

<Before used>

Q1. NanioCulture Plate(NCP)가 무엇인가요?

A1. NanoCulture Plate (NCP)는 3차원적으로 세포를 배양하는 배양 시스템(3D culture system)입니다.

Q2. 3차원 배양시스템이 무엇인가요? 어떤 장점이 있나요?

A2. 일반적인 Polystyrene plates는 plate 표면에 강하게 부착되고 편평한 morphology는 형성하게 됩니다(2D culture system). 반면 3차원 culture system은 spheroid 형성하고 이것은 monolayer cell 보다 in vivo 에서와 같은 입체적인 환경을 조성해 주어, 세포 본래의 특성이 재현되도록 합니다.

Q3. NCP는 어떤 종류의 물질로 만들어지나요?

A3. Culture surface가 나노 기술에 의해 microstrure로 print 되어 cells이 부착될 수 있도록 하였습니다.

Q4. microsquare과 microhoneycomb의 차이점은 무엇인가요?

A4. NanoCulture ® Plate만의 특별한 미세구조 시스템 인 micro honeycomb pattern와 Square pattern을 제공합니다. 이는 세포의 종류에 따라 유리한 패턴을 선택할 수 있기 때문에, 세포들의 spheroid 형성을 위해 알맞은 pattern의 NCP를 선택하여 사용 할 수 있습니다.

Q5. Culture surface는 어떤 물질로 코팅되어있나요?

A5. Culture surface는 protein, gel등에 의해 코팅되지 않았습니다. NCP는 어떠한 물질에 의해 코팅된 것이 아닙니다.

Q6. 다른 3D culture system과의 차이점은 무엇인가요?

A6. 3D culture system에는 2가지의 잘 알려진 방법이 있는데, 하나는 matrix나 gel에서 spheroid 를 형성하는 방법이고, 다른 하나는 Culture surface에 Low Attachment 과정으로 plate에서 세포가 떠다니면서 aggregation하는 방법입니다. NCP는 matrix나 gel 과 같은 번거로운 작업이 필요하지 않고 spheroid를 형성하는 과정이 간단합니다. 또한 spheroid는 NCP의 Culture surface에 붙는 성질 때문에, 현미경 관찰이 쉽고 medium 교환이 가능합니다.

Q7. NCP상에서 세포들이 어떻게 spheroid를 형성하나요?

A7. NCP에 seeding 한 세포들은 둥근 형태로 보이고, Culture surface의 미세구조에 부착하여 자랍니다. 자라는 동안 세포들은 미세구조를 통해 스스로 이동하여 Multi-cellular spheroid 형성합니다. Cell proliferation을 통해 spheroid는 점점 커집니다.

Q8. spheroid는 NCP의 Culture surface에 부착하나요?

A8. spheroid는 NCP의 Culture surface에 부착하지만, 그것은 단단하지 않습니다. Culture surface에 접촉되어있는 세포들은 NCP의 미세구조를 붙잡고 있습니다.

Q9. NCP에서 배양되는 spheroid의 중심세포들은 생존하나요?

A9. 배양기간이 7~10일이면, spheroid의 중심세포가 생존 하는 것을 확인할 수 있습니다.

Q10. NCP를 사용하는데 필요한 특별한 장치가 있나요?

A10. 어떠한 특별한 장치도 필요하지 않습니다. 만약 세포를 배양하기 위한 일반적인 장비를 사용하고 있다면 NCP에 세포를 배양하는데 충분합니다. NCP를 사용하기 전에 NCP를 미리 incubation하기를 권장하며, centrifuge는 이 과정에서 유용합니다.

Q11. NCP는 세척과 재사용이 가능한가요?

A11. 불가능합니다.

Q12. NCP는 autoclave에 의해 살균 할 수 있나요?

A12. NCP가 손상될 수 있기 때문에 살균하지 않습니다. 무균을 유지하지 위한 방법으로, 포장을 제거한 후 clean bench 밖에서는 되도록이면 NCP의 뚜껑을 열지 않는 게 좋습니다.

