

## 取扱説明書

### StemFit® AK02N

Cat. No. RCAK02N

Version 1.1

#### 概要

この取扱説明書は、StemFit® AK02N を用いてヒト iPS 細胞をオンフィーダー培養から移行し、維持・継代する方法について説明しています。StemFit® AK02N の A 液、B 液、C 液を混合した培地を Complete StemFit® AK02N とします。

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 A 液、B 液、C 液から構成されます。A 液は冷蔵状態で、B と C 液は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに、A 液は 4℃、B と C 液は -20℃ で保存して下さい。使用前に解凍し、Complete StemFit® AK02N は 4℃ で保存し、2 週間を目安に使い切して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃ で保存して下さい。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。

- ・ StemFit® AK02N の B 液と C 液は、4℃ で溶かしてください。37℃ での加温は行わないでください。
- ・ StemFit® AK02N の各溶液の使用期限は、A 液が 4℃ 保管、B 液と C 液は -20℃ で保管した場合にボトルに記載された有効期限内となります。
- ・ Complete StemFit® AK02N の使用期限は、4℃ 保管で 2 週間となります。
- ・ Complete StemFit® AK02N は室温に戻してから使用してください。37℃ での加温は行わないでください。

#### 目次

- ・ 本製品及び必要試薬と装置
- ・ StemFit® AK02N を用いた培養プロトコル
  - 培養試薬の準備
  - オンフィーダー培養から Complete StemFit® AK02N 培養への移行方法
  - Complete StemFit® AK02N を用いた細胞の継代方法
  - Complete StemFit® AK02N を用いたヒト 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
StemFit® AK02N A 液	RCAK02N	400 mL	4 °C
StemFit® AK02N B 液		100 mL	-20 °C
StemFit® AK02N C 液		2 mL	-20 °C

## 必要試薬と装置

製品	Cat. No.	容量	保管方法
iMatrix-511 (Laminin-511 E8)	Nippi 892001/892002	175 µg	4 °C
Dissociation Solution for human ES/iPS Cells	ReproCELL RCHETP002	30 mL	4 °C
CTS™ TrypLE™ Select Enzyme	LifeTechnologies A12859-01	100 mL	4 °C
UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0	LifeTechnologies 15575-020	100 mL	室温
Y27632	Wako 257-00511	2 mg	4 °C
PBS (-), Ca <sup>2+</sup> - and Mg <sup>2+</sup> -Free	-	-	-
6 well Tissue Culture plate	-	-	-
その他培養操作に通常必要なもの	-	-	-

## StemFit® AK02N を用いた培養プロトコル

### 培養試薬の準備

#### Complete StemFit® AK02N の調製

1. B 液と C 液を 4°C で解凍してください。
2. C 液を P-1000 ピペットで 3 回ピペッティング後に B 液へ添加してください。
3. C 液を添加した B 液を 10 mL のオートピペッターで混合後、A 液へ添加し、十分混合してください。  
(オプション) 混合後の Complete StemFit® AK02N は分注し凍結保存 (-20°C 以下、望ましくは -80°C) することが可能です。

#### Y27632 ストック溶液 (10 mM, PBS (-)) の調製

1. Y27632 (1 mg) を室温に戻してください。
2. 312.2 µL の PBS (-) を Y27632 (1 mg) へ添加してください。
3. 完全に溶解するために Vortex してください。必要な場合は 37°C で温めてください。
4. 少量のストック溶液として必要量を分注して、-20°C で保管してください。

#### 0.5×TrypLE Select 溶液の調製

1. 10 mL の PBS (-) に 10 µL の 0.5 M EDTA 溶液を添加してください。この溶液を 0.5 mM EDTA/PBS (-) 溶液とします。
2. 10 mL の 1×TrypLE Select に 10 mL の 0.5 mM EDTA/PBS (-) を添加してください。この溶液を 0.5×TrypLE Select 溶液とします。
3. 必要量を分注して、4°C で保管してください。

