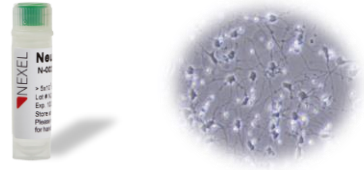


Neural Spheroid Formation Using Neurosight®-S



Introduction

3D 세포 배양은 살아있는 세포와 장기를 모사하는 것을 목표로 합니다. *In-vivo*와 같은 환경을 조성하여 기본적인 *in-vitro* 연구뿐만 아니라 신경감각성 난청, 파킨슨병, 헌팅턴병 등에 대한 연구가 가능하게 되면서 전 세계적으로 활발히 진행되고 있습니다. *In-vivo*와 같은 환경을 만드는 것에 대한 장점 때문에 오늘날 대부분의 연구도 3D 배양을 통한 실험이 주된 연구분야가 되었습니다.

이러한 추세에 맞춰 Neurosight®-S를 이용한 신경 스페로이드 형성 방법을 제시합니다.

Neurosight®-S 는 분화과정이 완료되어 있어, iPSC를 다루어 분화시키는 것보다 제어가 용이합니다. 또한, 세포 해동과 함께 스페로이드 형성이 진행되며 안정적인 스페로이드를 형성합니다. 본 프로토콜을 실험할 때는 **Neurosight®-S User Guide**를 참고하여 주시길 바랍니다.

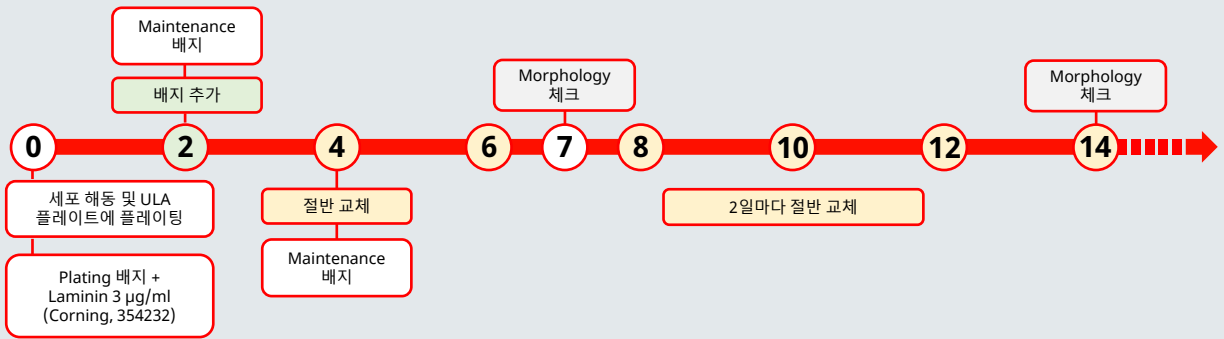


Table 1. Day 0부터 타임라인에 따른 워크플로우

Workflow

Neurosight®-S 는 3 µg/ml Laminin를 넣은 세포-배지 혼합물과 함께 ULA 플레이트에 플레이팅 합니다. Day 2부터 안정적인 스페로이드 형태를 관찰할 수 있습니다. Day 2의 ULA 플레이트에 배지를 추가합니다.

Day 4 이후부터 격일로 배지의 절반을 교체합니다. Day 7에 중간 Morphology 검사를 수행하고 적어도 Day 7 이후에 실험을 진행하는 것이 좋습니다.

Required Consumables

Item	Vendor	Catalog number
Neurosight® -S Neurons	NEXEL	N-001 N-002
Neurosight® -S Media	NEXEL	NMS-001 NMS-002
Laminin, mouse, 1mg	Corning	354232
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 애플리케이션 노트는 'PrimeSurface® 3D 배양: Ultra-Low Attachment Plates'를 사용하여 최적화된 방법입니다.

