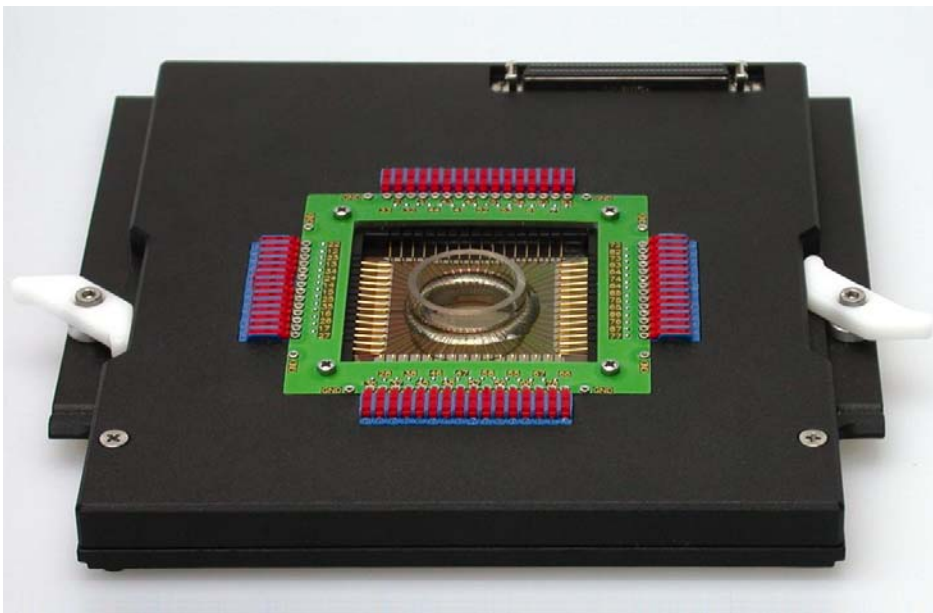


# マルチ電極アレー MEA60

## 電極 & ハードウェア取り扱い説明書



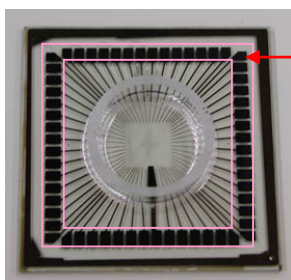
2006 年 6 月版

# 目次

1. 電極ディッシュのアンプへの取り付け	3
2. リファレンス電極	4
3. 刺激装置の接続方法	5
4. 電極ディッシュの親水性処理	7
5. 電極ディッシュの滅菌	8
6. 電極ディッシュのコーティング	9
7. 電極ディッシュの洗浄	12
8. 記録を行う	13
9. 仕様	14

# 1. 電極ディッシュのアンプへの取り付け

- ① MEA 電極ディッシュのコンタクトパッドを、エタノールを湿したキムワイプ等で軽く拭きます。

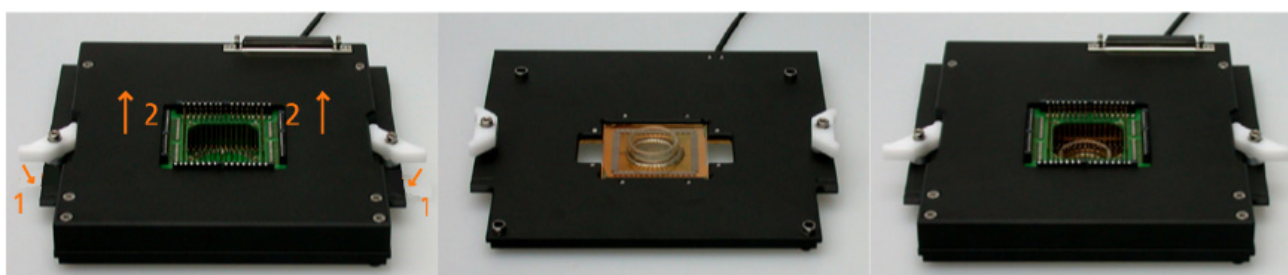


□ の部分がコンタクトパッド。アンプ側のゴールドのコンタクトピンと接触して信号を伝える部位なので、エタノールで油分等を拭いて導通のコンディションを最適に保ちます。

