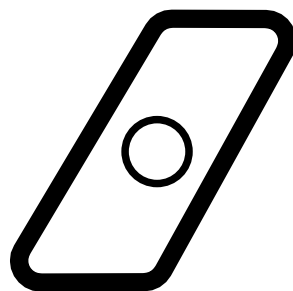




Cardiosight[®]-S
사용설명서
(Advanced media)



목차

1. 제품 정보	2
취급 방법.....	2
구성품 및 설명	3
안전 주의 사항 및 사용자 제한 사항.....	5
2. 제품 소개	6
3. 세포 배양 준비.....	7
장비 및 소모품 (비 제공).....	7
Cardiosight®-S 배양액 준비.....	8
세포 배양 용기 준비	9
4. Cardiosight®-S 해동 및 플레이팅	10
해동.....	10
플레이팅	12
5. Cardiosight®-S 유지 배양.....	13

1. 제품 정보

취급 방법

- ▶ Cardiosight®-S 의 모든 구성품은 온도에 민감한 제품입니다. 제품 수취 후 반드시 올바르게 동결되어 있는지를 확인하십시오. 제품의 동결상태가 올바르지 않은 경우 즉시 당사의 기술지원 팀에 문의하십시오.
- ▶ 각 제품의 구성품들을 수취한 후 올바른 보관 조건을 확인하여, 이에 따라 신속하게 올바른 보관 장소로 옮기십시오.
- ▶ 상품의 카탈로그번호, 배치번호, 유효기간을 확인하십시오. 세포 배양액의 유효기간(라벨에 표기된 날짜)이 가장 짧으므로, 이를 고려한 후 실험을 계획해야 합니다.
- ▶ Cardiosight®-S 는 실험실 규정 및 MSDS 의 내용을 준수한 상태에서 사용되어야 하며, 올바른 실험실 환경 내에서 기술적으로 숙련된 실험자에게 다뤄져야 합니다. 최상의 결과를 얻기 위해서는 사용설명서에 따라 실험을 진행하는 것을 추천합니다.
- ▶ Cardiosight®-S 는 연구용으로만 사용되어야 하며, 동물 또는 인간에게 사용해서는 안됩니다.

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



구성품 및 설명

구성요소	CAT#	수취 후 보관
Cardiosight®-S Cardiomyocytes		
냉동 보존, 동결 바이알		액체 질소
>2.5 million cells	C-001	
>5 million cells	C-002	
Cardiosight®-S Advanced Media		
Advanced Plating medium		
30 ml	CM-010A	
45 ml	CM-020A	4°C
Advanced Maintenance medium		
100 ml	CM-001A	
200 ml	CM-002A	
Cardiosight®-S Advanced Plating Supplement (50X)		
플레이팅 배양액 첨가제		-20°C
0.6 ml	CS-010A	
0.9 ml	CS-020A	
Cardiosight®-S Advanced Maintenance Supplement (100X)		
유지 배양액 첨가제		-20°C
1 ml	CS-001A	
2 ml	CS-002A	
Cardiosight®-S 사용 설명서 ¹		
분석 증명서 (CoA)		
물질 안전 보건 자료(MSDS) ²		

¹ www.nexel.co.kr 에서도 확인하실 수 있습니다.

² 선적 서류와 함께 동봉되어 보내드립니다.

▶ 상기 표 안의 구성품이 배송에서 누락된 경우, (주)넥셀 또는 해당 국가의 당사 유통업체에 문의해 주시면 기술지원 팀에서 적절한 조치를 취해드립니다.

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



Cardiosight®-S Cardiomyocytes

세포 유형	인간 유도만능 줄기세포(hiPSC) 유래 심근세포
세포 기원	정상 공여자의 섬유아세포 세포주로부터 유도된 hiPSC 세포주
품질 관리	Lot 별 세포 정보는 분석 증명서(CoA)를 참조하십시오. 바이러스 안전성 및 STR 분석정보는 요청 시 제공됩니다.

Cardiosight®-S Advanced Media & Media Supplements

- ▶ Cardiosight®-S Advanced Medium & Supplements 를 혼합하여 Cardiosight®-S Plating Media 와 Maintenance Media 를 만들며, 1 개월 이내에 사용해야 합니다. 최상의 결과를 얻기 위해서 Plating Media 와 Maintenance Media 를 소분하여 사용하되, 재 냉동은 하지 마십시오.
- ▶ Cardiosight®-S Plating Media 와 Maintenance Media 에는 혈청이 포함되어져 있지 않으며, 배양액 구성에 대한 추가적인 내용은 당사 기술지원 팀에 문의하십시오.
- ▶ Cardiosight®-S Plating Media 와 Maintenance Media 는 적절한 배양 조건이 유지되는 것을 가정하여 항생제와 항 진균제가 들어있지 않습니다. (주)넥셀은 정확한 실험 결과를 위해 이러한 제제의 사용을 권장하지 않지만, 무균 세포 배양 조건이 불가능할 경우 사용되어야 합니다.

