

取扱説明書

ReproNaïve™

Cat. No. RCHEMD008

Version 1.0

概要

この取扱説明書は、フィーダー細胞上で培養されたヒト iPS 細胞を、**Complete ReproNaïve™ Medium** (ReproNaïve™ Basal Medium, ReproNaïve™ Supplement, LIF を混合した培地の総称となります。)を用いた培養方法へ移行し、維持・継代する方法について説明しています。

この培地を用いた継代・培養においては、5%O₂・5%CO₂ インキュベーター内で SL10 細胞 (RCHEF001) と培養する必要があります。

培養操作は安全キャビネット内で無菌下にて行ってください。

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。

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℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は2~8℃で保存して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃で保存して下さい。解凍後は2週間を目安に使い切して下さい。凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

- ・ヒト iPS 細胞 (Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007) でロット試験済みです。
- ・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
- ・血清は含まれておりません。

本製品をご使用の際は以下の点にご注意ください。

- ・5%O₂・5%CO₂ インキュベーターを必要としますので、ご準備ください。
- ・ReproNaïve™ Basal Medium に ReproNaïve™ Supplement (6.8 μL/mL) と Human Recombinant LIF (10-100 ng/mL) を加えてください。以下、この培地を **Complete ReproNaïve™ Medium** とします。
- ・ご使用時には ReproNaïve™ Basal Medium と ReproNaïve™ Supplement を室温に戻してください。その際、恒温槽などはご使用にならないでください。
- ・ReproNaïve™ Supplement は、できるかぎり遮光下でお取り扱い下さい。
- ・このマニュアルでは 20 ng/mL の LIF を使用していますが、濃度はご使用の細胞株によって異なる場合があります。
- ・**Complete ReproNaïve™ Medium** に移行してから4継代までに徐々に細胞数が減少しますので、継代後48時間までは Y27632 (10 μM) を添加した状態で培養してください。

目次

- ・本製品及び必要試薬と装置
- ・ReproNaïve™ の培養プロトコル
 - 培養試薬の準備
 - オンフィーダー培養から Complete ReproNaïve™ Medium 培養への移行方法
 - Complete ReproNaïve™ Medium を用いた細胞の継代方法
 - Complete ReproNaïve™ Medium を用いた SL10 フィーダー細胞培養のヒト iPS 細胞の形態
- ・よくある質問
- ・補足資料

本製品

製品	Cat. No.	容量	保管方法
ReproNaive™ Basal Medium	RCHEMD008	500 mL	-20 °C
ReproNaive™ Supplement		0.68 mL ×5 vials	-20 °C

必要試薬と装置

製品	Cat. No.	容量	保管方法
Stemfactor™ LIF, Human Recombinant	ReproCELL 03-0016	10 µg (1 mL)	4 °C
SL10 フィーダー細胞	RCHEFC001	3x10 ⁶ cell per vial (5 vials)	Liquid nitrogen
ヒト ES/iPS 細胞用 剥離液	RCHETP002	30 mL	-20 °C
ReproCoat™	RCHEOT001	500 mL	室温
ESGRO Complete™ Accutase™	Millipore SF006	100 mL	4 °C
Y27632	-	-	-
PBS (-). Ca ²⁺ - and Mg ²⁺ -Free	-	-	-
DMEM-high glucose	Sigma, Cat.D5796	500 mL	4°C
Fetal bovine serum (FBS)	GIBCO, Cat.10437	500 mL	4°C
Sodium Pyruvate	Sigma, Cat.S8636	100 mL	4°C
60 mm Tissue Culture Dish	-	-	-
5% O ₂ , 5% CO ₂ インキュベーター	-	-	-
その他培養操作に通 常必要なもの	-	-	-