- ② アンプ側のコンタクトピンの先も、エタノールを湿したキムワイプで軽く拭きます。
- ③ コンタクトピン&コンタクトパッドにエタノールの水滴が残らないよう、拭き取るか気乾します。
- ④ 下の写真を参考にアンプの左右の止め具を外し、アンプ上面を持ち上げます。中央のくぼみに電極ディッシュをはめ込みます。縁にかかって斜めにならないようご注意ください。通常タイプの電極ディッシュの方向に極性はありません。

※リファレンス電極組み込み型の電極ディッシュの場合は、リファレンスが向かって左に来るようにセットすると、15 番ピンホールがリファレンス電極に繋がります。

※3D-MEA(剣山型タイプ)などは、顕微鏡で見たときに電極グリッドの 4 隅に「11」「18」「81」「88」とマーキングがしてあります。電極基板上の文字が読める方向にセットしてください。



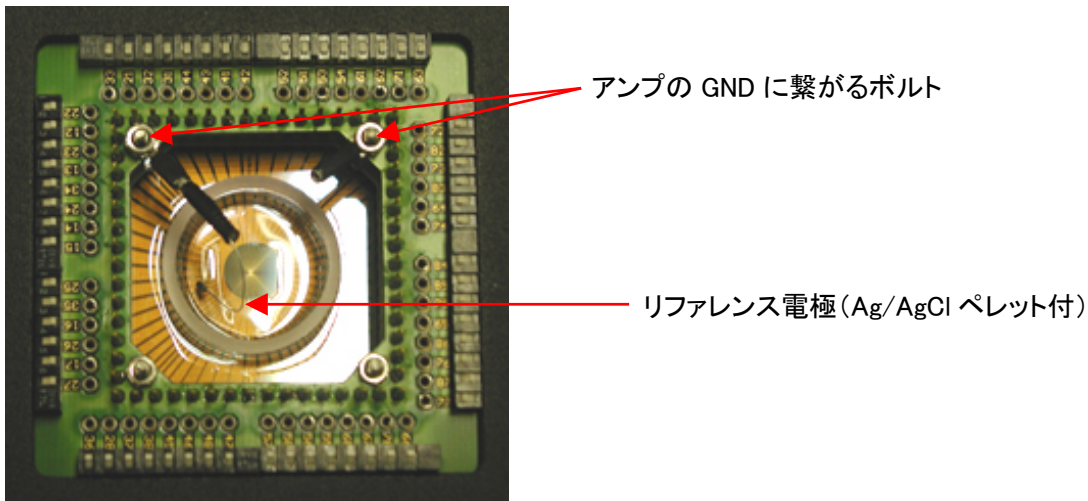
- ⑤ コンタクトパッド上にコンタクトピンが確実に載るように注意しながら、アンプ上面をアンプ下面に押さえ込み、左右の止め具で固定します。

※電極が劣化していないディッシュをセットしてデータ記録装置で見たときに局所的に大きなハムノイズが乗っている場合は、コンタクトパッドとコンタクトピンの接触不良が原因の 1 つとして考えられます。上記手順に従い再度注意深く電極をセットしてください。それでもノイズが無くならない場合、データを見ながら 6 角レンチで左右の止め具の締め付けを調整してください。

