

## StemPro<sup>®</sup> NSC SFM

GIBCO<sup>®</sup> StemPro NSC SFM は、ヒト神経幹細胞 (NSC) の増殖用に開発されました。StemPro NSC SFM を用いることで、多分化能 (ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化能) を維持しながら、ヒト NSC の長期的な継代増殖が可能となります。StemPro Neural 添加剤は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) およびグリア前駆細胞 (GRP) の培養にも使用できます。

内容	カタログ番号	内容量
<b>StemPro NSC SFM</b> には以下の試薬が含まれます。	<b>A10509-01</b>	<b>1 Kit</b>
KnockOUT <sup>™</sup> DMEM/F12	12660-012	1 x 500 mL
FGF Basic REC HU	PHG0024	1x10 ug
EGF Recombinant Human	PHG0314	1x10 ug
StemPro Neural 添加剤	A10508-01	1 x 10 mL

### 使用目的

研究用です。注意: ヒトまたは動物の診断や治療に使用することはできません。

### 注意事項

StemPro Neural 添加剤は、沈殿物の生成を避けるため、完全に解凍するまで 37°C で解凍させることを推奨します。解凍した試薬は、2~8°C、暗所で保存した場合、4 週間安定です。また、後日使用する場合は再凍結することも可能です。

完全培地は必要量を分注して使用することを推奨します。完全培地を 37°C 条件に何回も曝露することは避けてください。

Basic FGF (カタログ番号 PHG0024) は 37°C では不安定です。製品分析シートに従って適切に保存してください。

### 保存

StemPro Neural 添加剤: -5~-20°C で保存。遮光

KnockOUT<sup>™</sup> DMEM/F12: 2~8°C で保存。遮光。  
FGF Basic REC HU & EGF Recombinant Human: 2~8°C で保存。

### 有効期限

StemPro Neural 添加剤: 12 カ月  
KnockOUT<sup>™</sup> DMEM/F12: 12 カ月  
FGF Basic REC HU & EGF Recombinant human: 12 カ月

### 培養環境

StemPro NSC SFM 完全培地中でヒト神経幹細胞を培養する場合の標準的な培養条件は、CO<sub>2</sub> 濃度 4~6%、36~38°C です。CELLstart<sup>™</sup> でコーティングした培養フラスコ等 (T25 フラスコなど) または未処理フラスコ (ニューロスフェア培養系) を用いて、StemPro NSC SFM 完全培地中で、通常の無菌環境下で培養可能です。培養フラスコ内のエアレーションが適切に行われていることを確認してください。培養液は過度に光に当てないように注意してください。

### 培地の調製

StemPro NSC SFM 完全培地は、KnockOUT<sup>™</sup> DMEM/F12 に StemPro Neural 添加剤、EGF、bFGF、および GLUTAMAX<sup>™</sup>-I の添加が必要です。調整した完全培地は、暗所、2~8°C で保存した場合、4 週間安定です。

- 完全培地 500 mL を作製するには、KnockOUT<sup>™</sup> DMEM/F12 485 mL に StemPro Neural 添加剤 10 mL を無菌的に添加します。
- bFGF および EGF を無菌的に添加します。チューブを完全培地でリンスして完全培地 500 mL に加えます。
- 200 mM GLUTAMAX<sup>™</sup>-I (カタログ番号 35050) 5.0 mL を完全培地に無菌的に添加します。
- 必要に応じて、抗生物質-抗真菌剤溶液 (カタログ番号 15240) を 10 mL/L の割合で完全培地に添加してください。

## 凍結保存ヒト NSC の解凍:

1. 凍結細胞バイアルを 37°C の恒温槽で迅速に解凍します。
2. 凍結保存バイアルの細胞溶液をすべて 50 mL コニカルチューブに移します。
3. このコニカルチューブに 37°C で温めた StemPro NSC SFM 完全培地 4 mL を 1 秒間に約 1 滴の割合で、穏やかに混合しながら添加します。その後、温めた培地 5 mL を添加します。
4. 凍結保存剤を除去するため、チューブを 200 × g で 4 分間遠心し、上清を取り除きます。
5. 温めた StemPro NSC SFM で細胞を穏やかに再懸濁し、チューブの細胞溶液をすべて CELLstart™ でコーティングした培養フラスコに移します。**詳細は「培養フラスコの CELLstart™ コーティング」の項をご覧ください。**
6. CO<sub>2</sub> 濃度 4~6%、36~38°C でインキュベートします。
7. 解凍から 24 時間後に培地を交換してください。**詳細は「StemPro NSC SFM による細胞の継代培養」の項をご覧ください。**

注: StemPro NSC SFM で培養した細胞の解凍については、初回の播種する細胞数を  $1 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> 以上にするを推奨します。

## StemPro NSC SFM による細胞の継代培養

StemPro NSC SFM は、胎児組織から単離したヒト NSC または胚性幹細胞由来のヒト NSC の継代培養用に開発されました。アプリケーションごとに至適培養条件を決定する必要があります。

OPC 細胞および GRP 細胞を培養する場合は、「**培地の調製**」の項のプロトコールに従って完全培地を調製し、EGF を添加する代わりに PDGF-AA (カタログ番号 PHG0035) を 10 ng/mL の濃度で添加します。

注: 以下に詳述するプロトコールは T25 培養フラスコ (25 cm<sup>2</sup>) で行う培養プロトコールです。容量は、必要な容器の大きさによって調整する必要があります。ニューロスフェア浮遊培養については、通常のニューロスフェア培養プロトコールに従って StemPro NSC SFM を用いることができます。