ReproNaive™を用いた培養プロトコル

培養試薬の準備

SL10 フィーダー細胞の準備

1. 細胞培養用ディッシュを ReproCoat あるいは 0.1%ゼラチン溶液でコーティングしてください。
2. SL10 フィーダー細胞のマニュアルに従って、細胞を解凍してください。
3. ReproCoat あるいは 0.1%ゼラチンでコーティングされたディッシュに SL10 フィーダー細胞を 4.5x10⁴ cells/cm² の播種密度になるように播種してください。(表 1 参照)
注 1 : SL10 の播種細胞数は、一般的な多能性幹細胞の培養で使用する細胞数よりも多く必要となります。
4. SL10 フィーダー細胞は **Complete ReproNaive™ Medium** で使用する前に、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで 3-4 日間培地交換せずに培養しておきます。

オンフィーダー培養から Complete ReproNaive™ Medium 培養への移行方法

注2：以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。
(他の培養スケールの場合は表 2 を参考にしてください。)

注3：ヒト ES/iPS 細胞がディッシュ底面に対して 30%程度を覆うのを目安に移行を行ってください。(図 1 参照)



図 1
移行前のコロニーの密度のディッシュを Alkaline Phosphatase (ALP) 染色したものを。

Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) の調製

注4：Complete ReproNaive™ Medium は毎日新しいものを調製してご使用ください。

1. ReproNaive™ Basal Medium から必要量を分注して、室温に戻してください。
2. ReproNaive™ Supplement を室温に戻してから、1 分間 Vortex をかけて混合してください。

注5：ReproNaive™ Supplement はできる限り光にさらさないようにしてください。

3. 下表及び表 2 を参考に ReproNaive™ Basal Medium に ReproNaive™ Supplement、LIF を添加して Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) を調製してください。

ReproNaive™ Basal Medium:	5 mL
ReproNaive™ Supplement:	34.0 µL
LIF (10 µg/mL stock)	10 µL
Y27632 (10 mM)	5 µL
合計:	5.049 mL

Complete ReproNaive™ Medium への移行 (Day 0)

注6：SL10 フィーダー細胞をご準備ください。
(P.2 の表 SL10 フィーダー細胞の項目および表 1 参照)

1. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞のディッシュから培地を除き、2 mL の PBS(-) で細胞を洗ってください。
2. PBS (-) を除去し、1 mL の ES/iPS 細胞用剥離液を加えて、37°C、5%CO₂ インキュベーターに 4 分おいてください。
3. 上清を除去してください。5 mL のディスプレイブルピペットで 2 mL のオンフィーダー用の培地を加えて、コロニーを剥がし 15 mL チューブに移してください。
4. コロニーを沈殿させるために 3 分間静置して、上清をできるだけ除去してください。
5. 1 mL の ACCUTASE™ を 15 mL チューブに添加した後、37°C、5%CO₂ インキュベーターに 5 分おいてください。
6. 1 mL のオンフィーダー用の培地を添加して、300×g、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除去します。
7. 1 mL の Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) を加え、細胞を懸濁してください。

8. フィーダー細胞が培養されたディッシュから上清を除去して、3 mL の Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) を加えてください。
9. 1 mL の細胞懸濁液を加えてください。
10. 細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37°C、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養します。

培地交換 (Day 1)

1. 表 2 を参考に Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) を調製してください。
2. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞から培地を除いてください。4 mL の Complete ReproNaive™ Medium (+Y27632) を加えてください。
3. 37°C、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養してください。

培地交換 (Day 2 と 3)

1. ReproNaive™ Basal Medium から必要量を分注して、室温に戻してください。
2. ReproNaive™ Supplement を室温に戻してから、1 分間 Vortex をかけて混合してください。

注7：ReproNaive™ Supplement はできる限り光にさらさないようにしてください。

4. 下表及び表 2 を参考に ReproNaive™ Basal Medium に ReproNaive™ Supplement、LIF を添加して Complete ReproNaive™ Medium を調製してください。

3.

