

ReproNeuro 解凍播種プロトコル

品番：RCDN001N, RCDN002N, RCDN003P

Ver1.0

実験操作の重要ポイント

- 凍結細胞バイアルは液体窒素で保管してください。
- 細胞を解凍する際は液体窒素保管容器から細胞を取り出した後、一度安全キャビネット内で蓋を 1/4 程開け、バイアル内部の圧力を解放してください。このとき、蓋は完全に開けきらないようにしてください。
- 細胞の解凍から培地への移行は 2 分以内、さらに播種までは 30 分以内に行なってください。操作に時間がかかると、生存率が著しく低下します。

day	-1	0	3	7	14
コーティング	●				
培地調製		●			
解凍・播種		●			
培地交換			●	●	●

表 1. 別途ご用意いただく試薬

名称	Catalog number	注意事項
ReproNeuro Culture Medium™ /ReproNeuro MQ Medium	ReproCELL, RCDN101 RCDN102	4℃ 保管
ReproNeuro Coat	ReproCELL, RCDN201	4℃ 保管
リン酸緩衝生理的食塩水	-	-
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies Corporation (Gibco), Cat. 15140	4℃ 保管
0.01% ポリ-L-リジン (PLL) 溶液	Sigma, Cat. P4832	4℃ 保管
平底 96 ウェルプレート	TPP(R) tissue culture plates,	-

	96-well plate, Cat. TPP92096	
DMEM/F12	SIGMA D6421	4℃ 保管

注 1. ReproNeuro はドライシッパーにて輸送されます。製品を受け取りましたら可能な限り早く、凍結細胞バイアルを液体窒素保管容器に移してください。

* ReproNeuro Culture Medium の代わりに ReproNeuro MQ medium (RCDN102) をお使い頂くことでより電位測定が安定化します。

1. 96 ウェルプレートのコーティング (細胞播種前日)

- 下記のコーティング作業の前に付属の Coating Solution を 4℃ 冷蔵庫に移し、解凍します (約 2 時間)。
- 0.01% PLL 溶液の 3 倍希釈溶液 (PBS) 5 mL を準備します。
- PBS で 3 倍希釈された PLL 溶液を 96 ウェルプレートの各ウェルに 50 μ L ずつ加えます。(96 ウェル全て)
- 96 ウェルプレートを 37℃ CO₂ インキュベーターに移し、2 時間インキュベートします。
- 新しい 15 mL チューブに 5 mL の PBS を加え、150 μ L の Coating Solution を添加します。
- 96 ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、PLL 溶液をウェルから取り除きます。
- 各ウェルに PBS を 200 μ L 加え、取り除くことを 2 回繰り返します。
- Coating solution 希釈溶液を各ウェルに 50 μ L 加え、37℃ CO₂ インキュベーターに移し、オーバーナイトでインキュベートします。

2. ReproNeuro Culture Medium の調製

- 520 μ L の Additive A を ReproNeuro Culture Medium に添加して調製します (以下 Culture Medium) 調製済みの培地は 4℃ で保管し、3 週間以内に使用ください。再凍結はおこなわないでください。
* ReproNeuro Culture Medium の代わりに ReproNeuro MQ Medium (RCDN102) をお使い頂くことでより電位測定が安定化します。

3. 培地の加温

- 3.1. 15 mL チューブに DMEM/F12 を 10 mL 分注します（チューブ A）。
- 3.2. 50 mL チューブに、Culture Medium を 15 mL 分注します（チューブ B）。
- 3.3. 37℃のウォーターバスでチューブ A と B を 15 分以上、加温します。
- 3.4. チューブ A だけを安全キャビネット内に移し、すぐに操作ができるようにキャップを緩めて準備しておきます。マイクロピペット（p-1000）を安全キャビネット内に準備し目盛りを 1000 μ L にセットします。チップを使いやすい場所にセットしておきます。

注 2. 細胞の解凍は上記の準備がすべて終わってから始めるようにしてください。解凍操作に時間が掛かると細胞の生存率や状態が悪化します。

4. 細胞の解凍

- 4.1. 凍結細胞バイアル（以下、バイアル）を運ぶための容器（以下、細胞運搬用容器）を準備し、液体窒素を適量入れておきます。
- 4.2. バイアルを液体窒素保管容器から取り出し、直ちに液体窒素の入った細胞運搬用容器に移し、安全キャビネットの近くまで持ってきます。

注 2. このときバイアルを直に手で持たないでください。バイアルを直に手で持つと凍傷の危険性があります。耐寒性のある手袋等を使用してください。

- 4.3. バイアルを安全キャビネット内に移し、蓋を 1/4 程度開け、バイアル内部の圧力を解放し、再度、蓋を閉め直します。

注 3. 蓋は完全に開けきらないでください。蓋を開け切るとコンタミネーション等の原因になることがあります。

注 4. バイアルを安全キャビネット内に入れてからバイアルの蓋を閉めるまで 1 分以内に実施してください。

- 4.4. 直ちにバイアルをウォーターバスで加温します。バイアルを円を描くように揺すりながら 90 秒間加温し、その後、ウォーターバスから取り出し、急いで安全キャビネットに移します。

注 5. ウォーターバスで加温する時間は 90 秒を厳守してください。90 秒では半分程度解凍された状態です。時間超過により細胞が完全に解凍してしまふと細胞の生存率が著しく悪化しますのでご注意ください。

- 4.5. バイアルに付着した水滴をふき取った後に、バイアル内の細胞全量を、デカンタでチューブ A に素早く移します。

注 6. ステップ 4.3 から 4.4 まで 120 秒以内におこなってください。

（ウォーターバス 90 秒、デカンタ 30 秒）

- 4.6. さらに、バイアルに付着した細胞を回収するために、チューブ A の培地 1 mL を空になったバイアルに加えて、バイアルを洗い、チューブ A に戻します。