## 2. リファレンス電極

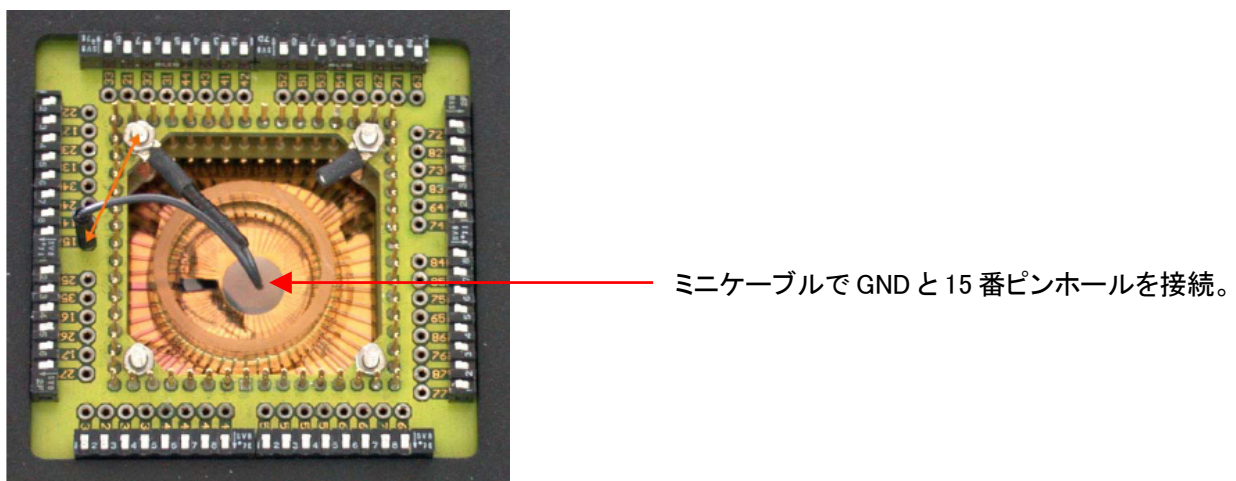
### ＜リファレンス電極組み込み型でない MEA ディッシュの場合＞

電極ディッシュの四隅の位置にグラウンドと導通しているボルトが 4 本立っています。このボルトに取り付けられたピンホールに、付属の「リファレンス電極 (Ag/AgCl ペレット付)」を挿し込み、ペレットをディッシュに張ったバスに浸します。



### ＜リファレンス電極組み込み型の MEA ディッシュの場合＞

付属のミニケーブルで、グラウンドのボルトに取り付けられたピンホールと 15 番のピンホールを接続します。ディップスイッチを倒す必要はありません。MEA ディッシュをセットするときにリファレンス電極が向かって左側に来るように注意して下さい。このタイプのディッシュを用いる利点は、培養細胞などを用いる際に、ディッシュにフタを取り付けてチャンバーを密閉した状態を維持しながら実験が行えるところにあります。ただし、15 番の電極からの記録はできなくなります。

