

FCeM[®] 三次元拡大培養

— FCeM[®] Advance Preparation Kit —

FOR RESEARCH USE ONLY



Nissan Chemical
CORPORATION

1. 概要

FCeM® Advance は既存培地と同等な低い粘性を示しながら、細胞を培養液中に均一に分散させます。非接着性のシングルセルに限らず、接着性細胞及びスフェア状の細胞塊を浮遊させながら培養することが可能で、非接着状態での細胞の増殖や機能を維持／促進します。

2. 培養実績

FCeM® Advance を用いて下記細胞種について三次元培養を行った実績があります。

細胞名	由来	販売元
Jurkat E6.1 Human leukaemic T cell lymphoblast	ヒトT細胞性白血病	DS ファーマバイオメディカル株式会社
A549 Human Caucasian lung carcinoma	ヒト肺基底上皮腺癌細胞	DS ファーマバイオメディカル株式会社
NHDF Human Dermal Fibroblast	正常ヒト新生児包皮皮膚繊維芽細胞	倉敷紡績株式会社
hMSC Human Mesenchymal Stem Cells	ヒト骨髄由来間葉系幹細胞	ロンザジャパン株式会社

3. 細胞培養

代表例として Jurkat E6.1 細胞及び A549 細胞を用いた培養方法及び細胞回収方法を紹介します。

3-1. Jurkat E6.1 細胞

- ・ 播種条件 播種濃度： 5.0×10^4 cells/mL、10~30 mL/flask
培養容器： Falcon® ベントキャップタイプフラスコ 250 mL (#353136)

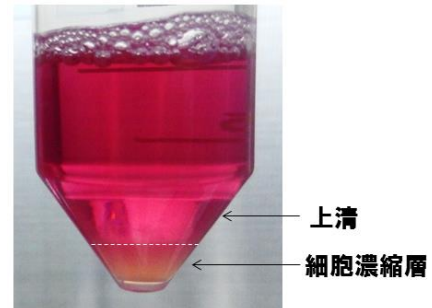
【DAY 0 細胞播種】

- ・ 予め血清や抗生物質、増殖因子など加えた細胞培養用の培地を用いて、FCeM™ Advance Preparation Kit により FP003 添加培地を調製する。(培地作製プロトコルを参照下さい)
- ・ 使用前に 37°C に加温する。気泡が発生した場合は、数回転倒混和して全体を均一にする。
- ・ 接着条件にて培養した対数増殖期にある Jurkat 細胞を 5.0×10^5 cells 準備し、遠心分離 (200~400×g、3~5min) を行った後に上清を除去する。
- ・ ペレット状になった Jurkat 細胞へ FP003 培地を 10 mL 添加して、数回ピペッティングを行い再懸濁させる。
- ・ 細胞が懸濁した FP003 添加培地を培養容器へ播種し、インキュベーター内にて所定日数培養する。



【DAY 3 または 4 継代】

- ・ 所定日数培養後の細胞懸濁液を 50 mL コニカルチューブへ集め、軽くピペッティングして均一にする。
- ・ 細胞懸濁液（約 10 mL）へ Harvesting Buffer 1 mL（懸濁液に対して 10 vol%）を添加し、細胞懸濁液全体をピペッティングにより均一化した後、40 μm セルストレーナーへ一回通す。（この操作は細胞懸濁液全量を数回ピペッティングすることでも代替できます。詳しくは A549 培養法を参照下さい）
- ・ Harvesting Buffer を添加した細胞懸濁液を遠心分離（SLOW DECEL モード、300 \times g、5 min）へかける。
- ・ コニカルチューブ下層へ濃縮された細胞懸濁層を残して、上清を除去する。
- ・ 細胞濃縮液へ FP003 添加培地を 10 mL 加えて、ピペッティングにより再懸濁させる。
- ・ 細胞濃度を計測し、 5.0×10^4 cells/mL の播種条件となるように FP003 添加培地を加えて、ピペッティングにより細胞懸濁液を均一にする。
- ・ 細胞懸濁液を培養容器へ 10 ~ 30 mL/flask となるように播種し、インキュベーター内にて所定日数培養する。