#### プレートのコーティングの準備

1. 6-well プレートに PBS (-) を 1.5 mL/well 入れてください。
2. iMatrix-511 (コート量 : 0.5 µg/cm<sup>2</sup>) を 4.8 µg/well 加えて、プレートを揺すりながら、すぐによく混ぜてください。
3. 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 60 min 以上静置してください。
4. 必要量の Complete StemFit® AK02N を分注して、最終濃度が 10 µM になるように Y-27632 を添加してください。
5. 60 min 後インキュベーターから取り出してください。
6. 上清を除去してください。
7. Complete StemFit® AK02N (Y-27632 入り、最終濃度 10 µM) を 1.5 mL/well 加えてください。
8. 使用直前まで、インキュベーターに入れてください。

## オンフィーダー培養から Complete StemFit® AK02N 培養への移行方法

- 注 1 :** 以下の試薬用量は、6 well plate の場合です。  
(他の培養スケールの場合は補足資料を参考にしてください。)
- 注 2 :** 移行のタイミングは、ヒト iPS 細胞を通常の継代を行うタイミングで移行してください。

### Complete StemFit® AK02N への移行 (Day 0)

1. 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。
2. 2 mL の PBS (-) を加えて洗浄し、PBS (-) を除去してください。
3. Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液を 800  $\mu$ L/well ずつ加えよくなじませてください。
4. インキュベーター内で 4 分間 反応させてください
5. Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液を除去してください。
6. PBS (-) 1 mL を加えて洗浄し、PBS を除去してください。
7. 0.5X TrypLE Select を 800  $\mu$ L/well ずつ加え、Plate を揺すって 0.5X TrypLE Select を well 全体に行き渡らせてください。
8. 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。
9. インキュベーターから取り出して、0.5X TrypLE Select を除去してください。  
**注 3 :** この時点で細胞が剥がれた場合は Step11 に進んでください。
10. 2 mL/well の PBS (-) で洗浄し、PBS (-) を除去してください。  
**注 4 :** 細胞が剥がれやすいので静かに加えてください。
11. 1 mL/well の **Complete StemFit® AK02N** (Y27632 入り、最終濃度 10  $\mu$ M) を添加してください。  
**注 5 :** 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。  
**注 6 :** 培地添加後は、1 分以内に剥がし始めてください。
12. P-1000 ピペッティングで 10 回ピペッティングを行い、細胞を剥がしてください。
13. 新しいチューブに回収してください。
14. 細胞カウントを行って生細胞数をカウントしてください。30,000 個/well の生細胞をコーティングした 6-well プレートに播種してください。
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。  
**注 7 :** オンフィーダーから以降後、継代 3 回までは播種細胞数を 30,000 個/well (6 well plate) で行った方が、培養が安定します。

### Complete StemFit® AK02N の培地交換 (Day 1, 4, 5, 6)

1. Day 1, 4, 5, 6 からは 2 mL/well の Complete StemFit® AK02N を使用して、毎日培地交換をしてください。  
**注 8 :** Day 2、3 は培地交換しないで、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養してください。

## Complete StemFit® AK02N を用いた細胞の継代

- 注 9 :** 以下の試薬用量は、6 well plate の場合です。  
(他の培養スケールの場合は補足資料を参考にしてください。)
- 注 10 :** 継代のタイミングは、Day 7 となります。