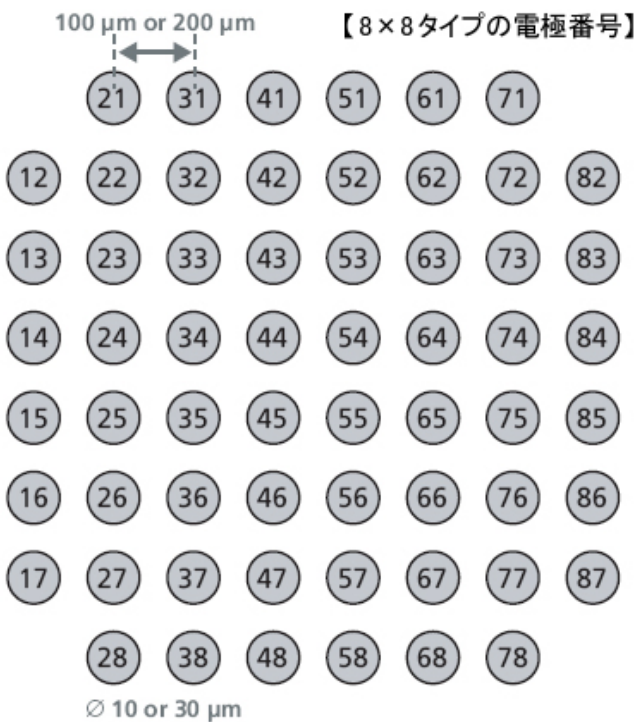


### 3. 刺激装置の接続方法

海馬スライスの LTP 記録や、培養心筋のペーシングなどを行いたい場合、電気刺激出力用の刺激装置をシステムに接続する必要があります。

本システムは電極ディッシュ上の任意の電極を刺激電極として割り当てることが可能です。

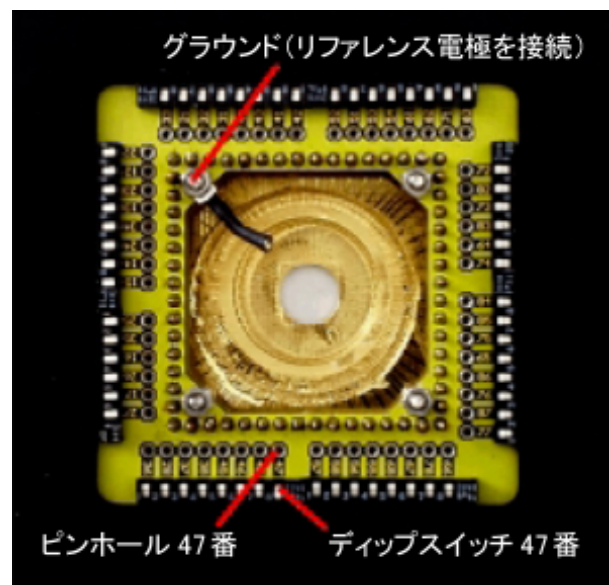
例えば、最も一般的に使用されている 8×8 の格子状配列の MEA ディッシュの場合、以下の様に電極番号が割り振られています。



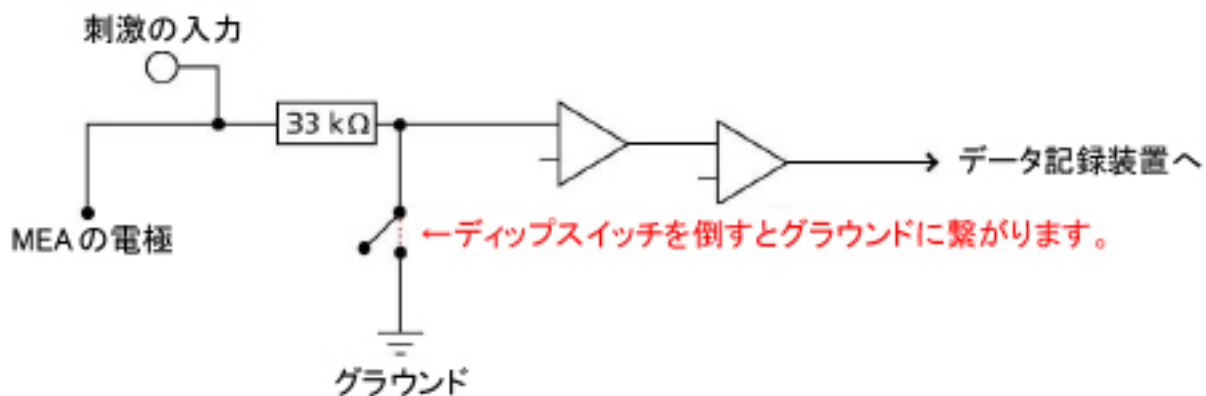
右の写真は、電極ディッシュを MEA1060 アンプにセットした状態の拡大写真です。

電極ディッシュの電極番号と 1:1 に対応する番号が振られた「ピンホール」と「ディップスイッチ」が、電極の周りを取り囲むように配置されています。

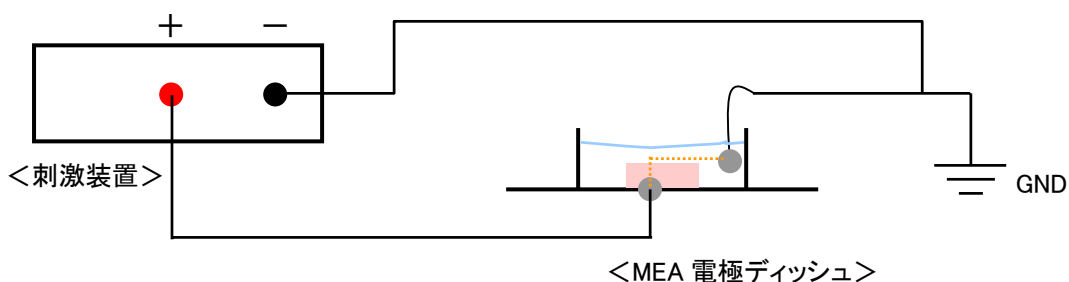
刺激を出力したい電極番号のディップスイッチを手前に倒し、同番号のピンホールに刺激装置からの出力ケーブルを接続します(ピンホール用のオスピンが 2 つシステムに付属しますので、刺激装置のケーブルの先をこちらのオスピンに付け替えて下さい)。通常刺激装置の-側はグラウンドに繋がります。局所の刺激を行いたい場合は、隣り合う 2 つの電極番号のピンホールに刺激装置の+と-を繋いでください。



