

attachment A

Tic-FX 培地組成

NIHS 0606.1
JCRB1331.01 Seed , Distribution

ESF-FX

500 mL		メーカー	型番	ストック溶液濃度	液量	使用時 最終濃度
mESF		wako	136-17805		500 ml	
3factor	(* 1)			× 100	5 ml	(* 6)
Oleic acid -rHSA	(* 2)			× 100	5 ml	
Insulin solution Human		SIGMA	I9278-5ML	× 1000	0.5 ml	
Apo-transferrin human	(* 3)			1 mg/ml	2.5 ml	5 µg/ml
アスコルビン酸リン酸	(* 4)			50 mg/ml	1 ml	100 µg/ml
514 ml						

* 使用期限は調製後1週間だが、できるだけ作り置きをしない。
特に、継代時は新しく調製した培地を使用するのが望ましい。

ストック溶液 (Stock Solution)

(* 1)	3factor (× 100)					(* 6)
40 mL		メーカー	型番	濃度	液量	使用時最終 濃度
	DPBS	GIBCO	14190		40 ml	
	2-mercaptoethanol (1M)	(* 1-1)		1 mM	40 µl	10 µM
	2-ethanolamine (1M)	(* 1-2)		1 mM	40 µl	10 µM
	Sodium selenite (1 mg/10 ml)	(* 1-3)		2 µM	138.5 µl	20 nM
40.2185 ml						

* 0.22µmフィルター濾過して使用
* * 遮光して4℃で保存

(* 1-1) 2-mercaptoethanol (1M)	メーカー	型番	液量
2-mercaptoethanol (14.3 M)	SIGMA	M7522	1.4 ml
DW	GIBCO	15230	18.6 ml

* 医薬用外毒物のため取扱い注意

(* 1-2) 2-ethanolamine (1M)	メーカー	型番	液量
2-ethanolamine (16.6 M)	SIGMA	E0135	1.2 ml
DW	GIBCO	15230	18.8 ml

(* 1-3) Sodium selenite (1 mg/10 ml)	メーカー	型番	必要量	液量
Sodium selenite	SIGMA	S9133	1 mg	
DW	GIBCO	15230		10 ml

* 医薬用外毒物のため取扱い注意

(* 2)	Oleic acid -rHSA (× 100)				
50 mL		メーカー	型番	必要量	液量
	Human Albumin : rHSA	SIGMA	A7736	5 g	
	DPBS	GIBCO	14190		50 ml
	Oleic acid (200 mg/ml)	(* 2-1)		235 µl	

- 1) rHSAをDPBSに加え、溶解するまで2-3時間程度4℃冷蔵庫に入れる。時折揺すって様子を確認する。
- 2) 完全に溶解したのを確認し、Oleic acidを加える。
- 3) 蓋をしっかりと閉め、パラフィルムでシールをしてアルミホイルで遮光する。
- 4) ローテーターに固定し、4℃冷蔵庫内で一晩回転させる。
- 5) 0.22 µmフィルターで濾過滅菌する。
- 6) アルミホイルで遮光をし、4℃で保存。

* 1か月ほどで使い切れる分量を調製する。

(* 2-1) Oleic acid (200 mg/ml)	メーカー	型番	必要量	液量
Oleic acid	SIGMA	O1383-1G		1 ml
EtOH	WAKO	057-00456		4 ml

* 小分け分注をして-20℃で保存し、使用時に解凍する。

(* 3)	Apo-transferrin human (1 mg/ml)				
100 mL		メーカー	型番	必要量	液量
	Apo-transferrin human	SIGMA	T2252-100MG	100 mg	
	DPBS	GIBCO	14190		100 ml

* 0.22 µmフィルター濾過して使用
* * 4℃で保存 (長期間の場合は-20℃で保存)

(* 4)	アスコルビン酸リン酸 (50 mg/ml)				
30 mL		メーカー	型番	必要量	液量
	L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩	WAKO	013-19641	1.5 g	
	DW	GIBCO	15230		30 ml

* 0.22 µmフィルター濾過して使用
* * 4℃で保存 (長期間の場合は-20℃で保存)
(小分け分注して-20℃で保管しておき、培地調製時に必要量を解凍して使用している)