Q13. 어떤 형식의 plate가 제공 가능한가요?

A13. 96well 과 24well의 두 가지 종류의 plate가 제공 가능합니다.

Q14. NCP는 96well/24well plate외에 다른 plate가 제공되나요?

A14. 현재는 96well 과 24well plate외에 다른 것을 제공하지 않습니다.

Q15. NanoCulture Medium에는 serum이 포함되어있나요?

A15. NanoCulture Medium (NCM)은 10% FBS가 포함되어있습니다. 우리는 Basal medium과 FBS를 각각 다른 bottle에 담아 제공합니다. 다양한 FBS 농도의 medium을 사용할 수 있습니다.

Q16. NCP를 사용한 reference가 있나요?

A16. 다음의 journal에 논문이 게재되었습니다.

1) J Cell Sci. 122(23): 4277-86 (2009)

2) Hosp. Dent. (Tokyo) 21(2): 85-90 (2009)

3) Med. Mol. Morphol. in press

< At use >

Q1. 어떤 종류의 세포들이 Nano Culture Plate에서 spheroids를 형성하나요?

A1. 우리는 90종류이상의 adhesive cells를 NCP에서 테스트했고, 95%이상의 세포들이 NCP에 spheroids를 형성되는 것을 확인하였습니다.

가능 - primary cancer cell, hepatocyte, adipocyte, mesenchymal stem cell, fibroblasts 등.
test 중 - ES cells, iPS cell, keratinocytes

Q2. Adherent가 아닌 cells은 NCP에서 spheroids를 형성하나요?

A2. NCP는 세포의 부착력을 활용한 3차원배양방법이기 때문에 non-adherent cells의 spheroid 형성은 어려울 것으로 생각됩니다.

Q3. L-type과 H-type의 plate는 어떻게 다른가요?

A3. H-type의 플레이트는 L-type 플레이트의 접착력을 증가시키기 위한 사양입니다. NCP에서 spheroids를 형성하기 위해 첫 번째로, 실험하고자 하는 세포들의 알맞은 조건을 맞추기 위해 L-type plate를 사용해야 합니다. 만약 L-type plate에서 spheroids 형성이 well의 중심에서 둥둥 떠다니고 뭉쳐지는 것을 발견하거나, 배양액을 교체했을 때 대부분의 모든 spheroids가 제거가 된다면, 좀더 높은 접착력을 갖는 H-type plate를 사용하세요. 그러나 H-type plate는 어떤 종류의 세포들에서는 spheroids를 형성하는데 너무 강력한 접착력이 있습니다.

Q4. 세포들이 NCP에 spheroids를 형성하는데, serum이 필요 없거나, 약간의 serum 배양액이 필요하나요?

A4. 세포가 serum이 없는 배양액 혹은 serum이 약간 첨가된 배양액에서 spheroids를 형성하는지는 세포들의 특성에 따라 달라집니다. NCP에서 spheroid 형성은 일반적으로 serum의 농도에 의해서 결정됩니다.

Q5. 평소 사용하고 있는 배양액을 사용해도 되나요?

A5. Spheroids는 기존에 사용하는 배양액으로 형성 가능할 것입니다. Trial kit을 사용하여 배양 조건을 만들 때, 사용하고 있는 배양액을 적용해보세요.

Q6. NCM의 FBS는 inactivation 되어있나요?

A6. 그렇습니다. FBS는 inactivation 되어있습니다.

Q7. 왜 NCP를 사용하기 전에 미리 incubation을 해야 하나요?

A7. 공기방울은 microstructure의 culture 표면에 쉽게 발생합니다.

공기방울이 남아 있을 때 spheroid는 culture 표면에 동일하게 형성하지 않기 때문에, 우리는 세포들을 seeding하기 전에 pre-incubation단계에서 공기방울을 제거하기를 권장합니다.

