

Cat. # Y50015, Y50025

For Research Use



MiraCell[®] Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit

Application Note #1

MED64 장치를 이용한 독성 평가 시험 프로토콜

! 주의

- 이 프로토콜은 MiraCell[®] Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit (Code Y50015), MiraCell[®] Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit (Code Y50025) 전용으로 제작되었습니다.
- 이 프로토콜로 실험을 진행하기 전에 반드시 각 제품의 매뉴얼을 숙지하여 심근 세포의 해동이나 배양 방법을 확인하시기를 바랍니다.
- 세포 해동과 동시에 MED probe에서 분석을 진행하는 경우, Application Note #2를 참고하십시오.

v201711

목차

1. Introduction	3
2. 필요한 시약 및 기구	3
3. 실험 일정 요약	4
4. 실험 방법	4
4-1. Cardiomyocytes 해동 (Day 0)	4
4-2. MED probe에서 Cardiomyocytes 배양 (Day 2)	4
4-2-1. MED probe Fibronectin coating	4
4-2-2. Cardiomyocytes 준비	5
4-2-3. MED probe 내 Cardiomyocytes seeding	6
4-3. MED probe 내 배양 2일 후 (Day 4-)	7
5. 주의 사항	8

1. Introduction

MEA (Multi-electrode array) 시스템을 이용한 심근세포의 전기 생리학적 분석은 *In vivo* ECG (Electrocardiography)의 QT 간격을 이용해 비교적 간단하게 FPD (Field Potential Duration)을 계산할 수 있어, 다양한 약물에 대한 Cardiomyocytes의 전기생리학적 반응을 확인할 수 있다.

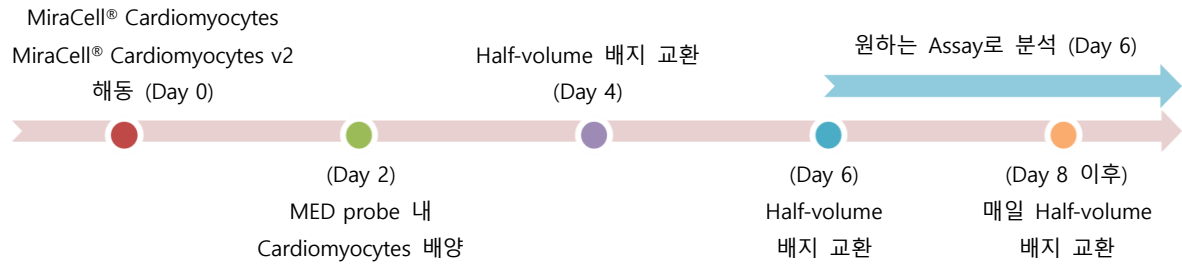
이 프로토콜은 MEA 시스템으로 MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit (Code Y50015), MiraCell® Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit (Code Y50025)에서의 심장 독성을 평가하는 방법을 안내한다.

MiraCell® Cardiomyocytes는 해동 2~5일 후부터 다양한 검사에 사용할 수 있다.

2. 필요한 시약 및 기구

- MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit (Code Y50015)
혹은 MiraCell® Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit (Code Y50025)
 - MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) 혹은 MiraCell® Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12)
 - MiraCell® CM Thawing Medium
 - MiraCell® CM Culture Medium (Code Y50013) 혹은 MiraCell® CM Culture Medium v2 (Code Y50023)
- 37°C, 5% CO₂ incubator
- Clean bench 혹은 safety cabinet
- Pipet controller, plastic pipettes
- Micropipette, 멸균된 filter tip
- 50 mL tubes
- 15 mL tubes
- 1.5 mL tubes
- Dulbecco's PBS with Ca²⁺ & Mg²⁺ (D-PBS (+/+))
 - 예) Dulbecco's PBS (Code C-40230)
- Dulbecco's PBS without Ca²⁺ & Mg²⁺ (D-PBS (-/-))
 - 예) Dulbecco's PBS, w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Code C-40232)
- 0.25% trypsin-EDTA solution
- Cell culture container (6 well tissue culture plate 등)
- 1 mg/mL fibronectin
- Trypan blue
- Hemocytometer
- MED probe
- 세포 배양용 10 cm petri dish
- 멸균수
- Extracellular potential measuring device MED64

3. 실험 일정 요약



4. 실험 방법

4-1. Cardiomyocytes 해동 (Day 0)

MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit (Code Y50015)

혹은 MiraCell® Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit (Code Y50025) 매뉴얼을 참고하여 해동한다.

4-2. MED probe에서 Cardiomyocytes 배양 (Day 2)

세포 해동 2일 후에는 MED probe로 세포를 옮겨 배양할 수 있다. 이후 안내되는 실험 과정은 6-well plate를 기준으로 한다.

