

MSCulture™ High Growth Supplement**[Product and Storage]**

Product	Cat No.	Volume	Storage	Note
MSCulture™ High Growth Supplement	133-19331	5 mL	-20°C	Supplemental reagent
MSCulture™ High Growth Basal Medium	132-19345	500 mL	2-10°C	Basal Medium

[Note]

This supplement should be mixed with two more products, MSCulture™ High Growth Basal Medium (Cat No. 132-19345, **Optional**) and animal serum (i.e. FBS), for preparation of MSCulture-based MSC complete medium.

[About MSCulture™-based MSC complete medium]

MSCulture™-based MSC complete medium is optimized for mesenchymal stem cells (MSCs), and can be used for high quality culture and well proliferation. This medium can be used for several tissue-derived MSCs, including human bone marrow, human adipose tissue, and human umbilical cord.

After expansion of MSC by MSCulture™-based MSC complete medium, switching to an exosome producing medium, EV-Up™ (basal medium (Cat No. 053-09451) and supplement (Cat No. 298-84001)), facilitates efficient exosome production.

This product is for research use only.

[Required equipment and reagents]

Plastic labware :

- Centrifuge tube (15 mL)
- Culture dishes (depending on culture scale)

Reagents :

- MSCulture™ High Growth Supplement (Cat No. 133-19331)
- MSCulture™ High Growth Basal Medium (Cat No. 132-19345)
- Animal serum (i.e. Wako, FBS, Cat No. 554-04855)
- D-PBS (-) (i.e. Wako, Cat No. 045-29795)
- Trypsin (i.e. Wako, Cat No. 205-20255, 209-16941)

[Protocol]

■ Optimal density of MSCs on each culture plate
Prepare and seed optimal number of MSCs on your chosen culture plate below.

[Table 1]

Plate	Cells / vessel
6-well plate	0.45×10^5 cells
10 cm dish	2.75×10^5 cells
T25 flask	1.25×10^5 cells
T75 flask	3.75×10^5 cells
T225 flask	1.12×10^6 cells

■ Procedure**1. Preparation of MSCulture™-based MSC complete medium**

• Use laminar flow hood for refraining and preventing contamination.

- (1) Completely thaw MSCulture™ High Growth Supplement at room temperature (RT).

• Do not thaw MSCulture™ High Growth Supplement using a water bath.
• If some precipitation is observed after thawing MSCulture™ High Growth Supplement, vortex until precipitates have disappeared.

- (2) Add MSCulture™ High Growth Supplement and animal serum (f.c. 10-15%) to MSCulture™ High Growth Basal Medium.

• Prepared MSCulture™-based MSC complete medium should be stored in a refrigerator (4-10°C) and used within one month.
• During storage, DO NOT freeze MSCulture™-based MSC complete medium.
• MSCulture™ High Growth Supplement can be re-frozen for long-term storage.

2. Culture MSCs from cryopreserved stock

- (1) Add 10 mL of MSCulture™-based MSC complete medium to a 15 mL centrifuge tube.

• Medium should be at RT before cells are suspended.

- (2) Thaw MSCs using water bath and add to (1) immediately.
- (3) Centrifuge at $200 \times g$ (1,000 rpm) for 3 min, and discard supernatant.
- (4) Add 1 mL of MSCulture™-based MSC complete medium and suspend by pipetting gently.
- (5) Count cell number and seed cells on suitable culture labware (see. Table 1).

• Recommended cell density is over 5×10^3 cells/cm²

- (6) Incubate MSCs up to 80-90% confluency at 37°C, 5% CO₂

• Culture period without passage is less than 96 hrs. If MSCs CANNOT proliferate around 80-90% confluency within 96 hrs, increase cell density to over 5×10^3 cells/cm². It is not necessary to change the medium during culture.

