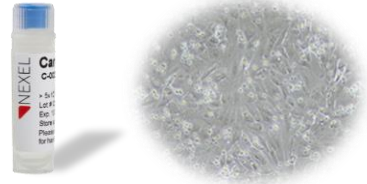


# Cardiac Spheroid Formation Using Cardiosight®-S



## Introduction

3D 배양 방법은 본래의 조직과 2D 배양과의 차이를 줄이기 위해 개발되었습니다. 실제로 2D와 3D 배양 실험 시, 실험 결과에 차이가 있으며, 2D 배양에서의 실험보다 3D 배양으로 실험을 진행하였을 때, 신뢰성이 높은 것으로 나타났습니다. 현재 3D 배양 모델에 대한 관심이 증가하면서 3D 모델을 중심으로 다양한 실험이 진행되고 있습니다. 따라서 Cardiosight®-S를 이용하여 사전배양을 할 필요 없이 스페로이드를 형성하는 방법을 제시하려 합니다.

스페로이드는 사전배양 없이 바로 형성되어, 살아있는 세포가 다수 포함될 뿐만 아니라 빠른 실험 또한 가능합니다. Cardiosight®-S는 NEXEL의 심근분화 기술을 통해 순도 90% 이상의 고순도의 심근세포로 구성된 hiPSC 유래 심근세포입니다. 섬유아세포 또는 그 외의 세포의 비율이 극히 낮을 뿐만 아니라, 무혈청 배지를 사용함으로써 최종 실험자는 자신의 계획대로 실험을 설계할 수 있습니다. 이 어플리케이션 노트를 사용하여 실험을 진행할 때 **Cardiosight®-S User Guide** 를 참조하시길 바랍니다.

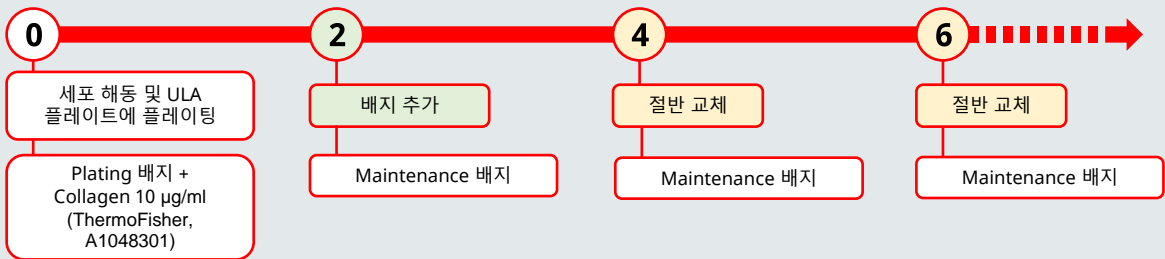


Table 1. Day 0부터 타임라인에 따른 워크플로우

## Workflow

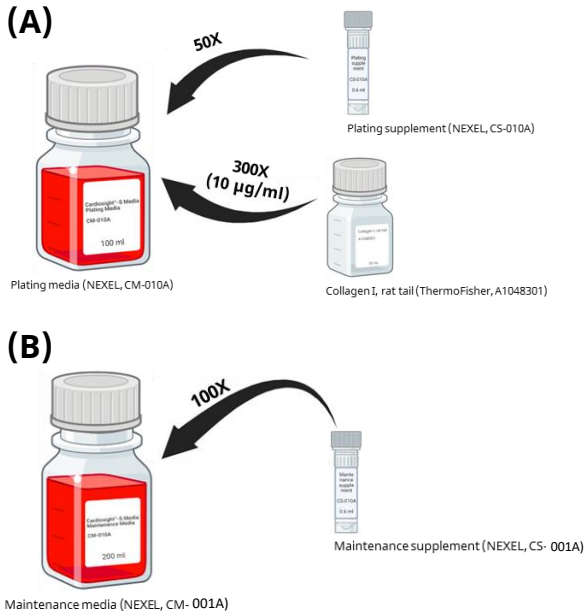
Day 0에 Cardiosight®-S는 콜라겐 I과 함께 ULA 플레이트에 플레이팅 되고, Day 2에서 스페로이드가 형성되어 박동을 시작합니다. Day 2에는 배지를 제거하지 않고 maintenance 배지만 추가하여

안정적인 스페로이드 형성을 진행합니다. Day 4부터 이틀에 한 번씩 배지의 절반을 교체합니다. 스페로이드 실험하는 권장 시점은 Day 5와 Day 7 사이입니다.

