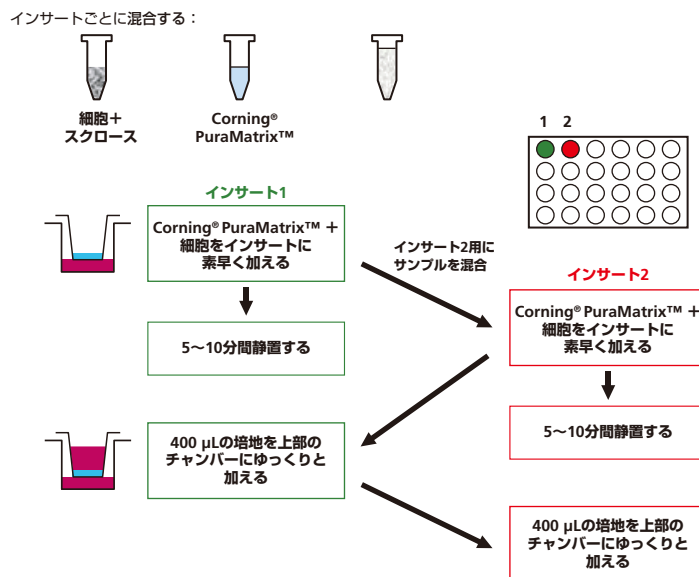


図 2



図 3

ステップ6から9のフローチャート



全てのインサートを調整するまで繰り返し、プロトコルのステップ10に進みます

10. 全てのインサートへの注入が終わったら、プレートに 30 ~ 60 分間インキュベーター内に置き、Corning® PuraMatrix™ のゲル化を完了させます。ハイドロゲルの濃度が高い場合には 30 分で十分です。0.15 ~ 0.25% のハイドロゲルは 1 時間程度置いてください。
この間にインサートとウェルの間の培地の液量がある程度、等量化します (図 4)。



図 4

11. ハイドロゲルを乱さないように培地を交換します。ゲル化した Corning® PuraMatrix™ は見えにくいので、P200 ピペッターを使用してチップの先端がインサートの底に触れないようにしながら、ハイドロゲル上の培地の約 2/3 を取り除くようにするのが最適な方法です (図 5)。
Corning® PuraMatrix™ と細胞を乱すおそれがあるため、アスピレーターを使用して、培地を取り除かないでください。
インサートの下のウェル内の培地は、アスピレーターあるいはピペットチップで吸引することが可能です。

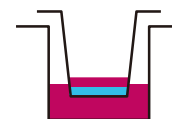


図 5

12. 上に記載されているように、インサートおよびウェル内の培地を慎重に交換します。プレートをインキュベーター内に 30 分間置き、ステップ 11 の方法で培地交換を行ない、再びプレートをインキュベーター内に置きます。この操作により、Corning® PuraMatrix™ の pH が調整され、余分なスクロースが取り除かれます。2 回目の交換の後、インサートには 200 ~ 350 µL、ウェルには 700-900 µL の培地を注入します。

13. さらに細胞への栄養素補給のために、およそ 2 日に 1 回慎重に培地を交換します。

F) ドロップカルチャープロトコール

この方法では、Corning® PuraMatrix™ 内に細胞を封入したドロップを形成できます。この方法は、研究対象にしたい細胞を Corning® PuraMatrix™ 内に包埋培養する (ECM 添加 / 無添加) 際の最適な条件を決める迅速スクリーニングに使用できます。ドロップカルチャープロトコールはまた、細胞生存率、細胞形態および / または Corning® PuraMatrix™ 内に包埋培養した細胞の免疫染色の迅速な評価に使用できます。

1. Corning® PuraMatrix™ の原液 (1% w/v) を使用する際には必ず、ボルテックスミキサーで攪拌するか超音波浴槽で 30 分間超音波処理を行なって、粘度を下げてください。気泡が見られる場合には、溶液を 1.5 mL マイクロチューブに分注して最高速で遠心してください。
2. マイクロチューブに Corning® PuraMatrix™ を適切な量だけ調製します。原液を滅菌 20% スクロース溶液で希釈して、2 倍濃度の Corning® PuraMatrix™ の 10% スクロース溶液をつくります。穏やかにピペティングして混合します。
3. 75 ~ 80% のコンフルエンスになるまで細胞を培養し、標準的な手法で回収します。
4. ドロップに ECM タンパク質を添加する場合は、パート C (ECM 追加プロトコール) に記載されている方法にしたがって調製します。Corning® PuraMatrix™ のゲル化を防ぐため、塩の最終濃度は 1 mM 以下にする必要があります。

