

ヒトiPS/ES細胞用凍結保存液 CP-5E

研究用試薬

本品は、ヒト iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) 及びヒト ES 細胞 (胚性幹細胞) の緩慢凍結に最適化された凍結保存液です。SNL フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞を分散液 Pronase/EDTA for Stem (別売品) で分散し、本品で緩慢凍結保存することで高い生存率が得られます。尚、本品は、細菌、マイコプラズマ、エンドトキシンの検査を実施しております。

【全般的な注意】

- (1) 本品は研究用試薬です。それ以外の目的には使用しないでください。
- (2) 本品の使用にあたっては細胞培養技術を習熟の上でバイオハザード対策を実施してご使用ください。
- (3) 本品を誤って飲み込んだりしないように十分注意してください。万一、飲み込んでしまった場合、すぐに吐き出してください。眼、皮膚等に付いた場合、すぐに洗浄してください。異常が見られた場合は、すぐに医師の診察を受けてください。
- (4) 本品の無菌保証は開封前までです。開封後はすみやかに使用してください。
- (5) 使用説明書に記載された操作方法以外については保証致しません。

【組成】

Hydroxyethyl starch (HES)	6 %
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	5 %
Ethylene glycol	5 %
塩化ナトリウム	

【使用目的】

ヒト iPS/ES 細胞の緩慢凍結保存

【操作上の注意】

- (1) 細胞凍結時には、必ず氷上にて十分冷やしてからご使用ください。
- (2) 本品を使用して SNL フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞を凍結保存する際には、Pronase/EDTA for Stem (別売品) を使用して細胞の回収を行なってください。その他の剥離・分散液を使用した場合、期待する性能が得られない可能性があります。
- (3) MEF フィーダー細胞上、あるいはフィーダーフリー培養したヒト iPS/ES 細胞を本品で凍結保存する場合には、適切な分散液を選択し、ヒト iPS/ES 細胞の回収を行なってください。

【使用方法】

ヒト iPS/ES 細胞の凍結保存の操作プロトコールは、裏面をご参照ください。

【使用上又は取扱い上の注意】

- (1) すべての操作は無菌的に行なってください。
- (2) 本品は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。凍結させた試薬は、品質が変化して期待する性能が得られない可能性がありますので、使用しないでください。
- (3) 本品を取扱う場合には、必ず白衣、マスク、保護メガネ、手袋等を着用してください。

- (4) 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (5) 容器の破損が認められたもの、または容器内に異物が認められた場合は使用しないでください。
- (6) 廃棄する場合には、感染性廃棄物として処理した後に廃棄してください。廃棄方法については、各自治体により処理方法が異なるため、各自治体の指示に従って廃棄してください。

**【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：1～30℃

有効期間：24 ヶ月

【包装単位】

コード No.	品名	包装内容
27203	CP-5E	100 mL

【参考文献】

- (1) Imaizumi, Keitaro. *et al.*: A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol. *PLoS One*. 2014 Feb 12;9(2):e88696.
- (2) Imaizumi, Keitaro. *et al.*: A simple and efficient method of slow freezing for human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *ES Cells: Methods and Protocols-2nd Edition*, Springer Protocols, 2015 in press.


【別売品】

Pronase/EDTA for Stem (製品コード：28111)

【お問い合わせ先】

極東製薬工業株式会社 営業学術部
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町 7-8
電話 03-5645-5664
FAX 03-5645-5703

製造販売元

 極東製薬工業株式会社
茨城県高萩市上手綱朝山3333-26

本社住所

東京都中央区日本橋小舟町7-8

【プロトコール】

分散液「Pronase/EDTA for Stem」と凍結保存液「CP-5E」を用いたヒト iPS/ES 細胞の緩慢凍結保存法

本方法は SNL フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞の凍結保存に最適化されております。

凍結方法

6 well プレートの 1 well で培養したヒト iPS/ES 細胞を凍結保存する場合

準備するもの

- ✓ CP-5E：必要量（0.5 mL/バイアル）分注し、使用直前まで必ず氷上にて冷却してください
- ✓ Pronase/EDTA for Stem：温浴にて 37℃ に温めてください
- ✓ ヒト iPS/ES 細胞用培地
- ✓ PBS(-)
- ✓ 凍結用バイアル
- ✓ その他培養操作に必要なもの

