

ヒト内臓由来脂肪前駆細胞・脂肪細胞 培養マニュアル

播種内臓脂肪前駆細胞をご購入された方は、「2. 内臓脂肪前駆細胞から内臓脂肪細胞への分化誘導」から操作を開始してください。

播種内臓脂肪細胞をご購入された方は、「3. 内臓脂肪細胞の維持」から操作を開始してください。

1. 凍結内臓脂肪前駆細胞の播種

- ① 液体窒素から凍結アンプルを取り出し、37°Cの湯浴で、内容物(細胞)が約半分程度融解するまで攪拌する。この際、アンプルが暴発する恐れがあるので、プロテクターや手袋を装着して作業することが望ましい。
- ② 約半分程度融解したことを確認したら、湯浴から取り出し、アンプルを攪拌させながら、余熱ですべて融解する。
- ③ 15mLの遠沈管に内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: BBOMPM)を10mL入れる。
- ④ 遠心管にアンプル中の細胞浮遊液を全量移し、数回ピペッティングしたのち1,500rpmで1分間遠心する。
- ⑤ 上清を取り除き、内臓脂肪前駆細胞培養用培地を2mL添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンブルーで染色したあと、細胞数を計測する。
- ⑥ 内臓脂肪前駆細胞培養用培地を用い、下記表に示した必要培地量で、細胞濃度を 4×10^4 cells/cm²に調製し、播種する。

| 培養容器 | 培地量/well | 必要培地量 |
|------------------------|-------------|--------|
| 96well プレート | 150 μ L | 14.4mL |
| 48well プレート | 500 μ L | 24.0mL |
| 24well プレート | 1.0mL | 24.0mL |
| 12well プレート | 2.0mL | 24.0mL |
| 6well プレート | 3.0mL | 18.0mL |
| 75cm ² フラスコ | 20mL | 20.0mL |
| 25cm ² フラスコ | 7mL | 7.0mL |

⑦ 細胞を上記表に示した培地量ずつ播種し、インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養して下さい。

⑧ 24時間後に細胞を観察しコンフルエントに達したことを確認したら、分化誘導を開始して下さい。

※コンフルエントが不十分であれば、脂肪細胞への分化率が悪くなりますので、十分コンフルエントになるまで、分化誘導は開始しないで下さい。

2. 内臓脂肪前駆細胞から内臓脂肪細胞への分化誘導

- ① 内臓脂肪前駆細胞を内臓脂肪前駆細胞培養用培地でコンフルエントまで培養します。
- ② コンフルエントに達したことを確認したら、下記表に従い、内臓脂肪前駆細胞培養用培地を内臓脂肪分化培地(注文 Cat.No.: BBOMDM)に全量交換し、分化誘導を開始します。
- ③ 分化誘導開始から7日目に、下記表に従い、内臓脂肪細胞分化培地を適量取り除き、内臓脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: BBOMAM)を適量加えます。



| 培養容器 | BBOMDM から BBOMAM への交換 | |
|------------------------|-----------------------|------------------|
| | 取り除く培地量 | 加える培地量 |
| 96well プレート | 90 μ L/well | 120 μ L/well |
| 48well プレート | 300 μ L/well | 400 μ L/well |
| 24well プレート | 0.6mL/well | 0.8mL/well |
| 12well プレート | 1.2mL/well | 1.6mL/well |
| 6well プレート | 1.8mL/well | 2.4mL/well |
| 75cm ² フラスコ | 12mL/フラスコ | 16mL/フラスコ |
| 25cm ² フラスコ | 4.2mL/フラスコ | 5.6mL/フラスコ |

④ 実験まで 3 日おきに内臓脂肪細胞培養用培地を半量ずつ交換します。

※ 内臓脂肪細胞は、分化誘導後少なくとも 3 週間は形態・性質を維持できます。

※ ロットによって、分化効率は異なります。

3. 内臓脂肪細胞の維持

- ① 顕微鏡で細胞を観察します。
- ② 輸送時は、pH の変動を抑えるために、過剰量の内臓脂肪細胞培養用培地でお送りしています。インキュベーター (5%CO₂、37°C) 内に静置する前に、培地を適量取り除いて下さい。
- ③ 培地を適量取り除いたら、インキュベーター (37°C、5%CO₂) 内に静置して下さい。
- ④ 実験を行うまで 3 日ごとに内臓脂肪培養用培地で半量ずつ培地交換を行って下さい。

※ 内臓脂肪細胞は、分化誘導後、少なくとも 3 週間は形態・性質を維持します。

※ 内臓脂肪細胞は継代すると分化効率が著しく悪くなりますので、ご注意下さい。

■ 培地交換スケジュール (例)

| 培養日数 | 0 日目 | 1 日目 | 8 日目 | 11 日目 | 15 日目 | 18 日目 | 21 日目 |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 培地交換 | 播種 | 培地交換 BBOMPM | 培地交換 BBOMDM | 培地交換 BBOMAM | 培地交換 BBOMAM | 培地交換 BBOMAM | 培地交換 BBOMAM |
| | BBOMPM | ↓ BBOMDM | ↓ BBOMAM | ↓ BBOMAM | ↓ BBOMAM | ↓ BBOMAM | ↓ BBOMAM |

株式会社 ケー・エー・シー
試薬事業部

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20

(お問い合わせ窓口)

TEL: 06-6435-9747 FAX: 06-6435-9748

URL: <http://www.kacnet.co.jp/>

E-mail: cs-info@kacnet.co.jp