- D-PBS (-/-)와 MiraCell® CM Culture medium, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 미리 실온에서 준비한다.
- 세포를 옮기기 전, 70% 에탄올로 MED probe를 소독하고, 양면을 살균 램프로 1시간 동안 살균한다.

4-2-1. MED probe Fibronectin coating

1. MED probe 1장을 세포 배양용 10 cm petri dish에 넣고, 멸균수 7 mL를 첨가한다. *1

*1 사용하는 모든 MED probe에 동일하게 적용한다. 또한, MED probe 안에는 멸균수를 첨가하지 않고 건조한 상태로 유지한다.

2. 1 mg/mL fibronectin 용액을 D-PBS (+/+)로 20배 희석한다 (최종 농도 50 µg/mL).

3. MED probe의 중심에 있는 전극에 희석한 fibronectin 용액을 2 µL를 떨어뜨린다. *2

*2 Tip의 끝으로 전극을 손상시키지 않도록 주의한다.

4. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1~2시간 배양한다.

4-2-2. Cardiomyocytes 준비

1. 배양 plate (6-well plate)의 thawing medium을 제거한다.
2. 상온에서 보관한 D-PBS (-/-) 2 mL을 well 내에 넣어준다.
3. D-PBS (-/-)를 제거 한 후, 다시 D-PBS (-/-) 2 mL을 well 내에 넣어준다.
4. 다시 D-PBS (-/-)를 제거한 후, 상온에서 보관한 0.25% trypsin-EDTA 용액 1 mL을 첨가하여 37°C 에서 4분간 처리한다. *1

*1 Trypsin을 장시간 처리하는 경우, Cardiomyocyte의 부착율이 떨어질 수 있으므로, 시간을 준수한다.

5. Plate 측면을 강하게 두드려 Cardiomyocytes를 떼어낸다. *2

*2 만약 Cardiomyocytes가 잘 떨어지지 않는 경우, 37°C에서 1분간 추가로 처리한 후 다시 plate 측면을 두드린다.

6. MiraCell® CM Culture Medium 1 mL을 추가하고, 1 mL 피펫을 이용해 well 내 세포 현탁액을 50 mL 튜브로 옮긴다. *3

*3 이 과정에서는 피펫팅을 하지 않으며, 세포 현탁액을 옮길 때에는 1 mL 당 3초 이상 천천히 수행해야 한다.

7. 1 mL의 MiraCell® CM Culture Medium을 추가하여 배양 plate를 한 쪽으로 기울인 후, well의 상반부에 1회 피펫팅 하여 남아있는 세포를 떼어낸다. 이후 배양 plate를 돌려 반대 쪽에도 동일한 방법으로 세포를 떼어낸다.
8. 7번 과정 후 well에 남아있는 용액을 6번의 50 mL 튜브로 옮긴다.

9. 5 mL 피펫으로 세포 현탁액을 1회 피펫팅한 후, 20 μ L 피펫으로 cell suspension 용액 20 μ L를 샘플링하여 세포 수를 확인한다. *4

*4 Cardiomyocytes는 용액 내에서 침전되는 경향이 있으므로, 피펫팅 후 즉시 샘플링한다.

[세포 수 확인 (Cell counting)]

- Trypan blue 용액 20 μ L를 첨가하고, hemocytometer를 이용해 살아있는 세포 수를 확인한다.

- 아래 공식을 사용해 4개 영역의 총 세포 수를 통해 세포 농도 (cells / mL)와 총 세포 수를 계산한다.

$$\begin{aligned} \text{세포 농도 (cells / mL)} &= \text{확인한 세포 수} \times 10^4 \text{ cells} \div 4 \times 2 \\ \text{총 세포 수 (cells)} &= \text{세포 농도} \times 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

4-2-3. MED probe 내 Cardiomyocytes seeding

후속 과정에서는 100 – 200 μl 피펫을 사용하시기 바랍니다. 세포 밀도가 높을 경우에 피펫팅으로 인해 세포에 손상을 입을 수 있으니, 50 μl 기준 약 10초 이상의 속도로 천천히 작업을 수행하십시오. 또한 spotting을 위한 피펫팅 시에는 2 – 10 μl 피펫을 사용하고, 2 μl 기준 약 2초 이상의 속도로 천천히 작업을 수행하십시오.