- 1000 × rpm で穏やかに細胞を遠心し、5 mL の 10% スクロース溶液 (0.2 μm メンブレンでフィルター滅菌) で洗浄します。再度沈殿させ、10% スクロース溶液で希望する濃度の 2 倍の濃度になるように再懸濁します (通常、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL)。この時点で最終濃度の 2 倍になるように ECM タンパク質を加えます。穏やかにピペティングして混合します。
- 細胞のスクロース懸濁液と Corning® PuraMatrix™ を等量ずつ、穏やかにピペティングして混合します。15 μL の細胞 / ハイドロゲル混合液を、ウェルの壁面に沿って培地 (1 mL の完全培地) の表面上に分注します。これによってハイドロゲルのゲル化が始まります。培地の入ったウェルには複数の「ドロップ」を分注することが可能です。
- 培養中の必要な時点で細胞生存率を評価するために、ドロップカルチャーを LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Life Technologies カタログ番号 L-3224) で分析することが可能です。培地の表面から、細胞 - ゲルのドロップをスパチュラで集めます。ガラススライド上にドロップを乗せ、50 μL の LIVE/DEAD Calcei AM および EthD-1 溶液を加えます。
- スライドを室温で 30 分間置き、緑 (生細胞) と赤 (死細胞) に染色された細胞を蛍光顕微鏡で確認します。

G) 継代培養または生化学分析に使用する細胞の回収

- 培地とゲルを繰り返しピペティングし、ウェルまたはセルカルチャーインサート内の細胞を含んだ Corning® PuraMatrix™ を物理的に破砕します。
- 破砕したゲルを 15 mL コニカルチューブに移します。ウェルまたはセルカルチャーインサート内を 2 分の 1 から 1 ウェル相当量の PBS で洗浄し、洗浄に使用した PBS をコニカルチューブに加えます。
- 低速で 5 分間遠心し、上清を捨てます。チューブの底のペレットには、細胞と Corning® PuraMatrix™ の破片が含まれています。
- 2 mL の PBS でペレットを再懸濁し、遠心して再度ペレットを集めます。
- 1 mL のトリプシン -EDTA でペレットを再懸濁し、37°C で 5 ~ 10 分間インキュベートします。これによって接着している細胞が分離します。
- 5 mL の培地を加え、再度遠心します。
- ペレットに 500 μL の培地 (再播種用) または PBS (生化学分析用) を加え、ピペティングにより再懸濁します。遠心して上清を捨てます。この時点で一部の細胞には、取り除くことのできない Corning® PuraMatrix™ の「破片」が付いている可能性があります。
- 生物化学的および分子解析を行なうためには、ペレットに適切な緩衝液を加えて溶解させます。
- 細胞の播種を行なうには、細胞懸濁液を新しいセルカルチャープレートまたはインサートに添加します。細胞は、包埋培養 (パート D、E 参照)、Corning® PuraMatrix™ 上への播種 (パート A、B 参照)、またはプラスチックプレート (ECM コートあるいはノンコート) への直接播種に使用することができます。

H) Corning® PuraMatrix™ で培養したサンプルの蛍光染色法

免疫染色

このプロトコールは、インサートまたはプレートを使用した 3D または 2D 培養に使用できます。特定の培養容器では (例: クリアボトムの 24 ウェルまたは 96 ウェルマイクロプレート)、ゲルをガラススライド上に移さずに直接サンプルを観察することも可能です。画像解析を行う場合、ゲルをガラススライド上に移さなければならないこともあります [例: 半透明なメンブレンを使用したセルカルチャーインサート (例) カタログ番号: 353495) を使用している場合]。

注記: 強い特異的シグナルを出すには、抗体をペプチド中に拡散させ、抗体の Corning® PuraMatrix™ への非特異的結合を完全に防ぐ必要があります。その場合、ブロッキングタイムとインキュベーションタイムの延長、高い抗体濃度、および複数回の洗浄が必要になります。

- 培養用ウェルから穏やかに培地を取り除きます。
- ゲル内の細胞を、4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定します。
- PBS 中で洗浄します。
- ブロッキング溶液 (PBS + 10% ウシ胎児血清) 中で 12 ~ 16 時間インキュベートします。
 - ブロッキング溶液は数時間ごとに 3 ~ 4 回交換し、一晩置く必要があります。必要であれば交換回数を増やすことも可能です。