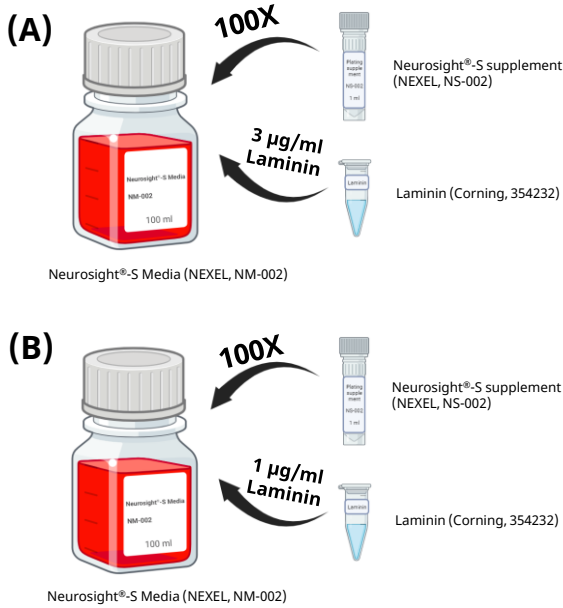


Figure 1. Plating 과 Maintenance 배지 준비
(A) Plating 배지 준비: supplement (NEXEL, NS-002)와 3 µg/ml Laminin (Corning, 354232)을 Neurosight®-S 배지 (NEXEL, NM-002)에 넣는다.
(B) Maintenance 배지 준비: supplement (NEXEL, NS-002)와 1 µg/ml Laminin (Corning, 354232)을 Neurosight®-S 배지 (NEXEL, NM-002)에 넣는다.

Method

스페로이드 형성을 위한 Neurosight®-S 해동 및 플레이팅

1. Neurosight®-S 사용 설명서에 따라 세포를 녹입니다.
2. 원하는 크기의 스페로이드를 형성할 수 있는 적절한 플레이트를 선택하여 준비합니다.
(96-well plate 기반)
3. 3 µg/ml Laminin (Corning, 354232)을 plating 배지에 넣습니다. 한 well 당 50 µl가 들어갈 수 있도록 충분한 양을 만듭니다.
4. 세포 현탁액은 살아있는 세포의 수를 세어 원하는 스페로이드의 크기에 따라 plating 배지에 넣어 준비합니다.
5. 세포가 준비된 plating 배지를 한 well에 50 µl씩 플레이팅하고 외부에 둘러진 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, well 당 20 µl으로 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	690 µm	620 µm	400 µm	320 µm	290 µm	190 µm

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

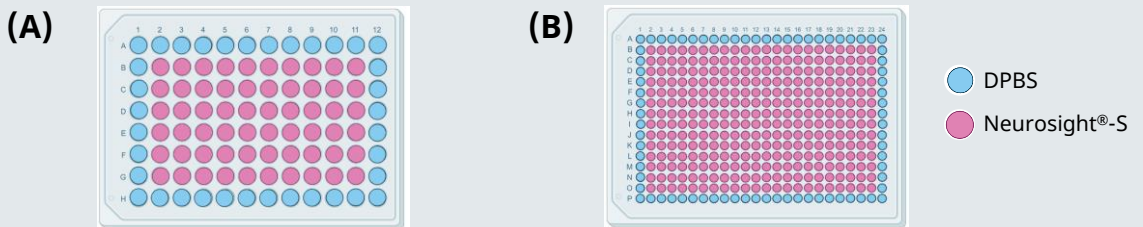


Figure 2. 권장하는 플레이트 디자인
(A) PrimeSurface® ULA 96 well V 바닥 플레이트 (S-bio, #MS-9096VZ).
(B) PrimeSurface® ULA 384 well U 바닥 플레이트 (S-bio, . #MS-9384UZ).