1. 준비된 MED probe 수에 따라 필요한 세포 수를 계산한다. (Probe 당 3×10^4 cells)
2. MED probe 수에 따라 필요한 수의 세포를 5 ml 피펫으로 한번에 15 ml 튜브 ①로 옮겨, 200 x g, 실온의 조건으로 2분 간 원심분리한다. *1
*1 원심분리는 Cardiomyocytes에 큰 손상을 줄 수 있으므로, 원심분리 조건을 철저히 준수한다.
3. 원심분리 후 상층액 약 100 μl 만 남기고 모두 제거한다.
4. 200 μl 피펫을 이용해, 가능한 한 천천히 남은 상층액을 제거한다.
5. 아래의 계산식을 통해 얻은 배양 배지 총 양 중 절반의 MiraCell® CM Culture Medium을 튜브 ①에 첨가하고, 약 10회 정도 가볍게 tapping하여 세포를 풀어준다. *2, *3
- 필요한 배지의 양 = 1번에서 계산한 세포 수 $\div 3 \times 10^4$ cells $\times 2 \mu\text{l}$
*2 예를 들어, 20개의 MED probe를 이용하고자 할 때, 6×10^5 개의 세포가 필요하며, 총 solution의 양은 40 μl 다. 5번 단계에서는 그 절반인 20 μl 를 사용한다.
*3 피펫팅은 진행하지 않는다.
6. 피펫을 사용하여 5번에서 추가한 동일한 양의 세포 현탁액을 1.5 ml 튜브 ②에 넣는다. *4
*4 예를 들어, 5단계에서 첨가한 양이 20 μl 인 경우, 동일한 양인 20 μl 을 튜브 ②로 넣어준다.
7. 튜브 ①에 남아있는 세포 현탁액이 5번에 첨가한 배지 양과 동일하도록 MiraCell® CM Culture Medium을 적당량 넣어준다. *5
*5 예를 들어, 남아있는 세포 현탁액이 5 μl 인 경우, 15 μl 를 추가하여 총 부피가 20 μl 가 되도록 한다. 만약, 이 과정에서 MED probe에 필요한 세포 수보다 적어지게 되면 원하는 파형이 관찰되지 않을 수 있으니, 농도를 정확하게 조정한다.
8. 7번에서 조제한 튜브 ①의 세포 현탁액을 6번의 튜브 ②로 옮기고, 3~5회 정도 가볍게 tapping하여 세포를 섞어 준다.
9. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 MED probe를 꺼낸다.

10. 8번에서 준비한 튜브 ②의 cell suspension 용액을 3~5회 두드린 후, MED probe에 2 μ l씩 분주한다. *6
*6 Probe 당 3 x 10⁴개의 세포를 포함해야 하며, fibronectin 용액이 증발하지 않도록 신속하게 진행한다.
11. 필요한 MED probe 만큼 10번을 반복하여 수행한다. *7
*7 세포가 튜브 바닥으로 가라 앉을 수 있기 때문에, Probe 당 3-5회 튜브를 tapping한 후 분주한다. 세포를 섞을 때, 피펫은 사용하지 않는다.
12. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3~5시간 배양한다. *8
*8 시간을 철저히 준수한다.
13. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3~5시간 배양된 MED probe를 꺼내, probe 중앙에 있는 전극 주변에 MiraCell® CM Culture Medium 1 ml를 천천히 넣어준다. *9
*9 배지가 세포에 직접 닿지 않도록 주의하면서, Probe 가장자리를 따라 배지를 원을 그리며 흘려준다.
14. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다.

4-3. MED probe 내 배양 2일 후 (Day 4-)

1. 배양 2일 후, 1 ml 피펫을 이용해 MED probe에서 0.5 ml의 배지를 제거하고, probe 가장자리를 따라 새로운 MiraCell® CM Culture Medium 0.5 ml를 천천히 넣어준다.
2. 그 후 1-2일 마다, 1 ml 피펫을 이용해 배지의 절반을 제거하고, 새로운 배지를 추가하는 half-medium change를 진행하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. MED probe에서 배양한 지 4~5일 후에는 측정에 활용할 수 있다.
3. 측정 전날 혹은 측정 당일에 MED probe에서 배양 배지를 모두 제거하고, 새로운 MiraCell® CM Culture Medium 2 ml를 추가한다. *1, *2
*1 배양 배지가 세포에 직접 닿지 않도록 벽을 따라 천천히 흘려준다.
*2 세포 배양용 10 cm petri dish 내의 멸균수가 증발 등으로 인해 감소하는 경우, MED probe 내 배지도 쉽게 증발할 수 있으므로, 적절하게 멸균수를 추가해준다. (멸균수는 세포 배양을 위해 10 cm petri dish 표면을 완전히 덮는 정도가 적당하다.)
4. MED64를 이용하여 분석한다.
분석 방법은 아래 링크의 3. Data Acquisition, 4. Data Analysis를 참고한다.
http://www.med64.com/support/Application_Note_Cellartis_hPSC-CM.pdf

5. 주의 사항

MiraCell®은 iHeart Japan Corporation의 등록 상표입니다. 기타 본 매뉴얼에 기재되어 있는 회사 이름 및 상품명 등은 각 사의 상호, 등록 또는 미등록의 상표이며 이들은 각 소유자에게 귀속합니다.

본 Application note는 제조사에서 발행된 일문 Application note에 기초하여, 국내 공식 유통자인 다카라코리아바이오메디칼(주)에서 한국어로 번역한 것이다. 번역본과 일문본이 상이할 경우, 일문본의 내용이 우선한다.