ReproNaive™ Basal Medium:	5 mL
ReproNaive™ Supplement:	34.0 µL
LIF (10 µg/mL stock)	10 µL
合計:	5.044 mL

4. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞から培地を除いてください。4 mL の Complete ReproNaive™ Medium を加えてください。
5. 37°C、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養してください。
6. 毎日培地交換してください。

注8：Day 3 あるいは Day 4 になりましたら継代してください。(播種した日を Day 0 とします。)

Complete ReproNaïve™ Medium を用いた細胞の継代

注 9 : 以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。
(補足資料の表 2 を参考にしてください。)

Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632) の調製

注 10 : Complete ReproNaïve™ Medium は毎日新しいものを調製してご使用ください。

1. ReproNaïve™ Basal Medium から必要量を分注して、室温に戻してください。
2. ReproNaïve™ Supplement を室温に戻してから、1 分間 Vortex をかけて混合してください。
注 11 : ReproNaïve™ Supplement はできる限り光にさらさないようにしてください。
3. 下表及び表 2 を参考にして ReproNaïve™ Basal Medium に ReproNaïve™ Supplement、LIF を添加して **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を調製してください。

ReproNaïve™ Basal Medium:	5 mL
ReproNaïve™ Supplement:	34.0 µL
LIF (10 µg/mL stock)	10 µL
Y27632 (10 mM)	5 µL
合計:	5.049 mL

Complete ReproNaïve™ Medium で培養された細胞の継代 (Day 0)

注 12 : SL10 フィーダー細胞をご準備ください。
(P.2 の SL10 フィーダー細胞の項目および表 1 参照)

1. **Complete ReproNaïve™ Medium** で培養しているヒト ES/iPS 細胞のディッシュから培地を除き、2 mL の PBS (-) で細胞を洗ってください。
2. PBS (-) を除去し、1 mL の ACCUTASE™ をディッシュに添加した後、37℃、5%O₂、5%CO₂ インキュベーターに 10 分おいてください。
3. 1 mL の **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を添加して、P-1000 ピペットで 15 mL チューブに全量移してください。
4. 300×g、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除去します。
5. 0.3 mL の **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を加え、細胞を懸濁してください。
6. フィーダー細胞が培養されたディッシュから上清を除去して、4 mL の **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を加えてください。
7. 0.1 mL の細胞懸濁液を加えてください。
注 13 : 移行後 4 継代目までは細胞が減りますので、1:3 の希釈率で継代してください。5 継代目以降、培養が安定した後は 1:3 あるいは 1:4 の希釈率での継代が可能です。
8. 細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、**37℃、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養**します。

培地交換 (Day 1)

1. 表 2 を参考にして **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を調製してください。
2. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞のディッシュから培地を除いてください。4 mL の **Complete ReproNaïve™ Medium (+Y27632)** を加えてください。
3. 37℃、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養してください。

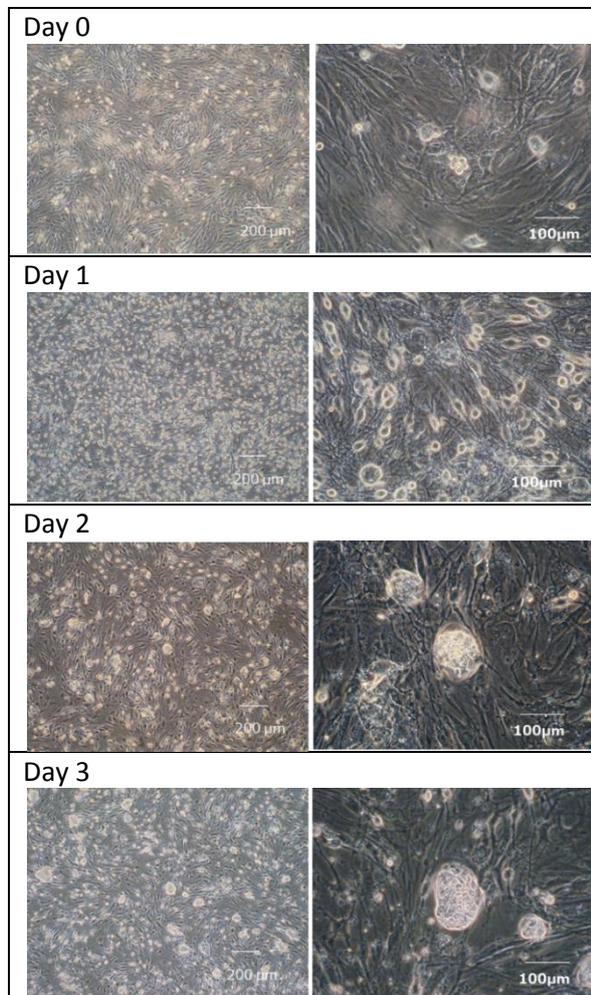
培地交換 (Day 2 と 3)