## A. 培養フラスコの CELLstart™ コーティング

注: 最適な細胞接着のため、CELLstart™ をカルシウムおよびマグネシウム含有の DPBS (カタログ番号 14040) で希釈する必要があります。

1. CELLstart™ (A10142) を DPBS で 1:100 の割合で希釈します (例: DPBS 5 mL に CELLstart™ を 50 uL 添加)。穏やかにピペッティングして混合します。**ボルテックスは避けてください。**T25 培養フラスコに CELLstart™ 溶液を 5 mL ずつ添加しコーティングします。
2. CELLstart™ 溶液を添加した培養フラスコをインキュベーターに入れ、CO<sub>2</sub> 濃度 4~6%、36~38°C で 60 分間インキュベートします。
3. インキュベーション後、使用するまでフラスコをインキュベーター外に出しておきます。使用直前に CELLstart™ 溶液を除き、StemPro NSC SFM 完全培地を加えてください。プレートは、コーティング後、Parafilm でしっかりと密封して 2~8°C に保存しておくことも可能です。使用直前まで CELLstart™ 溶液は除かないでください。

## B. StemPro NSC SFM での細胞増殖

1. 顕微鏡で培養フラスコを観察し、細胞が継代可能な状態 (約 90%コンフルエント) であることを確認します。
2. 細胞剥離剤 (TrypLE™ または StemPro® Accutase®) および StemPro NSC SFM 完全培地を使用前に予め 37°C に温めておきます。
3. ピペットを用いて培地をフラスコから除きます。
4. 細胞を 3 mL の DPBS (カタログ番号 14190) で洗浄し、洗浄後この DPBS を除きます。
5. T25 フラスコに細胞剥離剤 1.0 mL を添加し、フラスコを全方向に傾けて溶液が均等に行き渡るようにします。室温で 2~5 分間インキュベートします。
6. 細胞が剥離したら (フラスコを傾け剥離した細胞が移動することにより確認できます)、穏やかにピペッティングして細胞を解離させます。細胞剥離剤を完全培地 9 mL で希釈して、細胞の剥離反応を停止させます。細胞懸濁液をコニカルチューブに移します。
7. チューブを 200 × g で 4 分間遠心します。

8. 上清を除き、適量の温めた StemPro NSC SFM 完全培地に細胞を再懸濁します。この細胞懸濁液からサンプルを1部取り、適切な計数法(血球計など)により細胞を計数します。
9. CELLstart™のコーティングプロトコールに従って、各コーティング済みフラスコからCELLstart™コーティング溶液を除きます。StemPro NSC SFM 完全培地 5 mL を添加します。
10.  $5 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>( $1.25 \times 10^6$  細胞/T25 フラスコなど)になるように、CELLstart™をコーティングしたフラスコに十分な量の細胞懸濁液を添加します。フラスコを穏やかに振って細胞を均等に分散させます。
11. インキュベーターに培養フラスコを入れ、CO<sub>2</sub>濃度 4~6%、36~38°C でインキュベートします。
12. 最適な培養条件と細胞増殖を実現するため、2日ごとに、新しいStemPro NSC SFM 完全培地に交換してください。

### StemPro NSC SFM 中の細胞の凍結保存

1. StemPro NSC SFM 完全培地に 20% DMSO を添加し、NSC 凍結保存液を調製した後、使用するまで 4°C で保存します。凍結保存培地は使用日に作製してください。
2. 最適な最終細胞密度 ( $2.0 \times 10^6$  細胞/mL、1 mL/バイアルなど)になるように凍結保存培地を調整します。
3. 剥離した細胞溶液を 200 × g で 4 分間遠心します。
4. 細胞ペレットを必要量の半分の量の完全培地で再懸濁します。残り半分の量の 20% DMSO 含有培地を滴下し、DMSO の最終濃度が 10% になるようにします。
5. 懸濁液を凍結保存バイアルに分注します。
6. 標準的なプロトコール(1分間に1°Cずつ低下)に従って、凍結保存します。
7. 凍結細胞を液体窒素に移します。細胞は -125~-200°C での保存を推奨します。

### 関連製品

CELLstart(A10142)

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS), カルシウム, マグネシウム, フェノールレッド(1×)非含有, 液体(14190)

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS), カルシウム, マグネシウム含有(1×), 液体(14040)

抗生物質-抗真菌剤(100×)(15240)

GlutaMAX™-I, 200 mM(100×), 液体(35050)

TrypLE Express(1×), 液体, フェノールレッド非含有(12604)

PDGF-AA (PHG0035)

StemPro® Accutase® (A11105)

### Technical Support

For additional product and technical information, such as Material Safety Data Sheets (MSDS), Certificate of Analysis, etc., please visit our website at [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com). For further assistance, please e-mail our Technical Support team at [Techsupport@Invitrogen.com](mailto:Techsupport@Invitrogen.com)

GIBCO® and StemPro® are registered trademarks of Life Technologies Corp.

CELLstart™, GLUTAMAX™ KNOCKOUT™ & TrypLE™ are trademarks of Life Technologies Corp.

Accutase® is a registered trademark of ICT Inc.

Parafilm® is a registered trademark of Pechiney Plastic Packaging, Inc.

### Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: [outlicensing@invitrogen.com](mailto:outlicensing@invitrogen.com)

May 2009

Form No. 5020