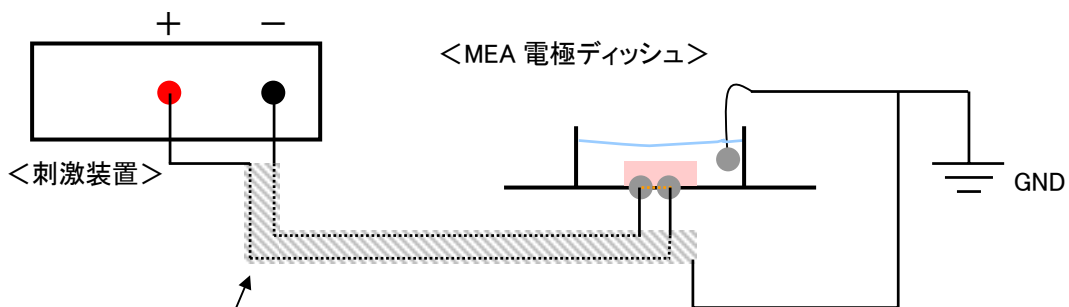
電極-アンプ-データ記録装置までの回路図は以下のようになります。  
 ディップスイッチを手前に倒した状態だとアンプ-刺激入力のラインの途中がグラウンドに繋がり、  
 アンプに許容量異常の電圧がかかるのを防ぎます。  
 刺激を入力する電極番号のディップスイッチは必ず倒してください。



### 【刺激装置の接続例①】



### 【刺激装置の接続例② …局所の刺激を行う場合】



※シールド線を用いるか、アルミホイル等でケーブルを包みます。

## 4. 電極ディッシュの親水性処理

新品の電極ディッシュ、またはいったん親水性の処理をした電極ディッシュでも時間が経ったものは、表面が疎水性となります。この状態だと、組織が電極に接着しにくくなり、データの s/n 比が低くなります。水やバッファを一滴電極ディッシュに落としてみて、馴染んで広がれば親水性、広がらなければ疎水性、というようにチェックを行います。

- ・ 最も単純な方法は、実験を行う 30 分～2 時間以上前に、電極にバッファを浸しておきます。数時間の急性実験の場合はこの方法で十分です。
- ・ 電極ディッシュ上で細胞や組織の培養を行う場合、培養前により入念に親水性の処理を行うことを推奨します。方法として、
  - ① 『プラズマクリーニング』: Harrick Plasma 社の PDC-32G など、プラズマクリーナーを用いる方法です。MEA ディッシュを低バキュームで約 2 分間プラズマクリーナーのチャンバー内でガスプラズマに晒すと表面が極性を持ち、親水性になります。この効果は数日持続します。
  - ② 『プロテインコーティング』: 滅菌後の MEA ディッシュ底面の培養を行うエリアに、滅菌済みの濃縮したタンパク質溶液を約 1ml で湿らせ、30 分静置します。その後、滅菌水でディッシュ内を念入りに洗浄します。
  - ③ 『前培養』: 本実験用の培養を行う前に、同じ細胞で一度数日間の培養を行っておきます。この前培養は本実験用の培養を行う前に捨ててしまい、蒸留水で洗浄した後に再度培養を行うと前培養よりも良い生育状態で細胞培養を行えます。

