

ReproHepato 解凍播種取扱説明書

品番 : RCDH001N

Ver. 1.0

実験操作の重要ポイント

- 凍結細胞バイアルは 液体窒素内で保管して、なるべく早くご使用ください。
- 細胞を解凍する際に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 ほど開け、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。
- 解凍した細胞は、P1000 ピペットマンを使用しシングルセルになるように懸濁してください。
- 細胞の播種密度が低いと細胞がうまく成育しませんので、細胞濃度および播種量は厳守してください。

培養スケジュール例

	day -1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Step1 培地調製	day -1									
Step2 プレートコーティング		day 0								
Step3 細胞の解凍		day 0								
Step4 細胞の播種		day 0								
Step5 培地交換			day 1		day 3		day 5			
Step6 アッセイ									day 6-8	

別途ご準備頂く試薬

Name	Catalog number	Note
ReproHepato Culture Medium™	ReproCELL, RCDH101	Store at 4°C
ReproHepato Assay Medium™	ReproCELL, RCDH301	Store at 4°C
Penicillin Streptomycin	Life Technologies, (Gibco), Cat. 15140	Store at 4°C
Basement Membrane Matrix (Matrigel™)	BD, Cat. 356234	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	SIGMA, Cat. D5796	

CELLSTAR® 24-well Cell Culture Plate	Greiner, Cat. 662160	
L-15	Life Technologies, Cat.21083-027	
Corning PuraMatrix™	Corning, Cat. 354250	

注 1) 凍結細胞バイアルは到着後に液体窒素に入れたまま、液体窒素保管庫の近くまで持って行き、素早く保管庫に入れてください。室温に晒す時間は 2-3 秒以内と最小限にしてください。

1. 24 ウェルプレートのコーティング (Matrigel™)

- Matrigel™ を 4°C 冷蔵庫に移し一晩解凍します。
- Matrigel™、DMEM、15mL チューブを氷上で冷やします。
- 冷却した 15mL チューブに、0.42mL の Matrigel™ に対して、11.58mL の DMEM を入れ、ディスポーザブルピペット (10 mL) を用いて 2 回混合します (常時、氷上)。
- 希釈した Matrigel™ を 24 ウェルプレートの各ウェルに 250μL ずつ添加します。
- 培養に使用しないウェルには DMEM を 500μL 添加します。
- 室温で 3~4 時間インキュベートします。

コーティングに PuraMatrix™ を用いる場合

24 ウェルプレートのコーティング (PuraMatrix™)

- ボルテックスまたは超音波処理で Corning PuraMatrix™ 原液 (1% w/v) の粘度を下げます。
 - 終濃度 0.25% w/v となるように滅菌した超純水で希釈します。
 - 希釈したゲル溶液を各ウェルに添加します。(24 ウェルプレートの場合 250 μL/well)
 - 調整済みの Maintenance Medium を慎重に各ウェルに添加し、ゲル化を開始します。(24 ウェルプレートの場合 250 μL/well)
 - 1 時間の間に 2 回培地を交換します。(24 ウェルプレートの場合 250 μL/well)
- 注) ゲル化した Corning PuraMatrix™ は 37°C 5% CO2 インキュベーター内で一晩保存できます。

2. 培地調製

- ReproHepato Culture Medium、ReproHepato Culture Medium Supplement、ReproHepato Assay Medium、ReproHepato Assay Medium Supplement を 4°C 冷蔵庫に移し一晩かけて解凍します。

注 2) 解凍後に培地中に白い沈殿物が見られる場合は、37°C のウォーターバスで加温していただきますと融解いたします。培地成分に含まれるグルタミンが析出したものですので、品質や細胞の生育には問題ございません。

- 2.2. 400 μ L の ReproHepato Culture Medium Supplement を ReproHepato Culture Medium (以下 Culture medium) のボトルに添加します。
- 2.3. 300 μ L の ReproHepato Assay Medium Supplement を ReproHepato Assay Medium のボトルに添加します。(以下 Assay medium)
- 2.4. 調製済みの培地類は 4℃ で保管し、2 週間以内に使用ください。再凍結は行わないでください。