- 4.7. チューブ A を 350 $\times g$ で 5 分間（室温）遠心します（遠心条件は厳守してください）。

- 4.8. 遠心している間にチューブ B をウォーターバスから安全キャビネットに移します。

- 4.9. 遠心が終了したらチューブ A を安全キャビネットに移します。細胞ペレットを吸引しないように培地上清をアスピレーターで注意深く取り除きます。

注 7. 細胞のペレットは目視しにくいので、吸い込まないように注意してください。

- 4.10. チューブ B から Culture Medium をチューブ A に 2 mL 移し、細胞ペレットを分散させるために目盛りを 1000 μ L にセットしたマイクロピペット（p-1000）で 3 秒に 1 回の速度でマイルドに 4 回ピペッティングします。

- 4.11. さらに、13 mL の Culture Medium を加え、 2.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を作ります。

5. 細胞播種（96 ウェルプレート）

その他のサイズのプレートを使用する際は表 2 を参照してください。

- 5.1. 細胞懸濁液をディスポーザブルピペット（10 mL）で 4 回、懸濁します。泡が出ないように、1 回 5 秒程度かけてゆっくりピペッティングします。

- 5.2. 96 ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、安全キャビネットに移します。

- 5.3. 96 ウェルプレート 1 列目（12 ウェル分）のコーティング溶液をアスピレーターで取り除きます。

- 5.4. コーティング液を取り除いた各ウェルに 30 秒以内に細胞懸濁液を 150 μ L ずつ加え、細胞を播種します。

- 5.5. 濃度勾配ができないように、チューブ A をディスポーザブルピペットで 4 回懸濁し、2 列目に移ります。以下同様です。

- 5.6. 細胞を播種した 96 ウェルプレートを 37℃ 5% CO₂ インキュベーターに移し、培養を開始します。

注 8. 細胞の解凍 Step4.1 から細胞播種 Step5.6 までを 30 分以内におこなってください。

表 2. プレートフォーマット毎の播種細胞数

プレートフォーマット	細胞播種時に必要な 培地量 (μL)	必要細胞数 (cells/well)
12 well plate	1400	2.8×10^5
24 well plate	750	1.5×10^5
48 well plate	280	5.6×10^4
96 well plate	150	3.0×10^4

6. 培地交換

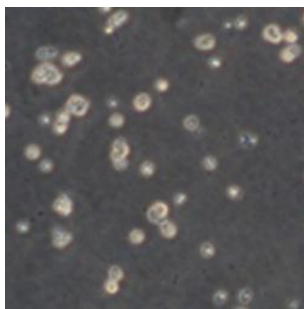
Day3、Day7、Day14 に培地交換をおこないます。培地交換は半量です。

- 6.1. 必要量の Culture medium を 15 mL チューブに分注し、予め 37℃ のウォーターバスで 15 分以上加温し、安全キャビネットに移しておきます。
- 6.2. 37℃ 5% CO₂ インキュベーターから細胞を培養しているプレートを取り出し、安全キャビネットに移します。12 連あるいは 8 連マルチチャンネルピペットを使用して培地の半量 (75 μL) を取り除きます。
- 6.3. マルチチャンネルピペットを使用して、新しい Culture medium を各ウェルに 75 μL 加えます。チップの先をウェルの壁に添わせるようにして、1 秒かけてゆっくりと培地を加えてください。培地を直接ウェルに加えると衝撃で細胞が剥がれることがあります。培地交換の時間はトータル 15 分以内におこなってください。
- 6.4. プレートを 37℃ 5% CO₂ インキュベーターに戻します。

解凍播種後の培養例

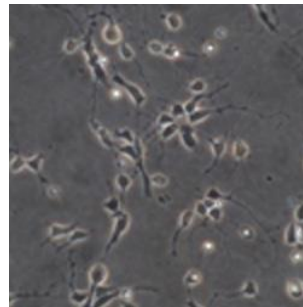
播種直後

ほとんどの細胞がシングルセルです。細胞ペレットを崩すピペッティングが弱すぎると、細胞塊が認められますが、問題なく培養可能です。

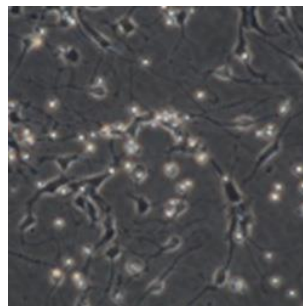


播種 24 時間後

播種方法に問題がなければ播種後 30 分程度で接着し、24 時間後には神経線維が伸長し始めます。

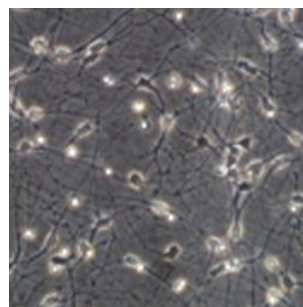


播種 7 日後



播種 14 日後

神経線維同士の間が多数認められます。アプリケーションに使用可能な状態です。



よくある質問

Q1. 解凍時間が 90 秒より長いとどうなりますか？

A1. ウォーターバス内で細胞が完全に解凍されると、生存率および生着率が著しく低下しますのでご注意ください。

Q2. ピペッティング後も細胞の凝集塊が多く認められますが、シングルセルになるまでピペッティングを繰り返したほうがいいですか？

A2. 生存率および生着率が低下するため、ピペッティングを繰り返すことはお勧め致しません。凝集塊がありましても培養が可能です。

製品の使用について

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。

株式会社リプロセル

Website: <https://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com