### <電極ディッシュの保管>

細胞培養による実験を継続して行う場合、電極ディッシュの親水性を維持するために、保管は「滅菌蒸留水に浸け、約 4°C の冷暗所に静置」という方法を取って下さい。

## 5. 電極ディッシュの滅菌

滅菌処理は、急性実験では必要ありません。

下に挙げた以外のタイプの MEA は、「70%エタノール」、「紫外線照射」、「オートクレーブ」、「乾熱滅菌」等の方法で滅菌が行えます。

※高熱による滅菌処理を行えない MEA: 「3D-MEA」「FlexMEA」

…「70%エタノール」、「紫外線照射」により滅菌してください。

…3D-MEA については、56°Cのインキュベータに8時間静置する、という滅菌方法も OK です。

### 『エタノール&紫外線照射による滅菌』

- ① MEA ディッシュを 70%のエタノールですすぎます。
- ② UV ライト付きワークベンチ等で一昼夜気乾 & 滅菌を行います。

### 『オートクレーブ』

134°Cで 3 分間オートクレーブにかけます。

### 『乾熱滅菌』

121°Cのオーブンで 15 分間滅菌します。

### 『熱湯による滅菌』

90 度のお湯に 1 分浸します。

## 6. 電極ディッシュのコーティング

細胞培養および組織培養を行う際に電極ディッシュの底にしっかりと接着させるため、および生育を助けるために、様々な材料によるコーティングの手法を用います。通常、急性スライス・組織の場合はコーティングの必要はありません。

MEA 電極ディッシュのコーティングの目的は基本的に通常のカルチャーディッシュへの培養と同じですので、ごく一般的に行われる培養方法と同様のプロトコールで行います。もしくは、使用者が考案したある組織に対する培養法を、そのまま電極ディッシュ上で行っても概ね問題はありません。

コーティングの多くは数回使用に耐えますので、実験ごとに完全に除去する必要はありません。(ニトロセルロースは除きます。)

以下に、世界中の MEA 電極ディッシュユーザーにより構築されたコーティング方法を示します。

### <ニトロセルロースによるコーティング>

ニトロセルロースによるコーティングは、手早く行える点、多くの種類の細胞および組織のタイプに適応する点、多少疎水的な状態の MEA ディッシュにも用いることができる点などが特徴です。このコーティングにより、細胞・組織はディッシュ底に良く密着します。還流などを行っても組織は簡単にははがれません。

安価、コーティングの除去が簡単であること、単層を形成することなども利点です。

#### 材料

- ・ Protran、もしくは他の標準的なニトロセルロース膜 (Whatman, PerkinElmer)
- ・ 100%のメタノール

#### ニトロセルロース溶液を作成する

→1cm 平方のニトロセルロース膜を 10ml のメタノールに溶かし、保存用ニトロセルロース溶液を作成します。ニトロセルロース溶液は室温 & ポリスチレンチューブ内で保存可能です(数ヶ月など長期にわたり保存すると劣化します)。

実際にコーティング用いる溶液は、保存用溶液をメタノールで 10:1 に希釈して用いてください。

→MEA 電極ディッシュ底の組織をマウントするエリアに、3~5  $\mu$ l のコーティング用溶液を滴下し、拡げます。

メタノールを気乾させると、MEA 上にコーティングの膜が残ります。

## 文献

- Ulrich Egert, Thomas Meyer; Heart on a Chip – Extracellular multielectrode recordings from cardiac myocytes in vitro, “Methods in Cardiovascular Research”, S. Dhein and M.Delmer (eds.)(2004)

## <ポリエチレンイミン(PEI)によるコーティング>

ポリエチレンイミンは単離細胞培養に最適なコーティングで、培養用コーティングとしてポリリジンよりも優れていることが証明されています。ポリエチレンイミンは+の電荷を持った重合体で、ガラス表面の電荷を一から+に変えます。

細胞・組織はポリエチレンイミンによく付きますが、ポリエチレンイミンは多重層を形成するので、還流などに対してはニトロセルロースよりもはがれやすいという性質をもちます。

