

無血清培養細胞用

極東 凍結保存用培地 FM-1

1988 年、大野らにより発表された無血清培養細胞用のための凍結保存用培地です。細胞の凍結保存は一般にはジメチルスルホキシドまたはグリセリン並びに血清を含む培地が広く使用されておりますが、無血清培養が盛んになるにつれ無血清状態での凍結保存用の培地が望まれるようになってきました。近年、血清に代わるものとしてメチルセルロースを使用することにより生細胞の回収率を高めることが知られるようになりました。本培地はこの処方に基づいております。この凍結保存用培地は、通常の血清で培養している細胞の凍結にも使用できます。使用法は無血清培養の場合と同じです。

《組成》	1L中
イーグル MEM 培地 (高圧滅菌用)	9.4g
メチルセルロース	2.0g
ジメチルスルホキシド (DMSO)	200.0mL
L- グルタミン	0.3g
炭酸水素ナトリウム	1.0g
純水	800.0mL

イーグル MEM 培地の組成	(mg/L)		(mg/L)
L- アルギニン塩酸塩	126.0	パントテン酸カルシウム	1.0
L- システイン塩酸塩 (一水塩)	31.4	塩酸ピリドキサール	1.0
L- チロシン	36.0	リボフラビン	0.1
L- ヒスチジン塩酸塩 (一水塩)	42.0	塩酸チアミン	1.0
L- イソロイシン	52.0	ビオチン	0.02
L- ロイシン	52.0	塩化ナトリウム	6,800.0
L- リジン塩酸塩	73.0	塩化カリウム	400.0
L- メチオニン	15.0	塩化カルシウム (無水)	200.0
L- フェニルアラニン	32.0	硫酸マグネシウム (無水)	93.5
L- スレオニン	48.0	リン酸二水素ナトリウム (無水)	115.0
L- トリプトファン	10.0	ブドウ糖 (無水)	1,000.0
L- バリン	46.0	コハク酸	75.0
重酒石酸コリン	1.8	コハク酸ナトリウム (六水塩)	100.0
葉酸	1.0	カナマイシン	60.0
イノシトール	2.0	フェノールレッド	6.0
ニコチン酸アミド	1.0		

《操作法》

[FM-1 を用いた細胞の凍結法]

すべての操作を無菌的に行ってください。

本培地は凍結保護剤が 2 倍濃度になっています。

- ① 懸培本 (5mL) に対して、通常の培養に使用している培養液に懸濁した細胞浮遊液を 5mL 加えます (1:1)。または細胞浮遊液に本培地を 1:1 になるように加えます。
- ② ①を滅菌済みのセラムチューブまたはアンプルに詰め、密封し、凍結用発泡スチロール容器に入れ、 -80°C 以下に保存します。あるいはプログラムフリーザーで凍結します。
細胞密度は 10^6 cells/mL 以上になるように調製して下さい。

注) 本培地は、メチルセルロースの沈殿が出るがありますが、性能に変わりはありません。

[凍結細胞の融解と再培養の方法]

- ① -80°C 以下に保存されているアンプルを一気に 37°C の温湯の中に入れ手で振りながら急速に融解します。
- ② 融解後開封し、通常の培養液で 5~10 倍に希釈して 1000r.p.m. 程度の遠心力で 3~5 分遠沈します。
- ③ 上清を捨て、通常の培養液を必要量加え、培養容器に移して培養を開始します。必要ならば通常の培養液による細胞の洗浄を再度行って下さい。一夜培養後、培養液を交換すると培養状態は一層良くなります。

《貯法》

冷暗所 ($2\sim 10^{\circ}\text{C}$) に保存して下さい。

《包装単位》

5mL×5 本

《有効期間》

1 年間

《参考文献》

1. 大野忠夫：細胞工学, 7(2) : 171-172, (1988)
2. TOhno, K. Kurita, S. Abe, N. Eimori and Y. Ikawa: A simple freezing medium for serum-free cultured cells. Cytotechnology 1:257-260 (1988)

