

取扱説明書

Dissociation Solution for human ES/iPS Cells

Cat.# RCHETP002

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに -20°C で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存して下さい。解凍後は1週間を目安に使い切して下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

- ・高い生存率での継代が可能になります
- ・短時間かつ簡便な操作で継代が可能になります
- ・ヒトiPS細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
- ・無菌検査済みです。
- ・Ready-to-Useです。
- ・血清は不含です。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

Dissociation Solution for human ES/iPS Cells を用いたヒトES/iPS細胞の継代方法

継代方法 (試薬類はあらかじめ室温に戻してご使用下さい。)

A. オンフィーダー培養(60 mm ディッシュ)の場合

準備するもの

- ・本品:Dissociation Solution for human ES/iPS Cells(以下、これを「剥離液」と総称する)
- ・Primate ES Cell Medium に 5ng/mL bFGF(RCHET002, 003)を添加したもの(以下、これらを「ES Medium」と総称する)注1)
- ・フィーダー細胞を播種した60mm細胞培養ディッシュ
- ・PBS(-): $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ -free PBS
- ・その他培養操作に通常必要なもの

- A1、あらかじめ準備しておいたフィーダー細胞ディッシュからフィーダー細胞用培地を取り除き、新しいES Mediumを4 mL加えておきます。
- A2、継代可能な状態のヒトES/iPS細胞のディッシュからES Mediumを取り除き、PBS(-) 2mLで細胞を洗います。
- A3、剥離液をディッシュに1 mL加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、 37°C 、 CO_2 インキュベーターで5分程加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態、フィーダー細胞の種類によって異なる場合があります。
- A4、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがフィーダー細胞から剥がれかけている状態になっている事を確認します。加温時間は調整して下さい。
- A5、新しいES Mediumを2~3 mL加え、ES/iPS細胞とフィーダー細胞を全て剥がし15 mLチューブに回収します。注2)
- A6、約 $170 \times g$ ($1,000\text{ rpm}$)、5分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除きます。
- A7、沈殿した細胞に新しいES Mediumを1 mL加え、 $p-1000$ ピペッ

マンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりとピペッティングし、コロニーの大きさを $100\sim 200\ \mu\text{m}$ 程度に崩します。注3)

A8、懸濁した液の約 $1/3\sim 1/4$ を、操作A1で準備した新しいフィーダー細胞上にまき、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、 37°C 、 CO_2 インキュベーターで一晩培養します。継代の希釈割合は、ご使用の細胞株の増殖速度等によって異なります。注4)
翌日から毎日1回、ES Mediumの交換を行って下さい。

B. フィーダーレス培養

準備するもの

- ・本品:Dissociation Solution for human ES/iPS Cells(以下、これを「剥離液」と総称する)
- ・ReproFFに 5ng/mL bFGF(RCHET002, 003)を添加したもの(以下、これらを「ReproFF」と総称する)注1)
- ・Laminin-5(またはマトリゲル)コート済み35 mm細胞培養ディッシュ
- ・PBS(-): $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ -free PBS

B1、あらかじめ準備しておいたLaminin-5(またはマトリゲル)コート済みディッシュから余分な液体を取り除き、ReproFFを1.5 mL加えておきます。Laminin-5をご使用の場合は、PBS(-)で2回洗浄した後、ReproFFを加えます。(ディッシュを乾燥させると活性が低下してしまうので、コーティング表面が乾かないようにして下さい。)

B2、フィーダーレス培養中のディッシュからReproFFを除き、PBS(-) 1 mLで細胞を洗います。

B3、剥離液をディッシュに1 mL加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、 37°C 、 CO_2 インキュベーターで5分程度加温します。

B4、新しいReproFFで15 mLチューブに細胞を回収し、約 $170 \times g$ ($1,000\text{ rpm}$)、5分間、室温で遠心します。マトリゲルコートディッシュをご使用の場合は、細胞がはがれにくい場合がありますので、その際はセルスクレーパーで細胞を回収して下さい。

B5、上清を除き、新しいReproFFを1 mL加え、 $p-1000$ ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりとピペッティングし、コロニーの大きさを $200\sim 300\ \mu\text{m}$ 程度(オンフィーダー培養の継代より大きめに)に崩します。注4)

B6、操作B1で準備したディッシュに細胞懸濁液を半量程度、継代します。オンフィーダー培養に比べ細胞の接着率が若干低いため、少し高めの濃度で継代して下さい。継代の希釈割合は、ご使用の細胞株の増殖速度、Laminin-5のコーティング濃度等によって異なります。

B7、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターで一晩培養します。

翌日から毎日1回、ReproFFで培地交換を行って下さい。

ご注意)

- 1) ヒトES/iPS細胞の培養にはbFGFの添加が必要です。濃度は細胞株によって異なる場合がございます。
- 2) 細胞は基本的にES/iPS細胞とフィーダー細胞がともに剥がれます。
- 3) 部分的にES/iPS細胞のコロニーがフィーダー細胞の塊に取り込まれる場合があります。その場合は無理にピペッティングせず、その塊を取り除いて、残りのES/iPS細胞コロニーで継代を行って下さい。
- 4) 継代時は古いフィーダー細胞も持ち越されます。フィーダー細胞を持ち越したくない場合は、細胞を懸濁後5~10分程静置して下さい。ES/iPS細胞のコロニーが先に沈み、上清には細くなったフィーダー細胞が残っているので、これを取り除くことで古いフィーダー細胞の大部分を取り除くことができます。

関連製品

RCHEMD001	Primate ES Cell medium
RCHEMD003, 004	ReproFF
RCHEMD005	Repro Stem
RCHEFM001	Freezing Medium for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat
RCHEOT002, 003	bFGF
RCHEOT004	Lamimin-5
RCHEFC001	Feeder Cells (SL10)
RCHEFC003	Feeder Cells (MEF)

株式会社リプロセル

<http://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com