## 材料

- ポリエチレンイミン溶液(PEI) (Sigma-Aldrich, Inc P3143)
- Boric acid, crystalline (Fishier Scientific A73-500)
- Borax (sodium tetraborate) (Sigma-Aldrich, Inc 80127)
- 1N HCl
- Laminin, 1mg/ml (Sigma-Aldrich, Inc L2020)

## ホウ酸バッファ

- 3.10g boric acid
- 4.75g borax

→1Lの蒸留水に溶かします。1N HClでpHを8.4に調整します。

## PEI 保存用溶液

- ホウ酸バッファにPEI 0.05~0.1%を溶かします

## Laminin 溶液

- メディウムにラミニンを20  $\mu$ g/ml 溶かします

## 手順

- ① 電極ディッシュの細胞・組織をマウントするエリアに500  $\mu$ lのPEI溶液を拡げます
- ② RTで1時間インキュベート、もしくは4°Cで一昼夜静置します。
- ③ PEI溶液を捨て、蒸留水で4回すすぎます。
- ④ 気乾させます。
- ⑤ コーティング後、UVライトで最低1時間滅菌します。

- ⑥ 滅菌済みの Laminin 溶液を MEA に滴下し、37°C で 30 分間インキュベートします。
- ⑦ Laminin を吸引後、すすがずに直接細胞・組織をマウントします。

## 文献

- ・ Ulrich Egert, Thomas Meyer; Heart on a Chip – Extracellular multielectrode recordings from cardiac myocytes in vitro, “Methods in Cardiovascular Research”, S.Dhein and M. Delmar (eds.)(2004)
- ・ Lelong, IH, et al. (1992); J. Neurosci. Res. 32:562–568

## <フィブロネクチンによるコーティング>

フィブロネクチンはより生物学的なコーティング手法で、心筋細胞・組織に最適です。接着度は大変高く、安定して長期の記録が行えます。

## 材料

- ・ フィブロネクチン (BD BioCoat™ Fibronectin Cellware) (BD Biosciences)

## フィブロネクチン溶液を作成する

→蒸留水か PBS に対して 1mg/ml の保存用フィブロネクチン溶液を作成し、4°C で保管します。コーティング用の溶液は、使用前に蒸留水か PBS で 10 μg/ml に調整します。

## 手順

- ① 300 μl のフィブロネクチン溶液で電極ディッシュ表面をカバーし、37°C で 1 時間インキュベートする。
- ② 溶液を吸引し、PBS で 2 度すすぐ。
- ③ コーティング後、直ちに細胞・組織をディッシュにマウントする。

## 文献

- ・ Ulrich Egert, Thomas Meyer; Heart on a Chip – Extracellular multielectrode recordings from cardiac myocytes in vitro, “Methods in Cardiovascular Research”, S. Dhein and M. Delmar (eds.)(2004)

## 7. 電極ディッシュの洗浄

- ・ コーティング無しで行う数時間の急性実験の場合、蒸留水で電極ディッシュをすすぐだけで OK です。
- ・ 必要に応じ、一般的な実験器具の洗浄に用いられる「中性洗剤」を使用して下さい。pH が 7 とかけ離れた洗剤は使用しないでください。
- ・ 上記方法で不十分な場合、超音波洗浄器に短時間かけるという方法も可能ですが、超音波洗浄器が強すぎる場合、電極ディッシュがダメージを受ける可能性がありますのでご注意下さい。
- ・ 3-D MEA(剣山型タイプ)を洗浄する場合、下記の要領で行ってください。
  - ① 蒸留水でよくすすぎます。
  - ② 70%のエタノールに数分浸します。
  - ③ 蒸留水で 1 分すすぎ、エタノールを除去します。
  - ④ 気乾します。
- ・ EcoMEA の洗浄は通常の電極ディッシュと同様の方法で行うか、双眼顕微鏡を見ながら電極を綿棒などで軽く拭ってください。
- ・ ニトロセルロースのコーティングを除去する場合、下記の要領で行ってください。
  - ① 使用後、流水・中性洗剤・酵素系洗剤などで汚れを入念に落とします。
  - ② 電極ディッシュにメタノールを満たし、37°Cのインキュベータ内で 15～30 分静置してニトロセルロースを溶かします。
  - ③ 蒸留水ですすぎます。
- ・ EDTA コラゲナーゼを用いた洗浄法