3-2. A549 細胞

- ・ 播種条件 播種濃度： 1.0×10^5 cells/mL、10~30 mL/dish
 ディッシュ： コーニング社製低吸着ディッシュ（#3262、10cm）

【DAY 0 細胞播種】

- ・ 予め血清や抗生物質、増殖因子など加えた細胞培養用の培地を用いて、FCeM™ Advance Preparation Kit により FP003 添加培地を調製する。（培地作製プロトコールを参照下さい）
- ・ 使用前に 37°C に加温する。気泡が発生した場合は、数回転倒混和して全体を均一にする。
- ・ 接着条件にて培養した対数増殖期にある A549 細胞を 1.0×10^6 cells 準備し、遠心分離（200~400 \times g、3~5min）を行った後に上清を除去する。
- ・ ペレット状になった A549 細胞へ FP003 培地を 10 mL 添加して、数回ピペッティングを行い再懸濁させる。
- ・ 細胞が懸濁した FP003 添加培地を培養容器へ播種し、インキュベーター内にて所定日数培養する。

【DAY 3 または 4 継代】

- ・ 所定日数培養後の細胞懸濁液を 50 mL コニカルチューブへ集め、軽くピペッティングして均一に



する。

- 細胞懸濁液（約 10 mL）へ Harvesting Buffer 1 mL（懸濁液に対して 10 vol%）を添加し、細胞懸濁液全量をピペッターで吸引・コニカルチューブ壁面へピペットの先を触れさせながら細胞懸濁液を吐出させる操作（ピペッティング）を 3 度繰り返して、全体を均質にする。※この際の均質化操作が弱いと後の細胞回収率が低下します。
- Harvesting Buffer を添加した細胞懸濁液を遠心分離（SLOW DECEL モード、 $200\times g$ 、5 min）へかける。
- コニカルチューブ下層へ濃縮された細胞懸濁層を残して、上清を除去する。
- 細胞濃縮液へ FP003 添加培地を 10 mL 加えて、ピペッティングにより再懸濁させる。
- 細胞濃度を計測し、 1.0×10^5 cells/mL の播種条件となるように FP003 添加培地を加えて、ピペッティングにより細胞懸濁液を均一にする。
- 細胞懸濁液を培養容器へ 10 ~ 30 mL/dish となるように播種し、インキュベーター内にて所定日数培養する。

4. 細胞回収について

培養後に細胞懸濁液から細胞を回収する際、培養する細胞の種類や用いる培地の種類によって、遠心分離後に細胞の沈降が不十分となり細胞回収が困難な場合があります。このような場合には下記条件を調整することで細胞回収率が改善する事があります。

操作	条件例
遠心力（回転数）を上げる	$300\times g \rightarrow 500\times g$
Harvesting Buffer 添加量を増やす	1 mL: 10 vol% \rightarrow 3 mL: 30 vol%（培地 10mL に対して）
FP003 Solution 添加量を減らす	培地 49.2 mL + FP003 Sol. 0.8 mL \rightarrow 培地 49.4 mL + FP003 Sol. 0.6 mL

■お問合せ下さい

培地作製条件や培養方法、細胞回収操作でご不明な点、培地作製や細胞回収を失敗してしまった場合など、ご意見ご要望が御座いましたら、お気軽にお問合せ下さい。



For research use only. Not for use in clinical and diagnostic procedures.





Nissan Chemical
CORPORATION

ライフサイエンス材料開発部

〒103-6119 東京都中央区日本橋 2-5-1

TEL: +81-3-4463-8370 FAX: +81-3-4463-8371

E-mail: fcem@nissanchem.co.jp