## Required Consumables

Item	Vendor	Catalog number
Cardiosight® -S Cardiomyocytes	NEXEL	C-001 C-002
Cardiosight® -S Advanced Media	NEXEL	CMS-001A CMS-002A
Collagen I, rat tail	ThermoFisher	A1048301
D-PBS - 1X	Welgene	LB001-02
PrimeSurface® 3D culture: Ultra-low Attachment Plates: 96 well, V bottom, Clear plates	S-bio	#MS-9096VZ
PrimeSurface® 3D culture: Ultra-low Attachment Plates: 384 well, U bottom, Clear plates	S-bio	#MS-9384UZ

\* 여기에 기재된 어플리케이션 노트는 'PrimeSurface® 3D 배양: Ultra-Low Attachment Plates'를 사용하여 최적화된 방법입니다.



**Figure 1.** Plating과 Maintenance 배지 준비  
**(A)** Plating 배지 준비: Plating supplement (NEXEL, CS-010A) 와 콜라겐 I, rat tail (ThermoFisher, A1048301) 를 Plating 배지 (NEXEL, CM-010A) 에 넣는다.  
**(B)** Maintenance 배지 준비: Maintenance supplement (NEXEL, CS-001A) 를 Maintenance 배지 (NEXEL, CM-001A) 에 넣는다.

## Method

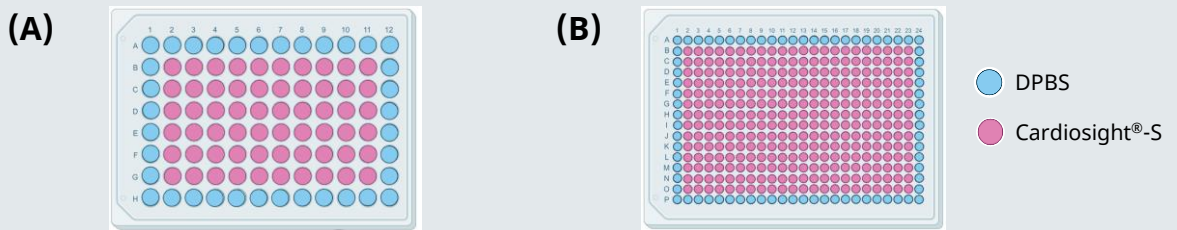
스페로이드 형성을 위한 Cardiosight®-S 해동 및 플레이팅

1. Cardiosight®-S 사용 설명서를 따라 세포를 녹입니다.
2. 원하는 크기의 스페로이드를 형성할 수 있는 적절한 플레이트를 선택해 준비합니다.  
**(96-well plate 기반)**
3. 10 µg/ml collagen I, rat tail (ThermoFisher, A1048301) 를 300X로 희석한 plating 배지를 한 well에 50 µl를 넣을 수 있는 충분한 양을 만듭니다.
4. 살아있는 세포 수를 세어 원하는 스페로이드 크기에 따라 plating 배지에 넣어 세포현탁액을 준비합니다.
5. 세포가 포함된 plating 배지를 한 well에 50 µl씩 플레이팅하고, 그 주변 well에 DPBS 200 µl를 넣어 세포가 마르는 것을 방지합니다.
6. 플레이트를 180 g 에서 3분간 원심분리 합니다.

**Note:** 96-well 플레이트 대신 384-well 플레이트를 선택한 경우, plating media의 양을 well 당 20 µl로 변경하고, well 당 20 µl의 셀 현탁액을 플레이팅합니다.

	50,000 cells/well	30,000 cells/well	10,000 cells/well	5,000 cells/well	3,000 cells/well	1,000 cells/well
Recommended Plate	96-well		Both			384-well
Approximate Size	900 µm	730 µm	500 µm	380 µm	300 µm	190 µm

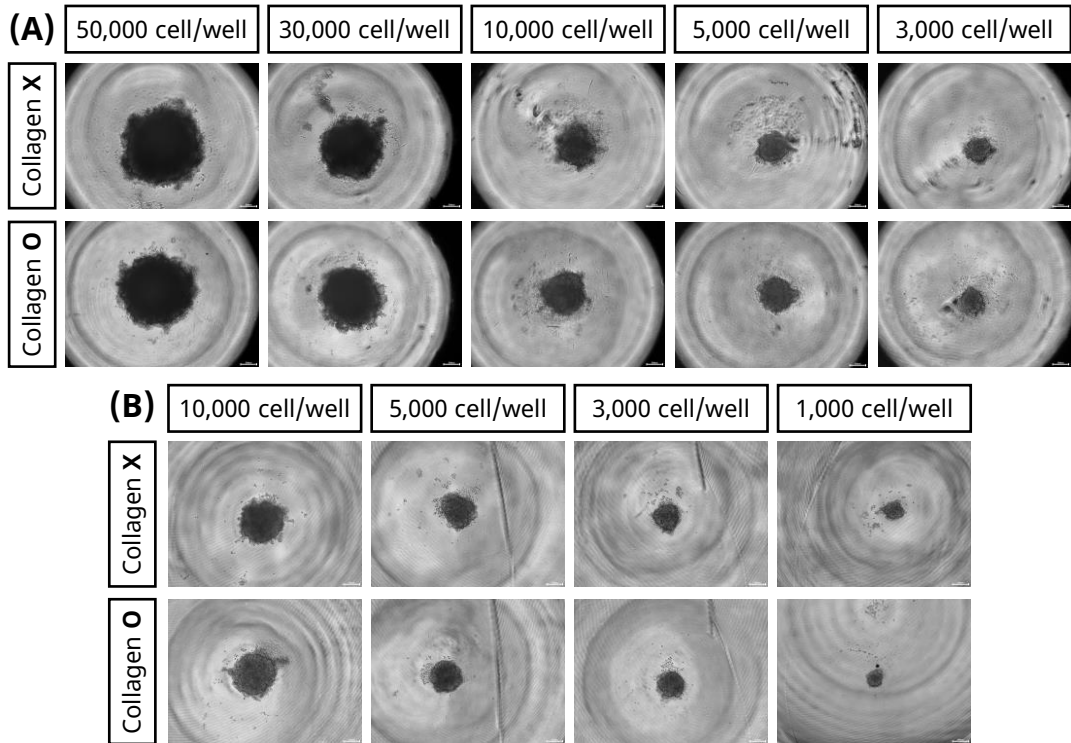
**Table 2.** 권장 플레이트 및 cell 숫자에 따른 평균적인 스페로이드 크기