コラゲナーゼタイプ I (Sigma-Aldrich, Inc : C0130)

0.5mM EDTA

PBS (Gibco / Invitrogen : 14190-144)

- ① PBS に 20U/ml コラゲナーゼタイプ I を溶かす
- ② 電極ディッシュを 0.5mM EDTA で満たし、37°Cインキュベータに 30 分静置します。
- ③ 電極ディッシュを PBS で 3 回すすぎます。
- ④ 電極ディッシュをコラゲナーゼ溶液で満たし、37°Cインキュベータに 30 分静置します。
- ⑤ コラゲナーゼ溶液を捨て、蒸留水で 3 回すすぎます。
- ⑥ 気乾します。

## 8. 記録を行う

本システムを用いて様々な生体組織の細胞外電気信号を記録できます。

- ・ 海馬スライス : EPSP、LTP 等刺激誘発反応の記録など
- ・ 培養神経細胞 : NMDA 等薬液刺激に対する自発スパイク、概日リズム解析など
- ・ 網膜 : 網膜電位、スパイク記録など
- ・ 心筋 : 伝播速度解析、QT 延長解析など
- ・ ES 細胞由来心筋 : 再生・移植の実験など

各アプリケーションの詳細は、下記の Web サイトをご参照下さい。

- ・ アプリケーションノートダウンロードページ ↓

<http://www.brck.co.jp/MCS/applicationnotes1.htm>

- ・ リファレンスリスト掲載ページ ↓

<http://www.brck.co.jp/MCS/publication1.htm>

### <記録のコツ>

電極ディッシュを用いるすべてのアプリケーションに当てはまることですが、

#### **「電極と信号源(細胞)の距離を可能な限り密着させること」**

が大変に重要となります。

- ・ 海馬スライスやその他の神経組織スライスを用いた急性実験では、上からスライスアンカー（銀線等の金属線をリング状にし、ストックキングなどのナイロン線を網状に張ったもの）で押さえることを強くお奨めします。
- ・ 培養細胞では、コーティングにより細胞がディッシュ底にしっかりと密着するように生育させてください。
- ・ その他の組織でも必要に応じて、ディッシュ内に組織を押さえるためのチャンバーを挿入する、組織が潰れないように注意しながらマニピュレータで押さえる等、各アプリケーションに適した「電極と組織を密着させる方法」を適用してください。

## 9. 仕様

<b>&lt;MEA1060 アンプ&gt;</b>	
動作可能温度	10°C～50°C
保存可能温度	0°C～50°C
動作可能湿度	10%～85%
サイズ(W x D x H)	165 x 165 x 20mm
重量	800g
供給電圧	±6～±9V
入力チャンネル数	60
入力許容電圧	0～4mV (標準の 1200 倍ゲイン仕様の場合)
入力インピーダンス	10 <sup>11</sup> Ω
入力ノイズ	<800nV <sub>RMS</sub>
出力チャンネル数	60
出力可能電圧	±5V
出力インピーダンス	300Ω
ゲイン	×1200(標準)
バンド幅	10Hz ～3kHz(標準)
ヒーティング温度	室温～50°C
精度	0.1°C
リカバリータイム	30 秒～2 分
電極底ホールサイズ	通常 8mm (12mm、23mm も選択可能)
温度センサ	PT100
焦点面と顕微鏡テーブルまでの距離	倒立顕微鏡用:3.5mm / 正立顕微鏡用:8mm
<b>&lt;MEA 電極ディッシュ&gt;</b>	
プレートサイズ	49W x 49D x 1H (mm)
重さ	8g
電極材質	TiN / Pt / Au (電極のタイプによる)
電極直径	10 / 20 / 30 / 100 μm (電極のタイプによる)
チャンバーリング	内径 19mm / 外径 24mm / 高さ 6mm / 容量 15ml
インピーダンス	φ30 μm: <50kΩ / φ10 μm: <400kΩ