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

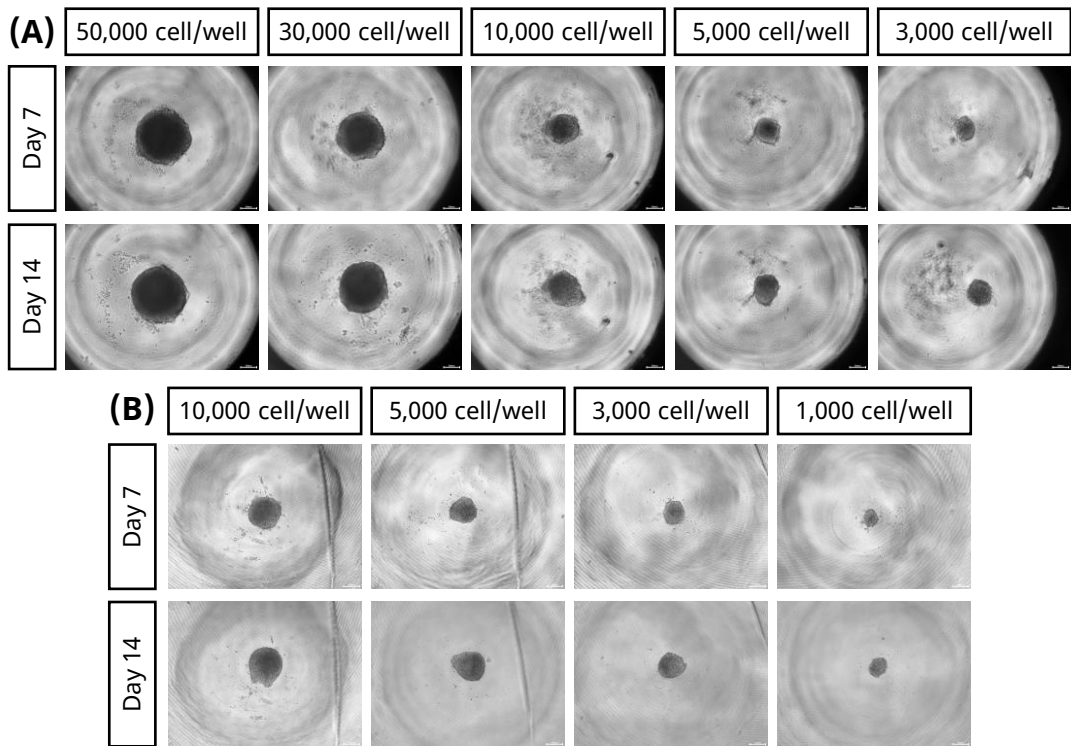


Figure 3. ULA 플레이트를 이용해 크기를 조절한 신경 스페로이드
 위 행의 이미지는 Day 7에서 스페로이드 형성을 나타내고 아래 행의 이미지는 Day 14에서 형성된 스페로이드 형성을 나타냅니다. **(A)** PrimeSurface® ULA 96 well V bottom plate 을 이용한 스페로이드 형성. **(B)** PrimeSurface® ULA 384 well U bottom plate 을 이용한 스페로이드 형성.

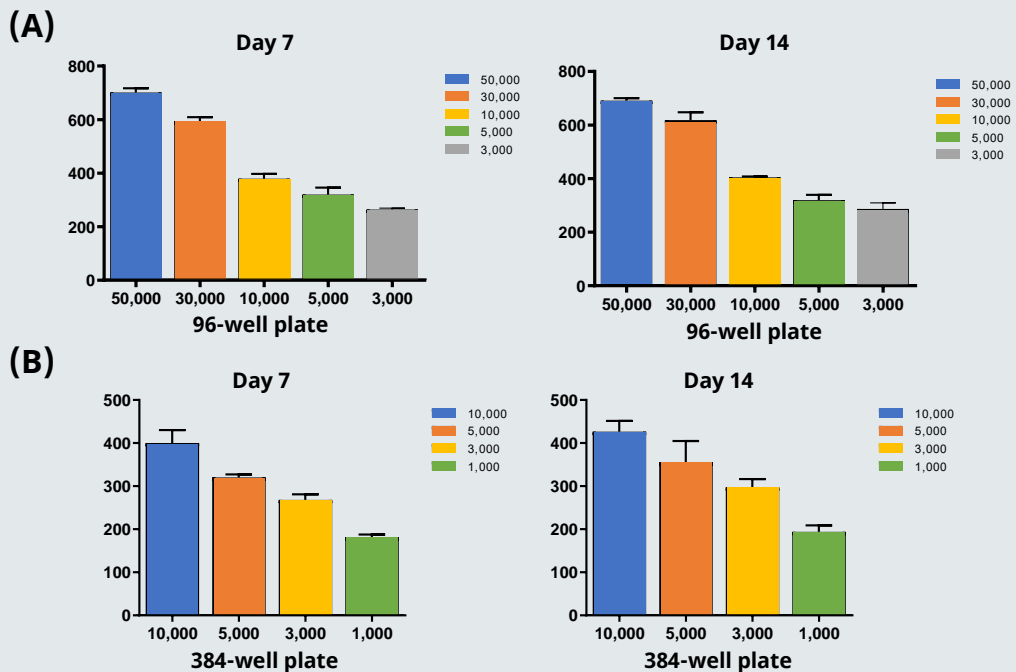


Figure 4. 세포 수에 따른 스페로이드 크기 그래프
 Y 축은 스페로이드의 크기이고, X 축은 well 당 사용된 cell 의 수 입니다. **(A)** PrimeSurface® ULA 96-well V 바닥 플레이트를 사용한 Day 7 스페로이드 크기 그래프 **(B)** PrimeSurface® ULA 384-well U 바닥 플레이트를 사용한 Day 7 스페로이드 크기 그래프

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