

フィーダー細胞 (MEF) 解凍/播種プロトコル

品番 : RCHEFC003

Version 1.0

製品内容

- ・ 3.0×10^6 cells × 5 vials

保存方法

本製品はドライアイスに梱包された状態で輸送されます。到着後すみやかに液体窒素下に移してください。ディープフリーザー (-80℃) で保存した場合には劣化の恐れがございます。

特長

- ・ マウス胎仔線維芽細胞の初代培養細胞です。
- ・ ヒト ES/iPS 細胞、マウス ES 細胞のフィーダー細胞としてお使いいただけます。
- ・ マイトマイシン C 処理済みですので、解凍後すぐにフィーダー細胞として使用できます。
- ・ ヒト iPS 細胞株 (Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007) でロット試験済みです。

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ください。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。

使用方法

製品内に含まれない必要試薬

- ・ DMEM-high glucose [Sigma, Cat.D5796]
- ・ Fetal bovine serum (FBS) [GIBCO, Cat.10437]
- ・ ReproCoat [ReproCELL, Cat.RCHEOT001]

1. ディッシュ/プレートのコーティング (細胞播種前日)

- 1.1. 細胞培養用ディッシュあるいはプレートに ReproCoat を適量加え (表 1 参照)、37℃ CO₂ インキュベーターで 8 時間以上インキュベートします。

表 1 ディッシュ/プレートと必要な ReproCoat 量

ディッシュ/プレートのサイズ	ReproCoat の分量
24-well	0.3 mL
12-well	0.5 mL
6-well/35 mm	1 mL
60 mm	3 mL
100 mm	5 mL

2. 培地の調製

- 2.1. DMEM に FBS を 10% 濃度となるように添加します (MEF 培地)。

3. 細胞の解凍

- 3.1. 手順 2. で調製した MEF 培地を 50 mL チューブに 9 mL 分注し、37℃ に加温し (チューブ A)、安全キャビネット内に移します。
- 3.2. 同様にもう一本の 50 mL チューブに MEF 培地を 40 mL 分注し、37℃ に加温し (チューブ B)、安全キャビネット内に移します。
- 3.3. ドライアイスペレットを入れたアイスボックスを準備します。
- 3.4. 凍結細胞バイアル 1 本 (以下、バイアル) を液体窒素タンクから取り出し、直ちにドライアイスペレットの内部に埋め込み、vial のふたを少し緩めて内部の液体窒素を抜き、再度ふたを閉めます。その後ウォーターバスの近くまで持ってきます。
- 3.5. バイアルをドライアイスペレットから取り出し、直ちにウォーターバスで加温します。90 秒間加温後、半解の状態ウォーターバスから取り出して急いで安全キャビネットに移します。
- 3.6. 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手順 3.1 で用意したチューブ A に半解の状態デカントで移します。
- 3.7. バイアルに付着した細胞を回収するため、チューブ A の培地 1 mL を空になったバイアルに加えて洗い、チューブ A に戻します。
- 3.8. チューブ A を $170 \times g$ で 5 分間 (室温) 遠心します (遠心条件は厳守してください)。
- 3.9. 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。
- 3.10. チューブ B から 1 mL の MEF 培地をチューブ A に加えて数回ピペティングし、ペレットを崩します。その後 9 mL の培地を足して 10 mL に懸濁させます。

3.11. 細胞数をカウントします。カウント後は 1.5×10^5 cells/mL となるように MEF 培地をチューブ B からチューブ A へ移し、懸濁液量を調整します。チューブ B に余った MEF 培地は次回に利用してください。

3.12. 手順 1 でコーティングしたディッシュ/プレートから ReproCoat を除き、培養器のサイズに合わせて細胞懸濁液を加えます（表 2 参照）。

注 2. ご使用の細胞株によって、適切な細胞密度が異なる場合がございます。

3.13. 37°C、5%CO₂ インキュベーターに MEF を播種したディッシュ/プレートを入れ、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、一晚培養します。

3.14. 翌日からフィーダー細胞として使用できます。すぐに使用しない場合は、37°C、5%CO₂ インキュベーターで静置し、4 日以内に使用して下さい。

注 3. 播種後 5 日以上経過したフィーダー細胞は、ヒト ES/iPS 細胞の未分化能を十分に維持できない場合がありますので、使用しないでください。

表 2 ディッシュ/プレートとフィーダー細胞懸濁液量
(懸濁液： 1.5×10^5 cells/mL の場合)

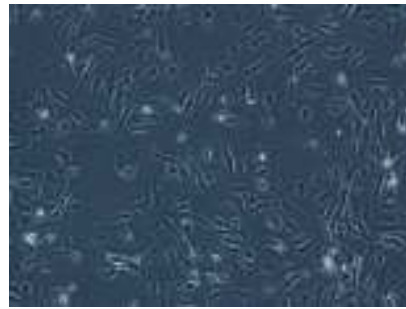
ディッシュ/プレートのサイズ	細胞懸濁液の分量
24-well	0.3 mL
12-well	0.6 mL
6-well/35 mm	1.6 mL
60 mm	4 mL
100 mm	11 mL

4. 播種翌日の 培養例

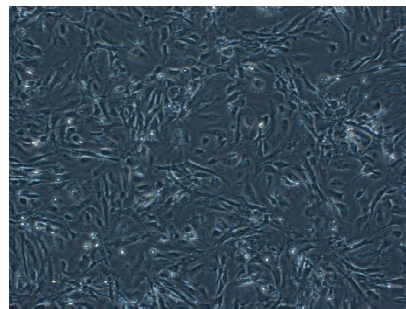
播種密度が薄すぎる例



適切な細胞密度で播種できた例



播種密度が濃すぎる例



注 4. 上記播種密度は、ヒト iPS 細胞株 201B7 を培養する場合の例になります。ご使用の細胞株によって適切な細胞密度が異なる場合がございますのでご注意ください。

関連製品

RCHEMD001	Primate ES Cell Medium
RCHEMD005	ReproStem
RCHETP002	Dissociation Solution for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat
RCHEOT002	FGF-2 (25 ug)
RCHEOT003	FGF-2 (250 ug)
RCHEFC001	Feeder Cells (SL10)

株式会社リプロセル

<http://www.reprocell.com>

E-mail: info_jp@reprocell.com