

## 取扱説明書

# ReproMed™ iPSC Medium

Cat. No. RCRM101

Version 1.1

### 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、**ReproMed™ iPSC Medium** (bFGF 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。

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

- ・フィーダー細胞は不要です。
- ・弊社樹立株の iPS 細胞 (PChiPS771 株) 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% CO<sub>2</sub> インキュベーターを必要としますので、ご準備ください。
- ・ bFGF (10 ng/mL) を加えてください。以下、この培地を **ReproMed™ iPSC Medium** とします。
- ・ ご使用時には ReproMed™ iPSC Medium を室温に戻してください。その際、恒温槽などは使用しないでください。
- ・ このマニュアルでは 10 ng/mL の bFGF 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。
- ・ 移行直後は細胞が多く浮いている様子が観察されますが、継代を重ねると落ち着いてきますので、問題なく培養していただけます。
- ・ 培養可能なコーティング剤と剥離剤については下記を参考してください。  
剥離剤 : EDTA+ TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red  
コーティング剤 : iMatrix-511

### 目次

- ・ 本製品及び必要試薬と装置
- ・ ReproMed™ iPSC Medium の培養プロトコル
  - 1. ディッシュのコーティング方法
  - 2. オンフィーダー培養から ReproMed™ iPSC Medium を用いたフィーダーフリー培養への移行方法
  - 3. ReproMed™ iPSC Medium を用いた細胞の継代方法
  - 4. ReproMed™ iPSC Medium を用いたフィーダーフリー培養のヒト iPS 細胞の形態
- ・ よくある質問

## 本製品

製品	Cat. No.	容量	保管方法
ReproMed™ iPSC Medium	RCRM101	500 mL	-20°C

## 必要試薬と装置

製品	Cat. No.	容量	保管方法
bFGF	REPROCELL RCHEOT002	25 µg	-80°C
iMatrix-511	REPROCELL NP892-011	350 µg	4°C
TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red	GIBCO Cat. 12563011	100 mL	室温
UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0	Invitrogen 15575020	100 mL	室温
Y27632	Wako 257-00511	-	-
PBS (-), Ca <sup>2+</sup> - and Mg <sup>2+</sup> -Free	-	-	-
60 mm Tissue Culture Dish	-	-	-
5% CO <sub>2</sub> インキュベ ーター	-	-	-
その他培養操作に通 常必要なもの	-	-	-

## ReproMed™ iPSC Medium を用いた 培養プロトコル

### 1. ディッシュのコーティング方法

<コーティング (60 mm ディッシュ(底面積 22 cm<sup>2</sup>の場合) 4 枚分) >

- iMatrix-511 を氷上に移します。
- 15 mL チューブに PBS (-) を 8 mL 加え、氷上で冷やします。
- 準備した PBS (-) 8 mL に 88 µL の iMatrix-511 を冷やしながら懸濁し、92 倍希釈液を作ります。(コート量: 0.5 µg/cm<sup>2</sup> となるように希釈液を作ります。)
- 60 mm ディッシュに 2 mL ずつ加え、全体に行き渡らせません。
- 37°C、CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で 1 時間静置します。すぐに使用しない場合はパラフィルムでシールし、4°C で保存できます。(1 週間を目安にご使用下さい。)