3. 培地の加温

- 3.1. 50 mL チューブに L15 Medium を 49 mL 分注します (チューブ A)。
- 3.2. 別の 15 mL チューブに Culture Medium を 12mL 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。
- 3.5. マイクロピペット (p-1000) の目盛りを 1000 μ L に合わせておき、チップを使いやすい場所にセットしておきます。

注 3) 細胞の解凍作業は上記の準備が完了してから始めてください。

4. 細胞の解凍 (解凍作業は 1 本ずつ行なってください)

- 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、容器に液体窒素を適量移します。
- 4.2. ReproHepato のバイアルを液体窒素保管容器から取り出し、直ちに細胞運搬用容器に入れ、安全キャビネットの近くまで持ってきます。
- 4.3. バイアルを安全キャビネット内に入れ、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。バイアルは直ちに細胞運搬用容器の液体窒素に入れます。

注 4) この作業は温度上昇を防ぐために 30 秒以内に終わらせてください。

注 5) コンタミネーションの予防のため、蓋は完全に開けきらないでください。

- 4.4. バイアルを細胞運搬用容器ごとウォーターバスの近くまで持ってきます。
- 4.5. バイアルを液体窒素から取り出し、直ちにウォーターバスに入れます。バイアルを円を描くように揺すりながら **90 秒間**加温し、ウォーターバスから取り出し、直ちに安全キャビネットに移します。

注 6) 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う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。

- 4.6. バイアルを安全キャビネット内に移動させ、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。
- 4.7. 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 を空のバイアルに加えて、バイアルを洗い、チューブ A に戻します。

注 7) 解凍開始からここまでを、必ず 2 分以内に行なってください (ウォーターバス 90 秒 + 移し替え 30 秒以内)。

- 4.8. 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)。
- 4.9. 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。
- 4.10. 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。
- 4.11. チューブ A の培地上清をアスピレーターで注意深く取り除きます。

細胞のペレットを吸い込まないように十分注意してください。培地は完全に除去してください。

- 4.12. チューブ B から Culture Medium をチューブ A に 1 mL 移し、細胞ペレットを単一細胞に分散させるためにマイクロピペット (p-1000) で 5 回ピettingsします。この際、マイクロピペットの先端をチューブの底に押し付けるなどした場合、細胞の生存率が低下する恐れがあります。チューブの壁面に 1 mL の懸濁液を吹き付ける様にして、細胞を分散させてください。

注 8) 単一細胞に分散させるために、経口の大きい 5 mL または 10 mL のディスポーザブルピペットではなく、マイクロピペットを使用してください。

- 4.13. さらに、チューブ B から Culture Medium をチューブ A に 10.0 mL を添加して希釈し、ディスポーザブルピペット (10 mL) を用いて吸い出しを各 1 秒程度かけて 3 回ピettingsすることで攪拌します。

注 9) 細胞の解凍から播種までの時間を最小化するために、敢えてセルカウントはしていません。

5. 細胞播種

- 5.1. 操作 1. で準備した 24 ウェルプレートに安全キャビネットに移します。
- 5.2. 24 ウェルプレート 1 列目 (6 ウェル分) のコーティング溶液を取り除きます。
- 5.3. コーティング液を取り除いた各ウェルに 15 秒以内に細胞懸濁液を 640 μ L ずつ加え、細胞を播種します。(その他のサイズのプレートを使用する際は下記表を参照)
- 5.4. 濃度勾配ができないように、再度、細胞懸濁液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。3 列目から 4 列目まで同様の手順で細胞を播種します。
- 5.5. 細胞を播種した 24 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 10) 細胞の解凍から播種までを 30 分以内に完了してください。時間がかかると生存率が著しく低下します。

プレート	ウェル底面積 (cm ² /well)	細胞播種時の培地量 (μ L)	培地交換時の培地量 (μ L)
12 well	3.8	1200	1000
24 well	2	640	500
48 well	0.75	240	150
96 well	0.32	100	100