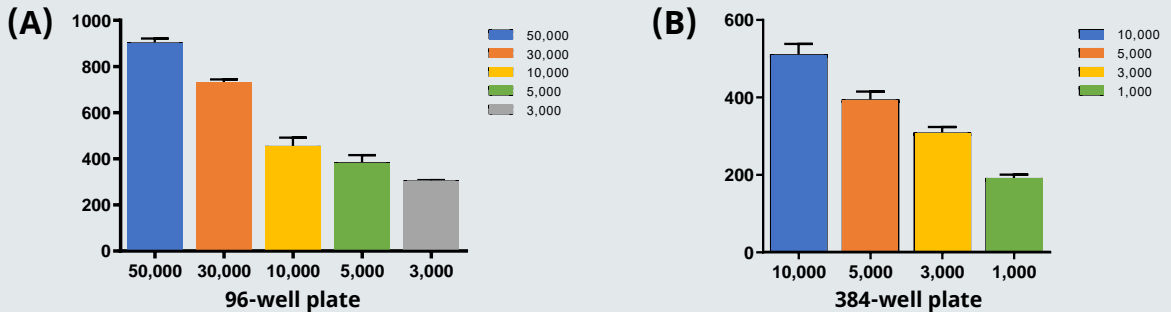
**Figure 2.** 권장하는 플레이트 디자인.  
**(A)** PrimeSurface® ULA 96 well V 바닥 플레이트 (S-bio, #MS-9096VZ).  
**(B)** PrimeSurface® ULA 384 well U 바닥 플레이트 (S-bio, #MS-9384UZ).

## 스페로이드 유지하기

1. 필요한 양의 maintenance 배지를 준비하고 상온에서 30분 이상 놓아둡니다.
2. Day 2에 각 well에 Day 0에 넣은 maintenance 배지 부피의 3배를 추가합니다.  
**Note:** 96-well 일 경우 150 µl, 384-well 일 경우 60 µl
3. Day 4부터 전체 배지의 절반을 교체하여 스페로이드를 유지합니다.  
**Note:** 96-well 일 경우 100 µl, 384-well 일 경우 40 µl



**Figure 3.** ULA 플레이트를 이용해 크기를 조절한 심근세포 스페로이드  
 위 행의 이미지는 plating 배지에 콜라겐을 첨가하지 않았을 때 Day 7에 스페로이드가 형성된 것이고, 이와는 다르게 아래  
 행의 이미지는 plating 배지에 콜라겐을 첨가하였을 때 Day 7에 형성된 스페로이드의 이미지입니다. **(A)** PrimeSurface®  
 ULA 96 well V bottom plate을 이용해 스페로이드를 형성한 사진. **(B)** PrimeSurface® ULA 384 well U bottom plate를  
 이용해 스페로이드를 형성한 사진.



**Figure 4.** 세포 수에 따른 스페로이드 사이즈의 그래프  
 Y 축은 스페로이드의 크기이고, X 축은 well 당 사용된 cell 의 수 입니다. **(A)** PrimeSurface® ULA 96-well V bottom plate를  
 사용한 Day 7 스페로이드 크기 그래프. **(B)** PrimeSurface® ULA 384-well U bottom plate를 사용한 Day 7 스페로이드 크기  
 그래프.

**주의:** 본 애플리케이션 노트에 설명된 모든 실험 단계는 CardioSight®-S에 최적화되어 있으므로, 다른 cell로 수행할 경우 결과를 보장할 수 없습니다.  
 NEXEL은 애플리케이션 노트에 나열된 배지와 시약을 사용할 것을 권장하며, 그렇지 않을 시 같은 결과를 얻을 수 없을 수 있으며 추가적인 기술 지원이  
 어려울 수 있습니다.