

ヒト iPS/ES 細胞用剥離液 「Pronase/EDTA for Stem」 プロトコル集

【プロトコル一覧】

1. ヒト iPS 細胞の凍結保存・融解方法
 - 1-1) オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の場合
 - 1-2) フィーダーレスシングルセルフラット培養した iPS 細胞の場合
2. オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の継代
3. フィーダーレス培養したヒト iPS 細胞の継代
 - 3-1) シングルセルフラット培養したヒト iPS 細胞の場合
 - 3-2) クランプセル培養したヒト iPS 細胞の場合
4. オンフィーダー培養ヒト iPS 細胞のシングル化の検討

【プロトコル】

1. ヒト iPS 細胞の凍結保存・融解方法
 - 1-1) オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の場合
→ 使用説明書の裏面をご確認ください。

1-2) フィーダーレスシングルセルフラット培養したヒト iPS 細胞の場合

■ 凍結保存（6 ウェルプレート 1 ウェルを処理する場合）

1. 培地を吸引除去し、PBS (-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem を 1 mL 加える。
3. インキュベーター内で 2~5 分間静置し、細胞を剥離・分散する。
4. 培地を加え、ピペッティングにて細胞をシングル化し、細胞数を計数する。
5. 細胞懸濁液を遠心チューブに回収し、遠心（400×g, 3 分, 4°C）後、上清を除去する。
6. あらかじめ氷冷した CP-5E を加えて、 2×10^6 cells 以上/mL になるように均一に懸濁する。
7. 0.5mL ずつ凍結用バイアルに分注し、フリージングコンテナに入れ、-80°C で凍結する。
8. 翌日には液体窒素または -150°C ディープフリーザーへ移す。

■ 融解（1 バイアルを処理する場合）

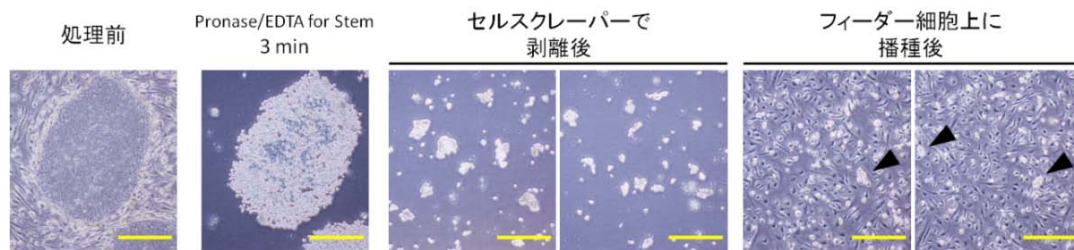
1. あらかじめ ECM コートした 6-well プレートを用意する。
2. 培地 5 mL を遠心チューブに分注し、室温に戻す。
3. 凍結していたバイアルを液体窒素から取り出し、37°C の温浴で融解する。
4. 融解した細胞を培地 5 mL へ加え、遠心（400×g, 3 分, 4°C）する。
5. 上清を除去し、ROCK 阻害剤添加培地を加えて再懸濁する。
6. 細胞数を計数する。
7. あらかじめ ECM コートしたプレートへ $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/well になるように播種する。
（最終容量 2 mL/well）
8. 翌日、ROCK 阻害剤非添加の培地に交換し、その後、毎日培地交換を行う。

⚠ 注意点

- ・ 翌日の初期接着率は、細胞株や培地、ECM 処理などの条件によって異なります。
ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。
- ・ 凍結前の培養条件がクランプ培養であっても、シングルセル状態にすることで凍結保存が可能です。
また、融解の際にシングルセルフラット状態で培養することが可能です。

2. オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の継代 (6 ウェルプレート 1 ウェルを処理する場合)

1. 培地を吸引除去し、PBS(-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem 1 mL を加える。
3. インキュベーター内で 2~5 分間静置し、細胞を剥離・分散する。
4. 先に剥離してくる SNL フィーダー細胞を吸引除去した後、PBS(-) 2 mL で洗浄する。
5. 培地を 1 mL 加え、セルスクレーパーにてコロニーを培養容器から剥がす。
6. 回収した細胞懸濁液を遠心チューブに移す。
7. 必要に応じて培地を加え、新しいフィーダー細胞上に細胞を播種する (2 mL/well)。
8. 48 時間後、培地交換を行う。
9. 3 日後以降は適宜培地を交換し、適度なサイズのコロニーになるまで培養する。



オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞株 201B7 の継代の様子

Pronase/EDTA for Stem を用いてオンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の継代ができることを確認しました。細胞塊をフィーダー上に播種後、約 1 週間で次の継代が可能であることを確認しました (Scale bar: 500 μ m)。

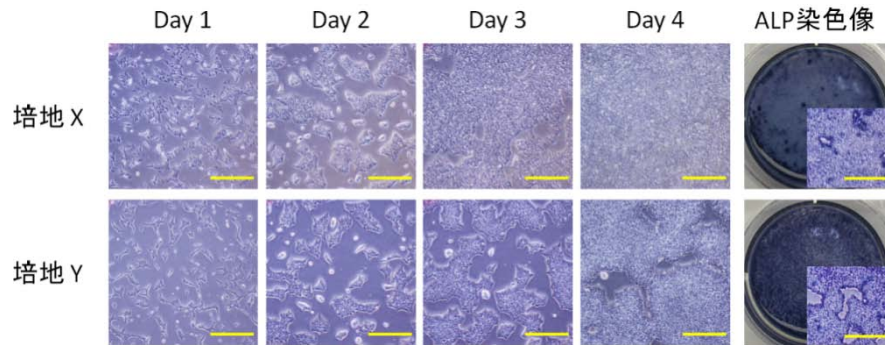
⚠ 注意点

- ・細胞を剥離、分散する際の処理時間は、フィーダーの状態や細胞株によって異なります。ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。
- ・処理時間が長すぎると細胞塊が小さくなりすぎるため、播種後の培養時間の長期化や初期接着不良等が起こる可能性があります。凍結保存に用いるよりも短時間での処理をお勧めします。

3. フィーダーレス培養したヒト iPS 細胞の継代

3-1) シングルセルフラット培養したヒト iPS 細胞の場合

1. 培地を吸引除去し、PBS(-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem 1 mL を加える。
3. インキュベーター内で 2~5 分間静置し、細胞を剥離・分散する。
4. 培地を 1 mL 加え、ピペッティングにて細胞を培養容器から剥がし、シングル化する。
5. 回収した細胞懸濁液を遠心チューブに移し、遠心 (400 $\times$ g, 3 分, 4°C) 後、上清を除去する。
6. ROCK 阻害剤添加培地を加えて再懸濁し、細胞数を計数する。
7. あらかじめ ECM コートした新しいディッシュ上に細胞を播種する (2 mL/well)。
8. 翌日、ROCK 阻害剤非添加の培地に交換し、その後、毎日培地を交換する



フィーダーレス シングルフラット培養したヒト iPS 細胞株 201B7 継代の様子

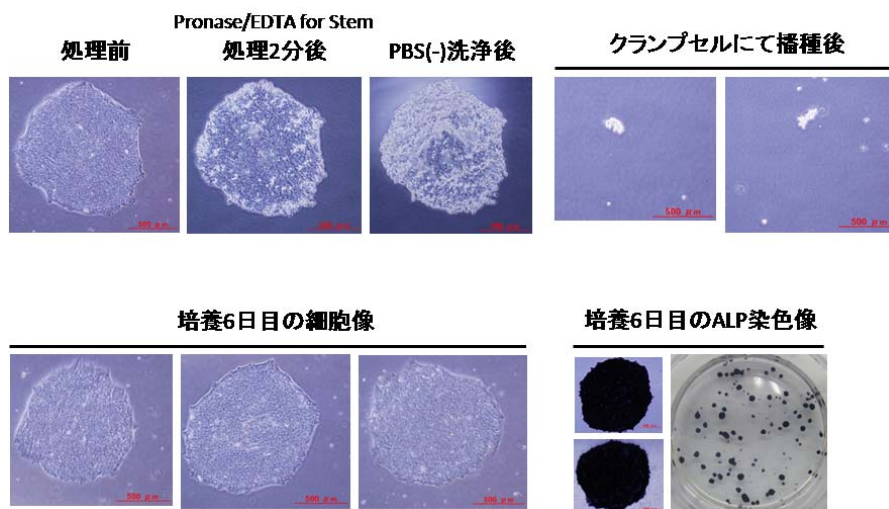
Pronase/EDTA for Stem を用いて継代し、フィーダーレス シングルフラット培養したヒト iPS 細胞は、初期接着、増殖ともに良好であり、ALP 染色陽性であることを確認しました (Scale bar: 500 μm, 細胞播種数 2×10^5 cells/well, 6-well プレート)。