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



안전 주의 사항 및 사용자 제한 사항



Biosafety Level: 1

연구를 위한 용도로만 사용되며, 어떠한 용도로도 동물이나 인간에게 사용해서는 안 됩니다. 이 물질은 항상 적절한 안전 절차에 따라 사용되어야 합니다. 자세한 지침은 MSDS 를 참조하십시오.

사용자 제한 사항:

- ▶ 사용자는 약물 후보물질의 효능 및 안전성 검사 등을 실시하기 위해 내부 연구 목적으로 사용하거나 이러한 서비스를 제 3 자에게 제공하기 위하여 이 제품 (Cardiosight®-S)을 사용할 수 있습니다. 명시적, 묵시적, 금반어 또는 기타방식의 여부와 관계없이 사용자에게 다른 권리는 부여되지 않습니다. 특히, 제품 구매에는 제품을 상업적으로 사용, 개발 또는 다른 방식으로 이용할 수 있는 권리나 사용권이 포함되지 않으며, 다른 목적으로 제품을 사용할 수 있는 권한이 사용자에게 제공되지 않습니다.
- ▶ 사용자는 적용 가능한 모든 법령 및 규정을 준수하여 제품을 사용하는 데 동의하며 사람에게 어떠한 투여 또는 어떠한 적용에도 제품을 사용하지 않음에 동의합니다. 특히, 인간 또는 동물 대상의 진단, 치료 또는 예방을 목적으로 한 임상에 제품을 사용하지 않음에 동의하며 이는 앞서 말한 것에 국한된 것이 아닌 임상응용, 세포치료제 및 허가되지 않은 재생의학에서의 사용에도 포함됩니다.
- ▶ 사용자가 제품을 제 3 자에게 양도하는 경우, 사용자는 해당 문서에 명시된 사용자 제한 사항을 제 3 자에게 전달해야 합니다.

2. 제품 소개

(주)넥셀은 최적화된 독점 프로토콜을 이용하여 인간 유도만능줄기세포(hiPSC)로부터 얻어진 고품질의 인간 심근세포를 제공하고 있습니다. Cardiosight®-S 는 전기생리학적으로 유효한 고순도의 세포이며, 심근세포 분야의 모든 유형의 실험에 적합합니다. Advanced Media 는 Cardiosight®-S 의 전기생리학적 프로파일과 자극-수축 커플링, 성숙도를 향상시키기 위해 새롭게 디자인하였습니다. Advanced Media 와 함께 사용한 Cardiosight®-S 는 싱크로나이즈 된 박동, 적절한 FPD, 높은 칼슘 유입 그리고 강한 수축과 같은 결과로 여러 전기생리학적 플랫폼에서 검증되었습니다. 따라서 조직-특이적 연구, 독성 스크리닝, 효능 테스트 그리고 신약 개발에 있어서 완벽한 선택이 될 것입니다.

이 사용설명서는 적합한 전기생리학적 실험 방법과 심근세포의 싱크로나이즈 된 층 생성을 위해 적절한 농도로 Cardiosight®-S 를 시딩하는 데 도움이 됩니다. 그러나 각 실험에 있어 최상의 결과는 사용자의 면밀한 관찰, 관리 및 최적화를 통해 얻을 수 있습니다.

3. 세포 배양 준비

장비 및 소모품 (비 제공)

ITEM	CAT#	VENDOR
Coating Material		
Matrigel, Basal Membrane	356235	Corning
Fibronectin, Human	F0895	Sigma
세포 배양 시 필요한 장비		
액체 질소 저장 용기		
37°C 항온 수조		
원심 분리기		
무균 실험대 (자외선 살균 등 자체 포함)		
혈구 측정기 또는 자동 세포 계수기		
위상차 현미경		
파이펫		
이산화 탄소 배양기(Incubator)		
세포 배양 시 필요한 소모품		
Centrifuge Tubes		
Cell Culture Plates		
Pipette Tips		
Trypan Blue		
Phosphate Buffered Saline (PBS)		

Cardiosight®-S 배양액 준비

1. Cardiosight®-S Advanced Media 와 Supplements 를 사용하기 24 시간 전에 4°C 에서 해동합니다.
2. 무균 실험대에서, 해동이 완료된 Cardiosight®-S Advanced Plating Supplement (50X) 와 Maintenance Supplement (100X)를 해동된 각각의 Plating Media 와 Maintenance Media 에 첨가하여 해당 배지를 만듭니다. Supplement 가 첨가된 Media 는 4°C 에서 약 1 개월 동안 보관이 가능하며, 제조된 Plating Media 와 Maintenance Media 의 재동결은 불가합니다.