Q8. Culture 표면에 공기방울이 생겼다면, 어떻게 해야 하나요?

A8. 만약 세포들을 seeding 하기 전에 공기방울이 발생했다면, 공기방울을 표면 위로 떠오르게 하기 위해 손가락으로 살살 두드리세요. 만약 공기방울이 떠오르지 않는다면, multi-well plate bucket을 사용하여 1-3분 동안 300-500g으로 원심분리를 하세요. 그러면 공기방울은 제거될 것입니다. 혹은, 공기방울은 pipetting에 의해서 culture 표면에 손상을 입히지 않고 제거될 수 있습니다. 세포들의 seeding 직후에 공기방울이 나타난다면, pipet으로 공기방울을 제거하세요. 세포들이 이미 culture 표면에 부착되었다면, spheroid 형성에 영향을 주지 않기 위해서 공기방울을 제거하지 말아야 합니다. 왜냐하면 공기방울을 제거하는 것은 어렵기 때문입니다.

Q9. micropipette로 culture 표면에 상처를 입혔다면, 어떻게 해야 하나요?

A9. 만약 culture 표면에 micropipette의 tip에 의해 강한 상처를 입혔다면, 세포들은 상처부분에 부착했을 것입니다. 만약 그것이 걱정된다면, 그 well은 사용하지 말아야 합니다.

Q10. NCP를 위한 적당한 배양액 용량은 얼마인가요?

A10. 96well plates면 100-200ul/well, 24well plates면 600-1200ul/well 입니다.

Q11. NCP에서 적당한 세포 수는 얼마인가요?

A11. 첫 번째로, 96well plate에서 1×10^4 cells/well, 24well plates에서는 6×10^4 cells/well을 적용 하세요. 위의 세포밀도에서 spheroids의 크기가 작을 때, 큰 사이즈의 spheroids를 얻기 위해서는 cell seeding의 숫자를 증가시켜야 합니다.

Q12. spheroids를 얻는데 얼마나 오래 걸리나요? 얼마나 오랫동안 spheroids는 NCP에서 배양되나요?

A12. 대부분의 세포들은 배양 후 24시간 안에 서로 부착을 시작합니다. 그리고 spheroid는 culture후 3~4일 후에 확인되고, 세포들은 7~10일에 급격히 증가합니다. 만약 신선한 배양액을 제공한다면, 일정 크기의 Spheroids를 최소 1달 동안 배양할 수 있습니다.

Q13. spheroid는 NCP에서 confluency 개념이 적용 되나요?

A13. monolayer에 배양에서 사용되는 confluent의 개념은 적용 되지 않습니다. 그러나 spheroid의 성장은 7~10일 정도에 plateau에 도달하고, 그것은 이후에 크게 증식되지 않습니다.

Q14. spheroids의 크기는 얼마인가요?

A14. spheroid의 크기는 세포에 의존적이므로 모두 다릅니다. 배양 일주일 후, 작은 spheroids는 지름이 50mm 이고, 큰 것은 지름이 200~300mm으로 성장합니다. 세포들의 seeding 수가 변화하면, spheroid 크기도 달라집니다. Seeding 세포들의 숫자가 증가하면, 큰 spheroid는 짧은 배양 기간 안에 형성됩니다.

Q15. spheroids가 완전하게 구 모양으로 되지 않는데 문제가 있는 것인가요?

A15. spheroid의 형성은 세포들의 부착력에 의해 달라집니다. 보통 둥글거나 단단한 spheroids는 강한 cell-cell interaction에 의해서 형성되고, 느슨한 포도모양의 spheroids는 약한 cell-cell interaction에 의해 형성됩니다.

Q16. 전에 spheroids가 형성된 적이 있지만, 반복되어 spheroid가 형성되지 않는데 어떻게 해결할 수 있나요?