### 2. オンフィーダー培養から ReproMed™ iPSC Medium を用いたフィーダーフリー培養への移行方法 (100 mm ディッシュのオンフィーダー培養から、60 mm ディッシュのフィーダーフリー培養の場合)

**注 1** : 以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。

**注 2** : 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)

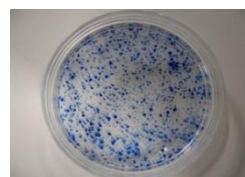


図 1  
移行前のコロニーの密度のディッシュを Alkaline Phosphatase (ALP) 染色したものの。

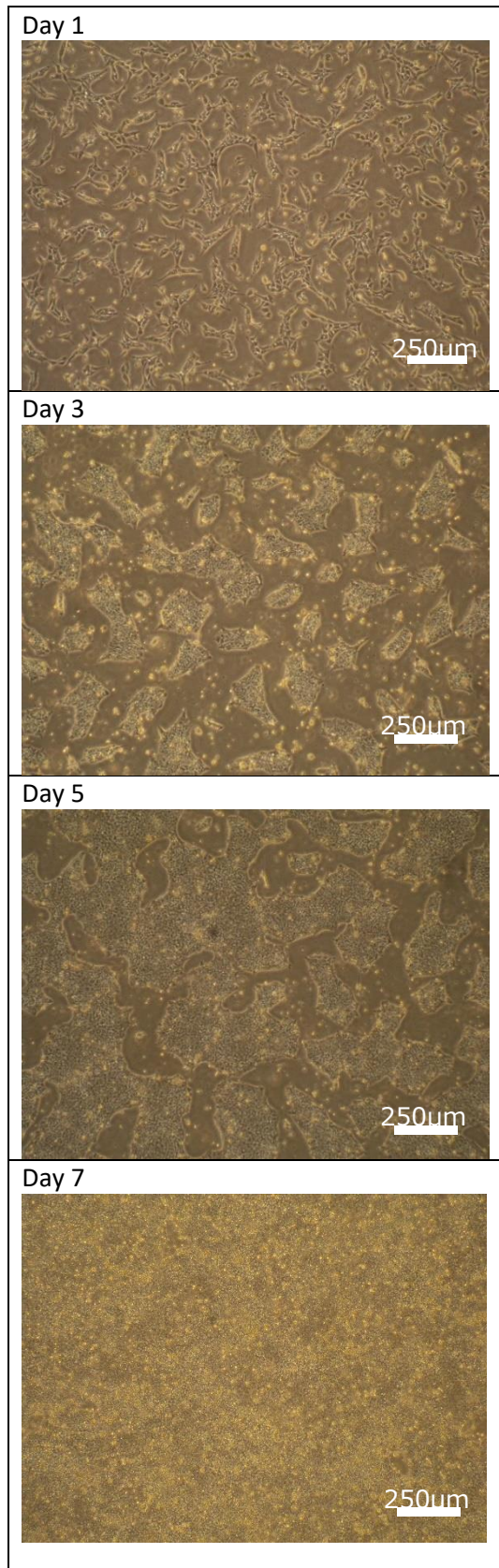
- オンフィーダーで培養されたヒト iPS 細胞の培地を除去してください。
- 4 mL の PBS (-) を加えて洗浄し、PBS (-) を除去してください。
- Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液を 1.5 mL/dish 加え、よくなじませてください。
- インキュベーター内で 4 分間 反応させてください。
- Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液を除去してください。
- PBS (-) 2 mL を加えて洗浄し、PBS を除去してください。
- 0.5X TrypLE Select (TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red と 0.5 mM EDTA/PBS を等量混合) を 1.5 mL/dish 加え、Plate を揺すって 0.5X TrypLE Select をウェル 全体に行き渡らせてください。
- 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 7 分間 反応させてください。
- インキュベーターから取り出して、0.5X TrypLE Select を用いて、P-1000 で 10 回ピペッティングを行い、細胞を剥がしてください。
- 新しい 15 mL チューブに回収してください。
- 2 mL/dish の ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 µM Y27632) を添加し、残りの細胞を回収してください。
- 注 3** : 剥離時の培地に Y27632 を加えた方が、生存率の向上とその後の培養が安定します。
- 300×g, 5 分遠心し、上清を除去してください。

13. 2 mL の ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 μM Y27632) を加えてよく懸濁し、生細胞数をカウントしてください。
14. 推奨播種数(※)の生細胞を新しい 15 mL チューブに採取し、4 mL まで ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 μM Y27632) でメスアップし、iMatrix-511 コーティングした 60 mm ディッシュに播種してください。  
(※)推奨播種細胞数  
オンフィーダーから移行後 3 継代は  $1 \times 10^6$  cells/dish で播種してください。  
移行後 3 継代後は、株により下記の培養条件の最適化を行ってください。  
(1)比較的増殖が緩やかな株の場合  
 $5 \times 10^5$  cells/dish  
(2)比較的よく増殖し、未分化維持能の高い株の場合  
 $2 \times 10^5$  cells/dish
15. 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養してください。
16. Day 1 からは 4 mL/dish の ReproMed™ iPSC Medium(Y27632 非含有)を使用して、毎日培地交換をしてください。  
**注 4**：培養条件(1)の場合は Day 1 の培地交換を Y27632 非含有培地で播種 24 時間後に行ってください。培養条件(2)の場合は、Day 1 の培地交換を Y27632 含有培地で行い、Day 2 の培地交換を Y27632 非含有培地で播種 48 時間後に行ってください。(Y27632 を正確な時間で作用させると培養が安定します。)  
**注 5**：80~90%程度コンフルになったら継代してください。(播種日を Day 0 として Day 7 が目安です。)  
**注 6**：移行直後は細胞が多く浮いている様子が観察されますが、継代を重ねると落ち着いてきますので、問題なく培養していただけます。