4. ReproNaïve™ Basal Medium から必要量を分注して、室温に戻してください。
5. ReproNaïve™ Supplement を室温に戻してから、1 分間 Vortex をして混合してください。
注 14 : ReproNaïve™ Supplement はできる限り光にさらさないようにしてください。
5. 下表及び表 2 を参考にして ReproNaïve™ Basal Medium に ReproNaïve™ Supplement、LIF を添加して **Complete ReproNaïve™ Medium** を調製してください。

ReproNaïve™ Basal Medium:	5 mL
ReproNaïve™ Supplement:	34.0 µL
LIF (10 µg/mL stock)	10 µL
合計:	5.044 mL

4. フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞のディッシュから培地を除いてください。4 mL の **Complete ReproNaïve™ Medium** を加えてください。
5. 37℃、5%O₂・5%CO₂ インキュベーターで培養してください。
6. 毎日培地交換してください。
注 15 : Day 3 あるいは Day 4 になりましたら継代してください。(播種した日を Day 0 とします。)

Complete ReproNaive™ Medium を用いた ヒト iPS 細胞の形態



よくある質問

Q1. 前日に LIF と ReproNaive™ Supplement を加えて Complete ReproNaive™ Medium を調製し、保存してもよいですか？

A1. LIF と ReproNaive™ Supplement は毎日、用事調製をしてください。

Q2. SL10 フィーダー細胞は解凍翌日に使ってもよいですか？

A2. Day 1 の SL10 フィーダー細胞の状態は、Complete ReproNaive™ Medium で培養されたヒト iPS 細胞が接着しにくい可能性があります。Day 3-4 の SL10 フィーダー細胞の状態の方が、Complete ReproNaive™ Medium で培養されたヒト iPS 細胞の接着が良好になります。

Q3. オンフィーダー培養から切り替えて継代後に、徐々にコロニー数が減っていますが、どうしたら良いですか？

A3. 5 継代までは培養を続けてください。Complete ReproNaive™ Medium に順化する前段階では細胞が減少

していくことがわかっています。細胞数減少の対策としては、以下のことを試してください。

- 1) 継代時に播種する細胞数を 1 : 1 あるいは 1 : 2 にして様子をみてください。
- 2) それでも上手くいかない場合は、Y-27632 の添加期間を Day 0-2 まで延長してください。

補足資料

表 1. SL10 フィーダー細胞の播種量

Plate/dish	ウエルあたりの細胞数	培養表面積 (cm ²)
96 well plate	15,000	0.34
48 well plate	29,000	0.65
24 well plate	86,000	1.90
12 well plate	160,000	3.60
6 well plate	410,000	8.96
35 mm dish	420,000	9.20
60 mm dish	1,000,000	22.10
100 mm dish	2,720,000	60.10

表 2. Complete ReproNaive™ Medium の調製に必要な ReproNaive™ Supplement と LIF の添加量

ReproNaive™ Basal medium (mL)	ReproNaive™ Supplement (µL)	LIF (10 µg/mL) (µL)
1	6.8	2
2	13.6	4
3	20.4	6
4	27.2	8
5	34.0	10
6	40.8	12
7	47.6	14
8	54.4	16
9	61.2	18
10	68.0	20
11	74.8	22
12	81.6	24
24	163.2	48
36	244.8	72
48	326.4	96

ReproCELL Inc.

<https://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com