⚠️ 注意点

- ・細胞を剥離、分散する際の処理時間や細胞播種密度は、細胞株によって異なります。ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。
- ・播種時は必ず ROCK 阻害剤を添加した培地をご使用ください。

3-2) クランプセル培養したヒト iPS 細胞の場合

1. 培地を吸引除去し、PBS (-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem 0.5 mL を加える。
3. 室温で 2 分程度整地し、細胞間の接着が緩む程度まで処理する。
4. Pronase/EDTA for Stem を除去し、PBS (-) 1 mL で洗浄する。
5. 培地を適量添加し、スクレーパーもしくは培地を吹き付けてディッシュから細胞を剥がす。
6. 細胞を遠心チューブに回収し、ピペッティングにより適度な大きさのクランプを形成する。
7. ECM をコートした新しいディッシュ上へ播種する。
8. 48 時間後に培地交換を行う。その後は 2 日に一度、培地交換を行う。



フィーダーフリー クランプセル培養したヒト iPS 細胞株 PFX#9 の継代の様子

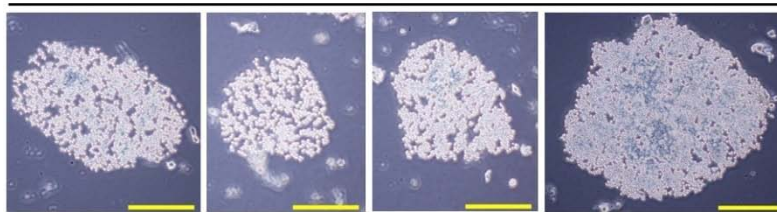
Pronase/EDTA for Stem を用いてフィーダーフリー培養したヒト iPS 細胞の継代ができることを確認しました。細胞塊を新しいプレート上に播種後、4~6 日程度で次の継代が可能であることを確認しました (Scale bar: 500 μm)。

⚠ 注意点

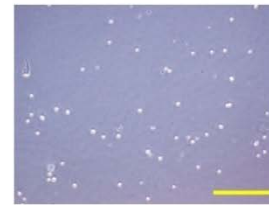
- ・細胞を剥離, 分散する際の処理時間や細胞播種密度は、細胞株によって異なります。
ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。

4. オンフィーダー培養ヒト iPS 細胞のシングル化の検討

1. 培地を吸引除去し、PBS (-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem 1 mL を加える。
3. 37°C インキュベーター内で 1~3 分間静置する。
4. 先に剥離してくる SNL フィーダー細胞を吸引除去した後、PBS (-) 2 mL で洗浄する。
5. 新しい Pronase/EDTA for Stem 1 mL を加え、37°C インキュベーター内で 3~10 分間静置する。
6. 培地を加え、ピペッティングにて細胞を培養容器から剥がし、シングル化する。
7. 回収した細胞懸濁液を遠心チューブに移す。
8. 遠心 (300xg、5 分、4°C) 後、上清を除去する。
9. 培地を加え、ピペッティングにて再懸濁する。



A. Pronase/EDTA for Stem 処理後 3 分の細胞の様子



B. 遠心・再懸濁後の様子

オンフィーダー培養ヒト iPS 細胞株 201B7 のシングル化の様子

Pronase/EDTA for Stem を用いてフィーダー細胞を除去した後に、さらに Pronase/EDTA for Stem で処理することにより、オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞のシングル化ができることを確認しました (Scale bar: 500 μ m)。

【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