

사용자 매뉴얼

제품명 : StemFit® Basic02

제품코드 : AJ200A/B

다카라코리아바이오메디칼 (주)

본 매뉴얼은 제조사인 Ajinomoto로부터 원본을 제공받아 제작되었습니다.

자세한 문의는 다카라코리아 고객센터(02-2081-2510, support@takara.co.kr)로 문의해주세요.

본 제품은 일본 교토대학교 줄기세포연구소인 CiRA와 공동개발한 배지로, human ES/iPS cell 배양 배지이다.

본 제품은 차세대 hiPSC 연구를 위해 기존 stem cell 전용 배지에서 불가능하였던 single cell expansion 능력을 구현하였고, Xeno-free, Feeder-free system을 기본으로 개발되었다.

[Kit Components]

1. Liquid A (400 ml), Liquid B (100 ml)

※ 본 제품내에는 human bFGF와 plate coating을 위한 reagent가 포함되어 있지 않으므로 별도 준비해야 함.

[용량]

Code	제품명	용량
AJ200A	StemFit® Basic02	500 ml
AJ200B		500 ml x 6

[보관 및 배송 온도]

-20 °C

[실험방법]

1. Huma iPS/ES 세포 유지 및 증식을 위한 배지 준비

StemFit® Basic02 (이하 Basic02)는 Basal 배지 "Liquid A"와 첨가물 "Liquid B"로 구성된 제품이다.

제품은 냉동 상태로 제공되며, 사용 전까지 -20°C 이하의 온도에 보관해야 한다.

배지 준비 시 cross contamination을 주의한다.

[배지 준비]

- 1) 사용 전에 냉동 상태의 "Liquid A"와 "Liquid B"를 상온(15-25°C)에서 흔들어가며 녹인다.
※ 주의 : "Liquid B"를 37 °C에서 해동하면 성분의 분해를 촉진시킬 수 있으므로 주의한다.
- 2) "Liquid B" 전량을 "Liquid A"에 첨가하여 완전히 섞이도록 혼합한다.
- 3) 잘 섞은 배지는 소량씩 분주하여 보관하며, 최대 6개월까지 -20 °C에서 보관 가능하다.
※ 참고: 혼합한 배지는 45 ml를 50 ml 튜브에 담아 -20°C에서 보관.
- 4) 배지 사용시에는 전날 냉장실(4°C)로 옮겨 천천히 해동한 후 사용한다.
- 5) Human FGF2는 최종농도가 100 ng/ml가 되도록 첨가한다.
※ 비교: 세포의 spontaneous differentiation이 일어난다면 세포주에 맞게 Human FGF2의 농도를 조절(최대 100 ng/ml)한다.
- 6) 해동한 배지는 2-8°C의 냉장실에 보관하며, 일주일간 사용 가능하다.
(※ 참고: 차광보존권장)
- 7) 사용 전 배지를 실온으로 따뜻하게 한 후 즉시 사용한다.

2. 계대 배양 프로토콜

1) 본 제품 외에 필요한 시약

- * **iPSC growth factor:** Human FGF2 (Peprotech, #100-18B)
- * **Cell dissociation reagent:** Acutase (StemCell Technologies, #07920)
 - TrypLE Select 사용가능
- * **Plate coating matrix:** LDEV-free hESC certified Geltrex(Thermo Fisher Scientific, #A1413302), vitronectin, laminin-521, laminin-511 및 laminin-511 E8등도 사용 가능
- * **ROCK inhibitor:** Y27632 (Tocris, #1254)

※ 참고: 세포를 다른 배양 시스템에서 StemFit® 시스템으로 옮길 때는 계대 전일, 기존 사용하던 배지를 Basic02 + Human FGF2로 교체한다. 계대시에 세포주에 맞게 세포 밀도 조절 필요.

2) 계대배양

- (1) 배양플레이트 코팅 : LDEV-free hESC certified Geltrex*를 1:100의 비율로 차가운 DMEM/F-12에 넣은 후 즉시 섞는다. Geltrex 혼합물을 6 well plate의 1 ml/well로 첨가 후, 37°C 에서 최소 1시간 이상 배양한 후 사용한다.
 - * Matrigel, vitronectin, laminin-521, laminin-511 및 laminin-511E8 등 기타 매트릭스로 대체 가능
- (2) 배양하고 있던 hPSC 세포 plate에서 배지를 제거하고 2 ml/well의 PBS로 세척한다.
- (3) 세척한 PBS를 제거하고 Accutase(TrypLE Select로 대체 가능) 500 µl를 첨가 후, 10분 동안 37°C에서 배양하여 cell이 떨어지도록 한다.
- (4) 15ml 튜브에 Y27632를 첨가한 Basic02 + Human FGF2 용액 500 µl을 준비한다. (Y27632 최종 농도: 10 µM)
- (5) Detached cell을 pipette으로 up & down하여 세포를 완전히 분리한 후, (4)에서 준비한 15 ml 튜브 (Y27632가 포함된 Basic02 + Human FGF2 500 µl)로 옮긴다.
- (6) Cell counter를 이용하여 세포수를 정확히 측정한다.
- (7) 실온에서 300 g로 4분 동안 원심분리한다.
- (8) 상층 배지를 제거하고 세포를 1,000 cells/µl의 농도로 현탁한다.
- (9) (1)에서 준비한 6 well plate에서 Geltrex을 제거하고, Y27632를 포함한 Basic02 + Human FGF2를 1.5 ml/well로 첨가 (Y27632 최종 농도: 10 µM) 한다.
- (10) 10-20 µl의 현탁된 세포를 새로운 well에 바로 첨가 (10,000-20,000 cells/well) 한다.
- (11) 세포를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 하루 동안 배양한다.
- (12) 다음 날 배지를 제거하고 Basic02 + Human FGF2(1.5 ml/well)를 첨가한다 (Y27632 불필요)
- (13) 계대 배양 4일, 6일 후에 Basic02 + Human FGF2(1.5ml/well)로 배지 교체한다.
- (14) 7일마다 계대 배양한다.