▼ 공기 접촉 및 반복적인 예열/개방으로 인한 배양액의 산화를 예방하기 위하여 배양액을 2~3 개의 용기에 분할하여 보관하는 것을 추천합니다.

MEDIA TYPE	COMPONENTS
Cardiosight®-S Advanced Plating Media	Cardiosight®-S Advanced Plating medium Cardiosight®-S Advanced Plating Supplement Cardiosight®-S Advanced Maintenance medium
Cardiosight®-S Advanced Maintenance Media	Cardiosight®-S Advanced Maintenance Supplement

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



세포 배양 용기 준비

1. 다음 표를 참조하여 필요한 코팅 용액의 양을 계산하십시오.

CELL CULTURE PLATE	6-well (9.6 cm ²)	12-well (3.8 cm ²)	24-well (1.9 cm ²)	48-well (1.0 cm ²)	96-well (0.33 cm ²)
COATING VOLUME	1 ml	500 µl	300 µl	100 µl	50 µl

2. 사용 직전에 코팅 용액의 최종 사용 농도를 다음 표를 참조하여 준비하십시오.

두 코팅 용액 모두 4°C 에서 보관이 가능하지만 권장하지 않습니다.

COATING TYPE	STOCK CONCENTRATION	WORKING CONCENTRATION
Matrigel	NA, 100X	1X
Fibronectin	1 mg/ml	50 µl (1:20 dilution)

▼ Fibronectin > Matrigel > Gelatin

Fibronectin 사용시 Cardiosight®-S 배양에 최상의 조건을 제공하는 반면 가격이 가장 고가이며, Matrigel 사용시 비용은 절감되나 Fibronectin 보다 세포 부착 능력이 저하됩니다. Gelatin 0.1% 사용은 가장 경제적인 옵션이나 세포 부착능력이 미약합니다. 장기 배양의 경우 일관된 결과를 위해 Fibronectin 을 사용하는 것이 좋습니다.

3. 사용하려는 각 용기에 적정량의 코팅 용액을 첨가하십시오.
4. 코팅 용액이 첨가된 용기를 부드럽게 흔든 후, 모든 면이 완전히 코팅 용액으로 덮여 있는지 확인하십시오.
5. 1 시간 동안 37°C 에서 코팅 하십시오.

4. Cardiosight®-S 해동 및 플레이팅

해동

Cardiosight®-S 는 일반적인 세포 배양 해동 방법을 사용하여 해동할 수 있습니다. 사용설명서에 (주)넥셀의 최적화된 프로토콜을 제시하고 사용자가 지침을 따라 결과를 최적화할 것을 권장합니다. 세포가 DMSO 에 노출되는 시간을 최소화하기 위해 한 번에 한 개의 바이알을 해동하는 것이 좋습니다.

1. 필요한 Cardiosight®-S Advanced Plating Media 의 양을 계산하십시오. 바이알을 재현탁 하기 위해 각 바이알마다 10ml 정도의 Advanced Plating Media 가 필요합니다. Advanced Plating Media 의 양은 사용될 well 의 수로 계산할 수 있으며, 각기 다른 용기에 대한 Plating Media 의 추천 사용량은 아래 표를 참고하십시오.

CELL CULTURE PLATE	6-well (9.6 cm ²)	12-well (3.8 cm ²)	24-well (1.9 cm ²)	48-well (1.0 cm ²)	96-well (0.33 cm ²)
PLATING VOLUME	2 ml	1 ml	500 µl	300 µl	200 µl

2. Advanced Plating Media 를 실온(RT, 25°C)에서 최소 30 분 동안 예열합니다. 각각의 세포 바이알을 해동하기 위해, Advanced Plating Media 를 8ml 씩 15ml 의 Conical Tube 에 분주하여 사용합니다.
3. Cardiosight®-S 세포 바이알을 액체 질소 저장 탱크에서 회수합니다.
4. Cardiosight®-S 세포 바이알의 뚜껑 부분이 물에 닿지 않도록 37°C 항온 수조에 약 2/3 를 담그십시오. 해동된 양을 지속적으로 확인하고 얼어 있는 부분이 ~20%(~약 3 분)가 남았을 때, 수조에서 꺼내 70% 에탄올을 뿌려 닦은 뒤 무균실험대 안으로 옮기십시오. (5. 단계를 시작할 때 바이알 내의 세포가 완전히 해동되는 것이 이상적입니다.)
5. 세포 바이알을 열고 1ml 파이펫을 사용하여 해동된 세포(~1ml)을 분주 되어 있는 8ml Advanced Plating Media 에 한 방울씩 떨어뜨리고 부드럽게 흔들어줍니다.

