

ヒトiPS/ES細胞用分散液

研究用試薬

Pronase/EDTA for Stem

Pronaseは放線菌（*Streptomyces griseus*）が分泌するプロテアーゼの混合物であり、広範囲な基質特異性を有しています。

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）の分散に最適化された試薬です。本品でヒトiPS/ES細胞を分散することにより、凍結保存に適した均一な小クランプを調製することができます。凍結保存液CP-5E（別売品）と併用した場合、他の細胞剥離液と比較して凍結融解後の生存率が高いことが示されています。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】

Pronase	75 mg/L
EDTA	0.2mM
D-PBS(-)	

* pH 7.2-7.4

【使用目的】

SNL フィーダー細胞の剥離及びヒトiPS/ES細胞の分散

【操作上の注意】

- (1) 必要に応じて温める等してご使用ください。
- (2) 本品を使用して分散させたヒトiPS/ES細胞を凍結保存する際には、必ずCP-5E（別売品）を使用してください。その他の試薬を使用した場合、期待する性能が得られない可能性があります。

【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) 貯蔵方法に従い保存してください。
- (3) 融解後はすみやかに使用してください。融解後、一度に使用しない場合は必要に応じて小分け分注し、再度凍結してください。
- (4) 凍結融解を繰り返すと期待する性能が得られない可能性がありますので、小分け分注後の試薬は使い切りとし、再度凍結融解は行わないでください。

- (5) 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。
- (6) 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (7) 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。
- (8) 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：-15℃以下

有効期間：24 ヶ月

【包装単位】

コード No.	品名	包装内容
28111	Pronase/EDTA for Stem	100 mL

【参考文献】

- (1) 野本正雄、他：放線菌プロテアーゼの研究（第六報）．理化学研究所報告．1959, 35(2), p.154-166.
- (2) 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.
- (3) 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】

CP-5E（製品コード：27203）

【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

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。

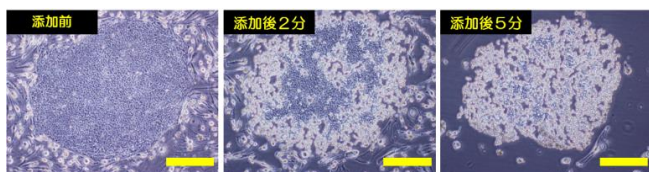


図 1. Pronase/EDTA for Stem 処理による細胞剥離の様子
先に、SNL フィーダー細胞が剥離、浮遊し、続いて時間差でヒト iPS 細胞(201B7)のコロニーに適度にひびが入る。
(Scale bar : 500 μm)

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。

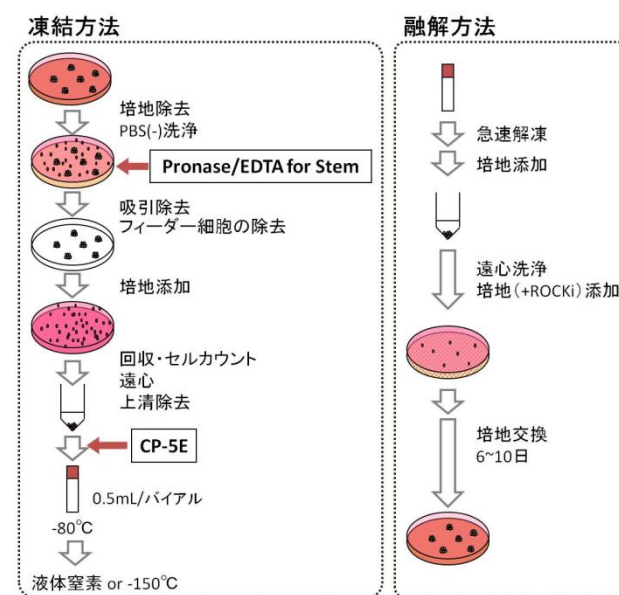


図 2. 操作方法の概略