6. 培地交換

- 6.1. Day1, 3, 5 に培地交換します。
 - 6.2. Culture medium は必要量を 15 mL チューブに分注し予め 15 分以上 37℃ のウォーターバスで加温し、安全キャビネットに移しておきます。
 - 6.3. 24 ウェルプレートから古い培地を取り除き、新しい培地 500 μ L を各ウェルに加えます。この時、チップの先をウェルの壁に添わせるようにして、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。
 - 6.4. 24 ウェルプレートを 37℃ 5% CO₂ インキュベーターに戻します。
- 注 11) 培地交換の時間は 10 分以内で行ってください。

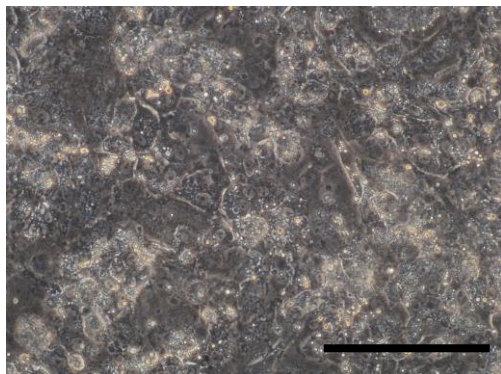
7. アッセイ

- 7.1. Day6 からアッセイに使用できます。
- 7.2. 代謝試験を測定される場合は day6 の細胞をご使用ください。誘

導試験をされる場合は day6 より薬物の暴露を開始してください。
何れの場合も、手順 2 に従って調整した Assay Medium をご使用ください。

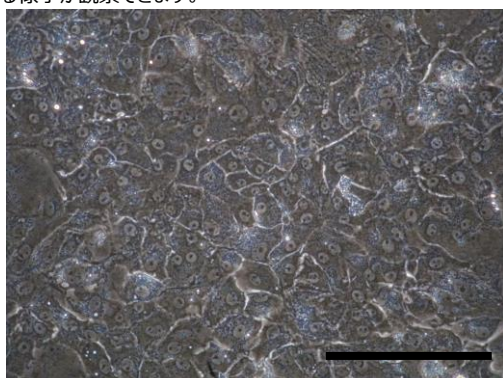
解凍播種後の代表的な画像

1. 解凍播種の翌日(day1)に、ウェルの 8 割以上を接着した細胞で占められている様子が観察できます。



Day 1
Scale bar : 200μm

2. 解凍播種 8 日後(day8)に、細胞が敷石状に形態変化している様子が観察できます。



Day 8
Scale bar : 200μm

よくある質問

- Q1. 解凍時間が 90 秒より短いどうなりますか？
A1. バイアルの内容物が十分に溶解していないため、マイクロピペット (p-1000) でチューブ A に移すことが困難となります。
- Q2. 逆に解凍時間が 90 秒より長いどうなりますか？
A2. 生存率および生着率が著しく低下し、その後、細胞が生育しません。
- Q3. 解凍した細胞を L15 medium に入れる操作を 30 秒以内で行うにはどうすればいいですか？
A3. 操作 4.1. から 4.8. までの準備が整っていることを確認した後に、できる限り恒温槽から近い位置で解凍播種操作を行ってください。
- Q4. 解凍した細胞がシングルに分散しているか、どうやって確認すればいいですか？
A4. 目視で凝集体が浮遊していなければ結構です。
- Q5. シングルセルに分散する場合にピペッティングを繰り返して行ってよいですか？
A5. マイクロピペット (p-1000) で 5 回のピペッティングを限度としてください。6 回以上の過度なピペッティングにより、生存率が低下いたします。
- Q6. セルカウントをしなくても大丈夫ですか？
A6. バイアル内の細胞数は一定なので、所定の培地量を添加することで、適切な細胞濃度が得られます。播種までの時間が長くなると生存率が低下しますので、本マニュアルでセルカウントは行なってありません。
- Q7. 写真のように細胞がうまく成育しませんが？
A7. 実験操作の重要ポイントをご確認の上、下記アドレスまでお問い合わせください。
- Q8. コーティングは Matrigel™ と PuraMatrix™ のどちらが推奨されますか？
A8. お客様の用途によりませんが、PuraMatrix™ を用いますと ReproHepato Type I™ をスフェロイド状に三次元培養をすることができます。

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: <http://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com