3. Passage and expansion of MSCs

- (1) Wash with D-PBS (-) twice, before MSC is trypsinized.
- (2) Transfer trypsinized MSCs into a 15 mL centrifuge tube.
- (3) Centrifuge at $200 \times g$ (1,000 rpm) for 3 min, and discard supernatant.
- (4) Add 1 mL of MSCulture™-based MSC complete medium and suspend by pipetting gently.
- (5) Count cell number and seed cells on suitable culture labware (see. Table 1).

• Recommended cell density is over 5×10^3 cells/cm²

- (6) Incubate MSCs up to 80-90% confluency at 37°C, 5% CO₂

・ Culture period without passage is less than 96 hrs. If MSCs CANNOT proliferate around 80-90% confluency within 96 hrs, increase cell density. It is not necessary to change the medium during culture.

4. Optional : Exosome generation and purification using EV-Up™

- (1) Incubate MSCs up to 80-90% confluency at 37°C, 5% CO₂
- (2) Discard MSCulture™-based MSC complete medium, and wash with D-PBS (-) twice.
- (3) Discard D-PBS (-), and add suitable volume of EV-Up™ (see below).

Culture Labware	EV-Up™ MSC EV Medium volume (mL)
6-well plate	4
10 cm dish	20
T25 flask	10
T75 flask	30
T225 flask	90

- (4) Incubate MSCs for 3-5 days at 37°C, 5% CO₂

・ It is not necessary to change the medium during culture.

- (5) Transfer EV-Up™ into a centrifuge tube.
- (6) Centrifuge culture medium at 2,000×g for 20 min
- (7) Transfer supernatant into a new centrifuge tube.

・ Purify EVs using MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Wako Cat No. 290-84103).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation **FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**
 1600 Bellwood Road Fuggerstrasse 12
 Richmond, VA 23237 D-41468 Neuss
 U.S.A. Germany
 Telephone : + 1-804-271-7677 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 1-804-271-7791 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wakousa.com> <http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 133-19331

MSCulture™ High Growth サプリメント

【保存方法】

試薬名	コードNo.	容量	保存方法	備考
MSCulture™ High Growth サプリメント	133-19331	5mL	-20℃	本品
MSCulture™ High Growth 基礎培地	132-19345	500mL	2-10℃	別途購入必要

【注意】

本品使用時には必ず MSCulture™ High Growth 基礎培地 (コード No. 132-19345) と任意の血清をご用意下さい。これら3点を混合した培地を MSCulture™ High Growth 完全培地とします。

【MSCulture™ High Growth 完全培地】

MSCulture™ High Growth 完全培地は、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell : MSC) を高品質な状態で効率良く増殖させることができる血清添加タイプの増殖培地です。様々な組織 (骨髄、脂肪、臍帯マトリクス) 由来の MSC にご使用いただけます。MSCulture™ High Growth 完全培地で拡大培養後、EV-Up™ MSC エクソソーム産生用基礎培地 (コード No. 053-09451) およびサプリメント (コード No. 298-84001) で培養することで、エクソソームを効率良く産生させることができます。

本品は研究用試薬です。

【準備するもの】

器具 :

- ・ 15mL チューブ
- ・ 培養容器

試薬 :

- ・ MSCulture™ High Growth サプリメント (本品)
- ・ MSCulture™ High Growth 基礎培地 (コード No. 132-19345)
- ・ 任意の血清 (例 : コード No. 554-04855)
- ・ D-PBS (-) (例 : コード No. 045-29795)
- ・ 細胞剥離溶液 (例 : コード No. 205-20255、209-16941)

【操作】

■ 必要細胞数の目安

培養容器によって必要細胞数が異なります。下表を目安に細胞を播種して下さい。

(表1) 必要細胞数の目安

培養容器	必要細胞数
6-well plate	0.45 × 10 ⁵ cells
10cm dish	2.75 × 10 ⁵ cells
T25 フラスコ	1.25 × 10 ⁵ cells
T75 フラスコ	3.75 × 10 ⁵ cells
T225 フラスコ	1.12 × 10 ⁶ cells

