

STEMPRO[®] MSC SFM

GIBCO[®] STEMPRO MSC SFM は、ヒト間葉系幹細胞(MSC)の増殖用に開発されました。STEMPRO MSC SFM を用いることで、多分化能(骨形成、軟骨形成、脂質形成細胞系への分化能)を維持しながら、ヒト MSC を長期的に増殖させることが可能となります。

内容	カタログ番号	内容量
STEMPRO MSC SFM には以下の試薬が含まれます。	A10332-01	1 Kit
STEMPRO MSC SFM 基礎培地	A10334-01	1 x 500 mL
STEMPRO MSC SFM 添加剤	A10333-01	1 x 75 mL

注:STEMPRO MSC SFM はキットとして提供しており、構成品の個別販売はしていません。

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

使用前にSTEMPRO MSC SFM 添加剤を2~8°Cで1晩かけて解凍させることを推奨します。解凍した試薬は、直ちに使用するか、未使用分を分注(15 mL)して-5~-20°Cで保存してください。凍結と解凍の繰り返しは避けてください。

STEMPRO MSC SFM 完全培地(基礎培地、添加剤、L-グルタミン含有)は、暗所、2~8°Cで保存した場合、4週間安定です。

保存

STEMPRO MSC SFM 基礎培地:2~8°Cで保存。遮光。

STEMPRO MSC SFM 添加剤:-5~-20°Cで保存。遮光。

有効期間

STEMPRO MSC SFM 基礎培地:12ヵ月間

STEMPRO MSC SFM 添加剤:12ヵ月間

培養条件

STEMPRO MSC SFM 完全培地中でヒト間葉系幹細胞を培養する場合の標準的な条件は、CO₂濃度4~6%、36~38°Cです。CELLstart[™]でコーティングした培養フラスコ等(T25 フラスコなど)を用いて、STEMPRO MSC SFM 完全培地中で、通常の無菌環境下により培養可能です。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注意してください。

培地の調製

STEMPRO MSC SFM 基礎培地は、STEMPRO MSC SFM 添加剤およびL-グルタミンの添加が必要です。

- 完全培地 100 mL を調整するためには、STEMPRO MSC SFM 基礎培地 84 mL にSTEMPRO MSC SFM 添加剤 15 mL を無菌的に添加します。
- 完全培地の使用前に、L-グルタミン(200 mM)(25030)またはGLUTAMAX[™]-I(200 mM)(35050)1.0 mL を無菌的に添加します。
- 必要な場合は、ゲンタマイシン溶液(15710)50µL を完全培地に添加します。

凍結保存ヒト MSC の解凍:

- 凍結細胞バイアルを37°Cの恒温槽で迅速に解凍してください。
- 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てください。
- このコニカルチューブに予め37°Cで温めたSTEMPRO MSC SFM 完全培地5~10 mLを10秒毎に約3~5滴の割合で慎重に添加します。添加する毎に、穏やかに混合してください。
- このコニカルチューブの溶液をすべてCELLstart[™]でコーティングした組織培養フラスコに移してください。**コーティングの詳細は「培養フラスコのCELLstart[™]コーティング」の項をご覧ください。**
- CO₂濃度4~6%、36~38°Cでインキュベートしてください。
- 解凍から24時間後に培地を交換してください。**詳細は「STEMPRO MSC SFM による細胞の継代培養」の項をご覧ください。**

STEMPRO MSC SFM による細胞の培養条件

STEMPRO MSC SFM は、ヒト骨髄由来 MSC の初代培養細胞の分離および増殖用に開発されました。STEMPRO MSC SFM の最適な細胞濃度は 1.0×10^4 細胞/cm² 以上になります(「STEMPRO MSC SFM での細胞増殖」項のステップ 11 をご覧ください)。播種密度が低いと、細胞増殖速度が遅くなる可能性があります。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。

STEMPRO MSC SFM でヒト MSC を継代する場合、継代前に、細胞が 60~80%コンフルエント、細胞生存率が 90%以上、増殖速度が対数増殖期であることを推奨します。至適以下の条件で培養すると、十分な増殖が得られない可能性があります。

最適な培養条件と細胞増殖を実現するため、2日おきに新しいSTEMPRO MSC SFM 完全培地に交換してください。

注: 以下に詳述するプロトコールは T25 培養フラスコ(25 cm²)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従って調整する必要があります。