方法

- (1) 細胞の状態を確認し、必要に応じて分化したコロニーを除去します。
- (2) 培養容器からアスピレーターを用いて培地を除去します。
- (3) PBS(-)で細胞を緩やかに 1 回洗浄します。温浴で温めた Pronase/EDTA for Stem を 1 mL/well 添加し、37℃ の CO₂ インキュベーター内で 2~5 分程度静置します（注①）。
- (4) 浮遊してきた SNL フィーダー細胞をアスピレーターで除去します。
- (5) 新しい培地 1 mL/well を緩やかに添加し、細胞を 1 回洗浄します（注②）。
- (6) 新しい培地 2 mL/well を添加し、ピペティングにてヒト iPS/ES 細胞コロニーを培養容器から剥がします。
- (7) 細胞を遠心チューブに回収し、セルカウントします（注③）。
- (8) 遠心（300 x g、3 分間、4℃）後、上清を取り除きます。
- (9) 4x10⁴~ cells/mL になるように、氷上で冷却している CP-5E を添加して均一に懸濁します。
- (10) 細胞懸濁液を凍結用バイアルへ 500 μL ずつ分注します（注④）。
- (11) フリージングコンテナに入れて -80℃ で一晩緩慢凍結します。
- (12) 翌日、液体窒素または -150℃ 以下のディープフリーザーにて保存します。

注意

- ① この処理が長すぎると細胞のロス、生存率の低下などの原因となります。フィーダー細胞の状態やヒト iPS/ES 細胞の株によって剥離のスピードは異なりますので、適宜、確認してください（図 1）。
- ② 洗浄は、PBS(-)ではなく培地で行ってください。コロニーが細分化しているため、ヒト iPS/ES 細胞が剥がれやすくなっています。
- ③ 回収した細胞懸濁液から一部を抜き取り、ピペティングにてシングルセル化します。その後、トリパンブルー染色法によりセルカウントしてください。
- ④ 液量が多くなると生存率が低下します。

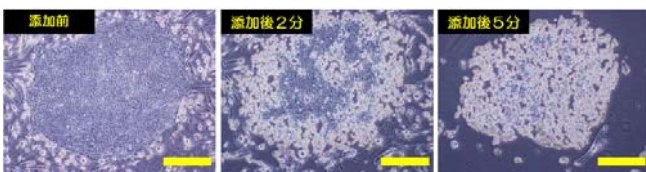


図 1. Pronase/EDTA for Stem 処理による細胞剥離の様子
先に、SNL フィーダー細胞が剥離、浮遊し、続いて時間差でヒト iPS 細胞(201B7)のコロニーに適度にひびが入る。
(Scale bar : 500 μm)

融解方法

バイアル 1 本（2 x 10⁴ cells）を 10 cm ディッシュに融解する場合

準備するもの

- ✓ ヒト iPS/ES 細胞用培地：予め室温に戻しておいてください
- ✓ ROCK 阻害剤（10 μM Y-27632 など）
- ✓ その他培養操作に必要なもの

方法

- (1) 凍結しておいたバイアルを取り出し、37℃温浴にて 8 割程度（氷片が残る程度）融解します。
- (2) 培養する培地 5mL 程度に添加します。
- (3) 遠心（300 x g、3 分間、4℃）し、上清をアスピレーターで注意深く除去します。
- (4) ROCK 阻害剤を含む培地を 12 mL 添加し、懸濁します。
- (5) 10 cm ディッシュへ播種します（注）。
- (6) 48 時間後、ROCK 阻害剤非添加の培地に交換します。
- (7) 3 日後以降は、適宜培地を交換します。
- (8) 適度なサイズのコロニーになるまで 6~10 日程度培養を続けてください。

注意

バイアル 1 本（2 x 10⁴ cells）を 10 cm ディッシュに播種した場合、6~10 日程度培養すると適度な密度となります。

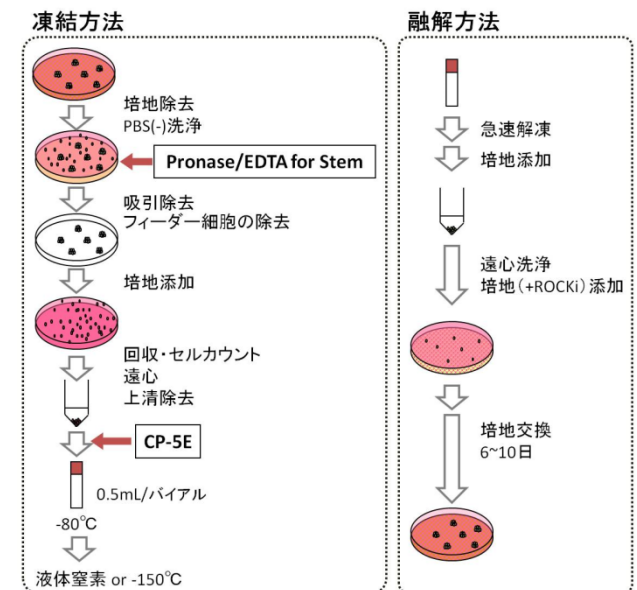


図 2. 操作方法の概略