極東製薬工業株式会社
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町 7 番 8 号
電話 (03)5645-5664 Fax (03)5645-5704

For serum-free cell culture

Kyokuto FM-1 Cryopreservation Medium

This cryopreservation medium for serum-free cell cultures was introduced by Ohno and colleagues in 1988. Traditionally, cell freezing has relied on media containing dimethyl sulfoxide, glycerin, and serum. However, as serum-free cell culture has become more common, the demand for serum-free freezing media has grown. Recently, it has been found that using methylcellulose as a serum substitute can improve cell recovery rates. This medium is formulated based on that approach.

This medium can also be used to freeze cells cultured with regular serum. The procedure is the same as for serum-free cultures.

Composition	Per 1 L
Eagle MEM Medium (for autoclave sterilization)	9.4g
Methylcellulose	2.0g
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	200.0mL
L-Glutamine	0.3g
Sodium bicarbonate	1.0g
Purified water	800.0mL

Composition of Eagle MEM Medium		(mg/L)	(mg/L)
L-Arginine hydrochloride	126.0	Calcium Pantothenate	1.0
L-Cysteine hydrochloride (monohydrate)	31.4	Pyridoxal Hydrochloride	1.0
L-Tyrosine	36.0	Riboflavin	0.1
L-Histidine hydrochloride (monohydrate)	42.0	Thiamine Hydrochloride	1.0
L-Isoleucine	52.0	Biotin	0.02
L-Leucine	52.0	Sodium Chloride	6,800.0
L-Lysine Hydrochloride	73.0	Potassium Chloride	400.0
L-Methionine	15.0	Calcium Chloride (anhydrous)	200.0
L-Phenylalanine	32.0	Magnesium Sulfate (anhydrous)	93.5
L-Threonine	48.0	Sodium Dihydrogen Phosphate (anhydrous)	115.0
L-Tryptophan	10.0	Glucose (anhydrous)	1,000.0
L-Valine	46.0	Succinic Acid	75.0
Choline Bitartrate	1.8	Sodium Succinate (hexahydrate)	100.0
Folic Acid	1.0	Kanamycin	60.0
Inositol	2.0	Phenol Red	6.0
Nicotinamide	1.0		

Operation Method

FM-1-Based Cell Freezing Procedure

Please perform all procedures under sterile conditions.

This medium contains cryoprotectant at double the usual concentration.

1. Base Medium

For each tube of medium (5 mL), add 5 mL of cell suspension (prepared in your usual culture medium) for a 1:1 ratio. Alternatively, add an equal volume of this medium to the cell suspension.

2. Transfer the mixture from step 1 into a sterile serum tube or ampoule, seal tightly, and place it in a freezing container made of Styrofoam,

-80 °C or lower for storage. You may also freeze using a programmable freezer.

Prepare the cell density to be
10 cells/mL

Please prepare the cell suspension at a
concentration of at least 10^6 cells/mL.

Note: You may notice methylcellulose precipitates in this medium, but its performance remains unaffected.

Thawing and Re-culturing Frozen Cells

Quickly immerse the ampule stored at -80°C or below into a 37°C water bath and agitate gently by hand to rapidly thaw.

After thawing, open the ampule and dilute the contents 5- to 10-fold with standard culture medium, then centrifuge at about 1000 r.p.m. for 3–5 minutes.

Discard the supernatant, add the required amount of standard culture medium, transfer to a culture vessel, and start incubation. If needed, wash the cells again with fresh medium. For improved results, replace the medium after overnight culture.

Storage Method

Store in a cool, dark place (2–10°C).

Packaging Unit

5mL × 5
bottles

Expiration Period

Valid for 1 year

References

1. Tadao Ohno: Cell Engineering, 7(2):171-172, (1988)
2. T. Ohno, K. Kurita, S. Abe, N. Eimori and Y. Ikawa: A simple freezing medium for serum-free cultured cells. Cytotechnology 1: 257-260 (1988)