5. 一次抗体 / ブロッキング溶液を加え、4℃で一晩インキュベートします。
 - a. 3D Corning® PuraMatrix™ サンプル中の細胞には、2D 培養の細胞に使用するよりも高い一次抗体濃度の使用をお勧めします。段階希釈により、適切な濃度を決めてください。
 - b. バックグラウンド染色を評価するためのネガティブコントロールとして、一次抗体を加えないサンプルをひとつ用意します。
 - c. 3D ゲルが完全に液中に沈むように、十分な量の液を使用します。
6. ブロッキング溶液で最低 4 回洗浄します（1 回の洗浄は 2 時間）。
7. 二次抗体 / ブロッキング溶液を加えます。
 - a. 上のステップ 5a に記載されているように、Corning® PuraMatrix™ 中の細胞にはより高い二次抗体濃度をお勧めします。
 - b. 4 時間インキュベートします。
8. PBS またはブロッキング溶液中で、1 回の洗浄に 1 時間以上かけながら、複数回（4 ~ 6 回）洗浄します。
9. 細胞培養容器中のサンプルの画像解析を行いません。必要であれば、スパチュラで注意深く容器からゲルを取り、ガラススライド上に移して顕微鏡で分析します。濃度の低いゲルを使用している場合（例：< 0.5%）には、ゲルの移動には十分注意を払ってください。

形態染色：Rhodamine-phalloidin/DAPI

1. インサートまたは培養ウェルから培地を穏やかに取り除きます。
2. ゲル内の細胞を、4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定します。
3. 慎重に 4% パラホルムアルデヒドを取り除き、廃棄します。
4. PBS で 1 回洗浄します。
5. 必要な染色色素を加えます。
 - a. PBS に溶解した 160 nM の Rhodamine-phalloidin を、ウェルまたはインサートあたり 300 μ L 使用してください。
 - b. ふたをして、一晩置きます。
 - c. 1X DAPI を加えて 1 時間置き、PBS で 2 回洗浄します。
6. 免疫染色の場合、PBS を除いた後、免疫染色 9 に記載された方法で画像解析を行いません。

I) 細胞や生物活性分子の *in vivo* デリバリーに関するヒント

- Corning® PuraMatrix™ は、径の大小に関係なく針やカテーテルで容易に取り扱うことができます。径の細い針では気泡ができる場合があります。 *in vivo* に気泡ができることを防ぐためには、サンプルを出し入れする際には、20 G より細い針で慎重に行なってください。
- 本製品は、使用前に 0.20 または 0.45 μ m メンブレンフィルターで再濾過が可能です。
- 本製品は、使用前にボルテックスミキサーによる攪拌あるいは超音波処理によって粘度を下げる必要があります。

Corning® PuraMatrix™ は低 pH のまま注射することが可能ですが、注射部位によっては強酸性に耐えられない場合があります。また、細胞も低 pH には敏感です。したがって、動物に注射する前に緩衝化やゲル化を行なう、以下のプロトコールを使用することができます。

注射用に 200 μ L のサンプルを調製するためには、まず細胞の 10% スクローズ細胞懸濁液 50 μ L を小型のチューブに分注します。

1. Corning® PuraMatrix™ 50 μ L を加え、穏やかに混合します。
2. 直ちに 100 μ L の PBS (Ca²⁺ と Mg²⁺ を含む) を細胞とハイドロゲル混合液の上に注意深くのせます。
3. 室温で 1 分間置き、P200 のピペットチップで穏やかに混合します。
4. 20 ~ 22 G の針を使用し、1 cc シリンジに混合液を全て吸い上げます。液体を吸い上げるとき、気泡ができないように注意深く吸い上げます。
5. 注射の際には針を交換することを推奨します。通常、組織や皮下への注射には 30 G あるいは 26 G の針を使用します。

注記：

- 使用する動物や注射部位の条件によって液量は変わります。
- 注入する細胞数は、実験目的によって予備検討のうえ決定する必要があります。

表 Corning® PuraMatrix™ の添加推奨量

Falcon® 細胞培養プレート	培養可能域 (cm ²)	ウェルの液量 (μL)
6 ウェル	9.60	1200
24 ウェル	2.00	250
96 ウェル	0.32	50

Falcon® 細胞培養インサート	培養可能域 (cm ²)	ウェルの液量 (μL)
6 ウェル	4.20	700
24 ウェル	0.30	50
96 ウェル	0.08	14

細胞の包埋を行う場合、播種に使用する Corning® PuraMatrix™ (Corning®PuraMatrix™とスクロースの混合液) の最終的な量は、2 倍になります。

安定性

4 ~ 30℃で保管した場合、出荷日より少なくとも 3 ヶ月間安定です。

- * PuraMatrix™ は 3DM Inc. の商標です。
- * Slide-A-Lyzer™ は Pierce Biotechnology, Inc. の商標です。

技術的なお問い合わせは CLSJP@corning.com へご連絡ください。

商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit www.corning.com/discoverylabware.

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

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

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

© 2012, 2013 Corning Incorporated
CLS-005-00
RO-1309-002-BD