### Complete StemFit® AK02N で培養された細胞の継代 (Day 0)

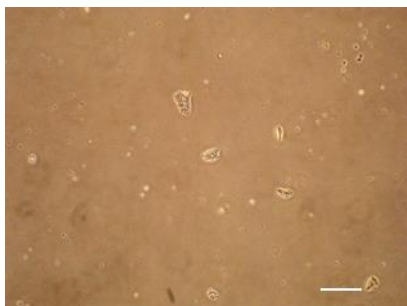
1. **Complete StemFit® AK02N** で培養しているヒト iPS 細胞のプレートから培地を除いてください。
2. 2 mL の PBS (-) を加えて洗浄し、PBS (-) を除去してください。
3. 0.5X TrypLE Select を 800  $\mu$ L/well ずつ加え、Plate を揺すって 0.5X TrypLE Select を well 全体に行き渡らせてください。
4. 37°C、CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 7 分間反応させてください。
5. インキュベーターから取り出して、0.5X TrypLE Select を除去してください。
6. 2 mL/well の PBS (-) で洗浄し、PBS (-) を除去してください。  
**注 11 :** 細胞が剥がれやすいので静かに加えてください。
7. 1 mL/well の **Complete StemFit® AK02N** (Y27632 入り、最終濃度 10  $\mu$ M) を添加してください。  
**注 12 :** 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。  
**注 13 :** 培地添加後は、1 分以内に剥がし始めてください。
8. P-1000 ピペッティングで 10 回ピペッティングを行い、細胞を剥がしてください。
9. 新しいチューブに回収してください。
10. 細胞カウントを行って生細胞数をカウントしてください。
11. 13,000 個/well の生細胞をコーティングした 6-well プレートに播種してください。  
**注 14 :** オンフィーダーから以降後、継代 3 回までは播種細胞数を 30,000 個/well (6 well plate) で行った方が、培養が安定します。  
37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養してください。

### Complete StemFit® AK02N の培地交換 (Day 1, 4, 5, 6)

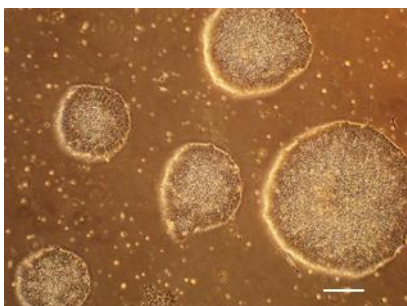
1. Day 1, 4, 5, 6 で 2 mL/well の Complete StemFit® AK02N を使用して、毎日培地交換をしてください。  
**注 15 :** Day 2、3 は培地交換しないで、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養してください。  
**注 16 :** Day 7 になりましたら継代してください。(播種した日を Day 0 とします。)

## Complete StemFit® AK02N を用いた ヒト iPS 細胞の形態

Day 3



Day 7



各画像のスケールバーは 200 μm を示します。

## 補足資料

### 1. Laminin 511E8 コーティング量

サイズ	12 well plate	6 well plate	60 mm dish	100 mm dish
cm <sup>2</sup>	3.8	9.6	21.3	59
μg	1.9	4.8	10.6	29.5

(推奨コーティング濃度：0.5 μg/cm<sup>2</sup>)

### 2. 0.5×TrypLE Select 量

サイズ	12 well plate	6 well plate	60 mm dish	100 mm dish
μL	400	800	1,000	2,000

### 3. ヒト iPS 細胞の播種細胞数

サイズ	12 well plate	6 well plate	60 mm dish	100 mm dish
cells	5,200	13,000	29,000	80,000

### 4. 培地量

サイズ	12 well plate	6 well plate	60 mm dish	100 mm dish
mL	0.8	2	4	10

## よくある質問

**Q1. Complete StemFit® AK02N を調製後に分注して凍結しても大丈夫ですか？**

A1. 調整後の再凍結は一度であれば可能です。

**Q2. オンフィーダーからの移行時にフィーダー細胞が混じっていますが大丈夫ですか？**

A2. マイトマイシン C 処理されたフィーダー細胞であれば、数継代すると除かれるため、移行時のフィーダー細胞の混入は特に影響ありません。

**Q3. コーティングは Laminin511E8 以外のものも使用できますか？**

A3. Matrigel や Vitronectin も使用可能です。

**Q4. iPS 細胞の凍結・解凍方法をおしえてください。**

A4. iPS 細胞の凍結・解凍方法につきましては、弊社 HP よりプロトコルをダウンロードしてください。

ReproCELL Inc.

<https://www.reprocell.com>

E-mail: [info\\_jp@reprocell.com](mailto:info_jp@reprocell.com)