A. 培養フラスコの CELLstart コーティング

1. CELLstart™ (A10142)を DPBS(14190)で 1:100 の割合で希釈します(例: DPBS 5 mL に CELLstart™を 50µL 添加)。穏やかにピペティングして混合してください。**ボルテックスは避けてください。**各 T25 培養フラスコに調整した CELLstart™溶液を 5 mL ずつ添加することにより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、CO₂ 濃度 4~6%、36~38°C で 60 分間インキュベートしてください。
3. インキュベーション後、使用するまでフラスコは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 MSC SFM 完全培地を加えてください。

B. STEMPRO MSC 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(80%コンフルエント以下)であることを確認します。
2. TrypLE™および STEMPRO MSC SFM を使用前に 37°C に温めておきます。
3. ピペットを用いて現在の培地をフラスコから除いてください。
4. 細胞を DPBS で洗浄し、洗浄後 DPBS を除いてください。

5. T25 フラスコに TrypLE を 1.0 mL 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。細胞に TrypLE を添加して、36~38°C のインキュベーター内で、5~10 分間インキュベートしてください。
6. インキュベーション後、フラスコを顕微鏡で観察し、細胞の剥離状態を確認します。必要に応じてフラスコを強めにたたき、細胞の剥離を促します。
7. 細胞が剥離したら、フラスコ内が完全に浸る量の DPBS を添加します。細胞の懸濁液を滅菌済み 15 mL コニカルチューブに回収します。フラスコを強めにたたき、DPBS で再度洗浄した後、懸濁液を回収します。
8. チューブを 1500 rpm(466 x g)で 5 分間遠心します。
9. DPBS を除き、適量の温めた STEMPRO MSC 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一部取り、適切な計数法(血球計など)により細胞を計数します。
10. 各コーティング済みフラスコから CELLstart 溶液を除去し(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)、STEMPRO MSC SFM 完全培地 5 mL を添加してください。
11. 1×10^4 細胞/cm²(2.5×10^5 細胞/T25 フラスコ)になるよう各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が均等に分散するようにします。
12. インキュベーターに培養フラスコを入れ、CO₂ 濃度 4~6%、36~38°C で 5~10 分間インキュベートします。
13. 2日おきに、温めた STEMPRO MSC SFM 完全培地に交換します。

STEMPRO MSC SFM 中の細胞の凍結保存

1. STEMPRO MSC SFM 基礎培地に 25% STEMPRO MSC SFM 添加剤および 10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を添加し、凍結保存液を調製します。
2. 回収した細胞ペレットに、冷やした凍結保存液を添加してペレットを穏やかに再懸濁し、その懸濁液を直ちに凍結保存バイアルに移します(1.0×10^6 細胞/mL、0.5 mL/バイアルを推奨します)。
3. 凍結保存バイアルを冷凍コンテナ内で -70°C に 1 晩置きます。
4. 凍結保存バイアルを液体窒素中に移すことにより長期保存することができます。凍結細胞の解凍については「凍結保存ヒト MSC の解凍」の項をご覧ください。

注: STEMPRO MSC SFM で培養した細胞を解凍する場合については、初回の播種する細胞数を 2×10^4 細胞/cm² 以上を推奨します。

品質管理

STEMPRO MSC SFM 基礎培地および STEMPRO MSC SFM 添加剤は、ヒト MSC を用いた細胞増殖アッセイにより性能を試験済みです。このほかに、STEMPRO MSC SFM 基礎培地および STEMPRO MSC SFM 添加剤についての標準的評価として、エンドキシンレベル、pH、浸透圧を検査し、細菌および真菌のコンタミネーションの有無についての試験を行っています。

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)
ゲンタマイシン溶液(10 mg/mL), 液体(15710)
L-グルタミン, 200 mM(100×), 液体(25030)
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)
トリパンブルー色素(15250)

ウシ胎児血清, MSC 用(12662)
STEMPRO 脂肪細胞分化キット(A10070-01)
STEMPRO 骨形成分化キット(A10072-01)
STEMPRO ヒト脂肪由来幹細胞キット(R7788)
MesenPRO™ RS 培地(12746)

Contacts

For further information on this or other GIBCO products, contact Technical Services at the following:

United States TECH-LINESM: 1-800-955-6288

Canada TECH-LINE: 1-800-757-8257

Europe: eurotech@invitrogen.com

Outside the U.S. and Canada, refer to the GIBCO products catalog for the TECH-LINE in your region.

You may also contact your Invitrogen Sales Representative or our World Wide Web site at www.invitrogen.com.

GIBCO[®] and STEMPro[®] are registered trademarks of the Invitrogen Corp.

CELLstart[™], GLUTAMAX[™] & TrypLE[™] are trademarks of Invitrogen Corp.

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

April 2008

Form No. 5019