### 3. ReproMed™ iPSC Medium を用いた細胞の継代方法

- 注 7**：以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。  
**注 8**：フィーダーフリーからの継代はオンフィーダーからの移行と操作が異なる点がございますのでご注意ください。
1. ReproMed™ iPSC Medium で培養されたヒト iPS 細胞の培地を除去してください。
  2. 2 mL の PBS (-) を加えて洗浄し、PBS (-) を除去してください。これを 2 回行ってください。
  3. 0.5 mM EDTA/PBS を入れ、2 分間揺らして反応させ、除去してください。
  4. 0.5X TrypLE Select を 1 mL/dish 加え、プレートを揺すって 0.5X TrypLE Select をウェル全体に行き渡らせてください。
  5. 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 7 分間反応させてください。
  6. インキュベーターから取り出して、0.5X TrypLE Select を用いて、P-1000 で 9 割程度剥がれるまでピペティングを行い、細胞を剥がしてシングルセルにしてください。
  7. シングルセルを新しい 15 mL チューブに回収してください。
  8. 1 mL/dish の ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 μM Y27632) を添加し、残りの細胞を回収してください。  
**注 9**：剥離時の培地に Y27632 を加えた方が、生存率の向上とその後の培養が安定します。
  9. 300×g, 5 分遠心し、上清を除去してください。
  10. 2 mL の ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 μM Y27632) を加えてよく懸濁し、生細胞数をカウントしてください。
  11. 推奨播種数(※)の生細胞を新しい 15 mL チューブに採取し、4 mL まで ReproMed™ iPSC Medium (+終濃度 10 μM Y27632) でメスアップし、iMatrix-511 コーティングした 60 mm ディッシュに播種してください。  
(※)推奨播種細胞数  
オンフィーダーから移行後 3 継代は  $1 \times 10^6$  cells/dish で播種してください。  
移行後 3 継代後は、株により下記の培養条件の最適化を行ってください。  
(1)比較的増殖が緩やかな株の場合  
 $5 \times 10^5$  cells/dish  
(2)比較的よく増殖し、未分化維持能の高い株の場合  
 $2 \times 10^5$  cells/dish
  12. 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養してください。
  13. Day 1 からは 4 mL/dish の ReproMed™ iPSC Medium(Y27632 非含有)を使用して、毎日培地交換をしてください。  
**注 10**：培養条件(1)の場合は Day 1 の培地交換を Y27632 非含有培地で播種 24 時間後に行ってください。培養条件(2)の場合は、Day 1 の培地交換を Y27632 含有培地で行い、Day 2 の培地交換を Y27632 非含有培地で播種 48 時間後に行ってください。(Y27632 を正確な時間で作用させると培養が安定します。)  
**注 11**：80~90%程度コンフルになったら継代してください。(播種日を Day 0 として Day 7 が目安です。)

4. ReproMed™ iPSC Medium を用いたフィーダーフリー培養のヒト iPS 細胞の形態(253G1 株使用、条件(1)の播種密度で播種時)



## よくある質問

**Q1.他のフィーダーフリー用培地から切り替える際はどのように切り替えたら良いでしょうか。**

A1. 継代時に他の培地から ReproMed™ iPSC Medium に切り替えてください。剥離時は、前の培地の方法で剥離し、遠心して回収後に ReproMed で懸濁し、推奨播種濃度で播種してください。

REPROCELL Inc.  
<https://reprocell.co.jp/>  
E-mail: [info\\_jp@reprocell.com](mailto:info_jp@reprocell.com)