▶ 튜브를 부드럽게 흔들어주면서 해동된 세포를 한 방울씩 떨어뜨리는 방법은 삼투압 충격을 최소화하고 해동된 세포와 Plating Media 의 혼합을 최대화하여 세포의 생존율에

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



도움이 됩니다. 이 방법의 경우 Media 표면 위 ~1cm 의 공기중에서 천천히 떨어트리는 방법으로, 1ml 당 약 1 분이 소요됩니다. 세포 해동액 방울은 표면에 ~1 초 동안 유지된 다음, 튜브 바닥 쪽으로 떨어집니다. (함유된 DMSO 로 인해 육안으로 확인이 가능합니다.)

6. 1 ml 의 Advanced Plating Media 를 사용하여 비어 있는 바이알을 부드럽게 헹군 뒤, 5. 번에서 해동된 세포를 첨가한 튜브에 5. 번과 동일한 방법으로 옮깁니다.
7. 현탁 된 세포를 실온에서 3 분 동안 180 x g 로 원심분리 합니다.
8. 상층액을 조심스럽게 버립니다.
9. 1ml 의 Advanced Plating Media 를 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁하고 혈구 측정기 또는 자동 세포 계수기와 Trypan Blue 를 사용하여 세포 농도를 측정합니다. 측정 후 즉시 플레이팅 단계로 넘어갑니다.

▼ 세포의 생존력을 높이기 위해 강한 파이펫팅은 삼가하십시오. Cardiosight®-S 의 해동 단계에서 세포 재 현탁은 3~4 회의 부드러운 피펫팅으로 진행해야 합니다.

Cardiosight®-S 사용설명서 (Advanced media)



플레이팅

(주)넥셀은 대부분의 응용실험에서 Cardiosight®-S 의 세포 밀도를 ~150,000 cells/cm² 로 배양하는 것을 권장합니다. 각 응용실험의 프로토콜은 요청 시 제공됩니다. 최상의 실험 결과를 얻기 위해서 사용자 스스로의 실험 최적화를 통해 얻을 수 있으며 (주)넥셀은 최대한 도움이 될 수 있도록 노력하고 있습니다.

1. 선택한 배양 용기에 해당되는 알맞은 밀도의 세포수와 이에 해당되는 Advanced Plating Media 의 양을 아래의 표를 참고하여 계산하십시오.

CELL CULTURE PLATE	6-well (9.6 cm ²)	12-well (3.8 cm ²)	24-well (1.9 cm ²)	48-well (1.0 cm ²)	96-well (0.33 cm ²)
PLATING VOLUME	2 ml	1 ml	500 µl	300 µl	200 µl
CELL NUMBER	1,440,000	570,000	285,000	150,000	50,000

▼용기의 면적(cm²)은 공급업체마다 다를 수 있으므로 정확한 계산은 용기 공급업체에 문의하십시오.

2. 위에서 계산한 양의 세포 현탁액을 만듭니다.
3. 세포 배양 용기에서 용기 코팅용액을 제거합니다. 코팅된 용기의 표면이 건조되지 않도록 최대한 방지하십시오.
4. 파이펫팅으로 세포 현탁액을 부드럽게 혼합하고, 코팅된 세포 배양 용기에 균일하게 세포 현탁액을 분배합니다.
5. 세포 배양 용기를 이산화탄소 배양기로 옮기고, 배양 용기 내 균일한 세포 분포를 위해 수직 방향으로 흔들어 줍니다.
6. 다음 날, 세포 배양 용기의 Media 를 Advanced Maintenance Media 로 변경합니다.
(Cardiosight®-S 유지 배양 1. 번 참고)

5. Cardiosight®-S 유지 배양

세포를 플레이팅 한 다음날부터 시작하여, 이틀마다 Media 를 교체해야 합니다. Media 는 48 시간 간격으로 교체하는 것이 가장 좋으며, 세포의 전기 생리학적 분석 실험을 수행하는 경우에는 세포에 충분한 영양분 공급을 하기 위해 실험 당일 아침에 Media 를 교체하는 것이 좋습니다.

1. 사용 전 필요한 양의 (Plating Media 와 동일) Cardiosight®-S Advanced Maintenance Media 를 37°C 항온 수조 또는 이산화탄소 배양기에서 최소 20 분 이상 예열합니다.
2. 예열된 Media 는 무균 실험대에서 교체해야 합니다. 세포에 가해지는 손상을 최소화하기 위해 세포 배양 용기 벽면을 통해 Media 를 첨가합니다.
3. 이산화탄소 배양기에 세포 배양 용기를 다시 넣습니다.
4. 1.에서 3. 까지의 단계를 2 일마다 반복합니다.

Cardiosight®-S 배양 7 일차부터 계획된 실험을 수행하는 것을 권장합니다. 10 일 이상의 장기배양시 세포 응집으로 이어질 수 있으므로 세포를 주의 깊게 관찰하고, 장기 배양을 진행할 경우 Fibronectin 코팅을 사용하는 것이 좋습니다.