■操作方法

1. MSCulture™ High Growth 完全培地の準備

・以下の操作はコンタミネーションを防ぐために十分な消毒に加え、クリーンベンチ等を使用して行って下さい。

- ①MSCulture™ High Growth サプリメントを使用直前に室温にて融解する。

・温浴槽での融解は避けて下さい。
・融解後、白色の沈殿が生じることがあります。ボルテックスマキサー等で完全に溶解してからご使用下さい。

- ②溶解した MSCulture™ High Growth サプリメントと任意の血清（終濃度 10-15%）を MSCulture™ High Growth 基礎培地に添加し、完全に混合する。…MSCulture™ High Growth 完全培地

・ゆっくりと混合して下さい。
・MSCulture™ High Growth 完全培地の凍結保存は避けてください。
・用事調製で少量の培地を作製する事も可能です。その場合、余った MSCulture™ High Growth サプリメントは再度 -20℃で保管して下さい。調製した培地は 2～10℃の暗所で保存し、1ヶ月程度でご使用下さい。

2. 細胞の融解・培養開始

- ①MSCulture™ High Growth 完全培地 10mL を 15mL チューブに移す。

・MSCulture™ High Growth 完全培地は室温に戻してご使用下さい。

- ②凍結保存している細胞を温浴で融解し、①のチューブに移す。
③200×g (1,000rpm)、3min で遠心して上清を取り除く。
④培地を適量加えて細胞を懸濁する。
⑤血球計算板等を用いて細胞数を測定する。
⑥表 1 を参考に培養容器に細胞を播種する。

・細胞播種密度は、 5×10^3 cells/cm² 以上を推奨しています。

- ⑦37℃、5% CO₂ のインキュベーターにて、80-90%コンフルエントまで培養する。

・培養時間の目安は 96 時間以内です。96 時間以上を要する場合は播種細胞数を増やして下さい。培養中の培地交換は不要です。

3. 細胞の継代

- ①細胞を D-PBS (-) で洗浄する。
②細胞剥離溶液で細胞を浸し、細胞を剥離する。
③細胞剥離反応の停止後、細胞懸濁液を 15mL チューブに回収する。
④200×g (1,000rpm)、3min で遠心し、上清を取り除く。
⑤培地を適量加えて細胞を懸濁する。
⑥血球計算板等を用いて細胞数を測定する。
⑦表 1 を参考に培養容器に細胞を播種する。

・細胞播種密度は、 5×10^3 cells/cm² 以上を推奨しています。

- ⑧37℃、5% CO₂ のインキュベーターにて、80-90%コンフルエントまで培養する。

・培養時間の目安は 96 時間以内です。96 時間以上を要する場合は播種細胞数を増やして下さい。培養中の培地交換は不要です。

- ⑨①～⑧の操作を繰り返し、細胞の拡大培養を行う（目安：80-90%コンフルエント）。

4. オプション：EV-Up™ MSC エクソソーム産生用培地を用いたエクソソーム産生

- ①細胞を 80-90%コンフルエントになるよう培養する。
②MSCulture™ High Growth 完全培地を除去し、D-PBS (-) で洗浄する。
③D-PBS (-) を除去し、表 2 を参考に EV-Up™ MSC エクソソーム産生用培地に交換する。

(表 2) EV-Up™ MSC エクソソーム産生用培地 使用量目安

培養容器	EV-Up™ MSC EV 産生用培地 培地量
6-well plate	4mL
10cm dish	20mL
T25 フラスコ	10mL
T75 フラスコ	30mL
T225 フラスコ	90mL

- ④37℃、5% CO₂ インキュベーターで静置し、3-5 日間培養する。

・培養中の培地交換は不要です。

- ⑤培養後、2,000×g で 20 分間遠心する。
⑥遠心後、残渣を吸わないように培養上清を新しいチューブへ回収する。
⑦培養上清からエクソソームを精製する。

・当社の MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (コード No. 290-84103) を用いたエクソソーム精製を推奨しております。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741

2209KA1