A16. 세포들을 여러 차례 계대 배양 하는 과정에서, 세포들의 특성은 변할 것이고, spheroid 형성에 영향을 미칠 것입니다. 만약 세포들이 seeding하기 전에 50~70%의 밀도로 배양된다면, spheroid는 안정하게 형성할 수 있습니다.

Q17. spheroid가 well에서 일정하지 않게 형성 되는데 어떻게 해야 되나요?

A17. Plate의 가장자리에 있는 medium은 안쪽의 medium 보다 더 빨리 따뜻해지는데 이런 현상은 medium의 대류에 의한 것입니다. 이것은 spheroid formation의 불균형을 야기하며 Cells type에 따라 불균형 정도가 다르게 나타납니다. 이러한 현상 때문에 우리는 세포들을 seeding 하기 바로 직전까지 배양액과 NCP를 37°C로 따뜻하게 유지하기를 권장합니다.

Q18. NCP의 spheroids를 현미경으로 관찰 가능한가요?

A18. 그렇습니다. Spheroids가 culture surface에 부착하고 그것들은 동일평면상에 존재하기 때문에 현미경 관찰이 쉽습니다. 또한 differential interference microscope 관찰도 가능합니다.

Q19. spheroids는 plate로부터 분리되고 배양을 하는 동안 well의 중앙에서 모아지는데 어떻게 해야 하나요?

A19. 세포들이 seeding한 후에 현미경으로 관찰 할 경우에 플레이트에 영향을 주지 않도록 주의해야 합니다. 왜냐하면 spheroids는 culture surface에 매우 단단히 부착하지 않습니다. 만약 플레이트를 손으로 톡톡 쳐주거나 항상 기계적인 진동을 주면 Spheroids는 뒹뒹 떠다닐 것입니다.

Q20. spheroids는 배양액을 교체하면 감소하는데 어떻게 해야 되나요?

A20. 우리는 완전한 배양액 교체를 추천하지 않습니다. 왜냐하면 spheroids는 culture surface에 매우 단단히 부착하지 않습니다. 영양분 공급을 할 때, 배양액을 절반만 조심스럽게 버리고, 새 배양액을 절반만 조심스럽게 더하세요. Spheroids는 손상 받기 쉽기 때문에 주의가 필요합니다. 만약 전체 배양액 교체가 필요하다면, 가능하면 배양액을 천천히 교체하세요.

Q21. spheroids가 96well plate에 형성되었을지라도, spheroids는 culture surface로부터 분리되고, 24well plate에서 큰 덩어리를 만드는데 어떻게 해야 되나요?

A21. 배양공간이 커지게 되었을 때, 배양액의 진동은 커지고 spheroids는 분리되기가 쉬워집니다. 떠다니는 spheroids는 서로 서로 뭉치게 되고 well과 well 사이에서 spheroid의 크기와 모양은 변형됩니다. 가능하면 cell seeding 후에 플레이트를 움직이지 마세요. 그리고 배양액을 보통 (2ml/well)보다 더 사용할 때, spheroids에서 floating을 억제 할 수 있을 것입니다.

Q22. 얼마의 DMSO 농도가 spheroid 형성에 영향을 미치나요?

A22. 높은 농도의 DMSO는 spheroid를 형성하는데 영향을 미칠 것입니다. DMSO의 농도가 미치는 영향은 Cell type에 따라 다르므로 사용하는 cell이 어느 농도에서 영향이 있는지를 직접 확인해야 합니다.

Q23. 사용하지 않은 well은 나중에 culture를 할 때 사용할 수 있나요?

A23. 우리는 한 번 개봉된 well을 나중에 사용하는 것을 권하지 않습니다. 사용하지 않은 well은 무균의 포장 테이프로 포장할 수 있고, 이 well은 다음 번 배양을 할 때 사용할 수 있습니다. 그러나 이와 같은 종류의 사용은 제품의 무균 상태는 보장할 수 없습니다.