

mTeSR™ Plus <簡易マニュアル>
ヒト ES/iPS 細胞の継代 (6-well プレートから 6-well プレートへ)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

【対象製品】

| コード No. | 品名 | 梱包単位 | 保存温度 | 輸送温度 |
|-------------|------------------|-------|-------|-------|
| ST-100-0276 | mTeSR™ Plus-cGMP | 1 Kit | 冷蔵/冷凍 | 冷蔵/冷凍 |

【準備するもの】

細胞

- 至適なコンフルエントに達した、ヒト ES/iPS 細胞

試薬

- Matrigel (Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix、#354277)、Vitronectin XF (ST-07180) または Human recombinant Laminin 521 (BLA-LN521-02)
- ReLeSR (ST-05872 または ST-100-0484)
- D-PBS (Without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) (ST-37350)
- D-PBS (With Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺)
- mTeSR Plus (ST-100-0276)
- DMEM/F-12 with 15mM HEPES (ST-36254)

物品

- 培養容器： Non-tissue culture-treated 6-well plates* (例えば、ST-27147 または Corning 社 #3736 や #351146)、Tissue culture-treated cultureware** (例えば、ST-38016 (6-well plates))
- 15/50 mL コニカルチューブ (例えば、ST-38009/ST-38010)
- ピペット
 - * Vitronectin XF をご使用の場合にあわせてご使用ください。
 - ** Matrigel または Laminin 521 をご使用の場合にあわせてご使用ください。

【手順】

1. 培地の準備

mTeSR Plus 5X Supplement を、室温 (15 - 25°C) または 2 - 8°C で一晩解凍する。室温まで温め、十分に混ぜる。

100 mL の mTeSR Plus 5X Supplement を、400 mL の mTeSR Plus Basal Medium に添加し、十分に混ぜる。

2. 培養容器のコーティング

継代の少なくとも 1 時間前に、新しい培養容器を Matrigel® または Vitronectin XF でコーティングする。あるいは、少なくとも一晩 (または 2 時間) 前に Laminin 521 でコーティングする。

表 1. 容器ごとの推奨コーティング量

| 培養容器 | マトリックス希釈液の容量 |
|---------------------------|--------------|
| 6-well プレート | 1 mL/well |
| 100 mm ディッシュ | 6 mL/dish |
| T-25 cm ² フラスコ | 3 mL/flask |
| T-75 cm ² フラスコ | 8 mL/flask |

2.1 Matrigel コーティング手順

注： **組織培養処理済み (tissue culture-treated)** の培養容器をご使用ください。

1. 1 回分の Matrigel® を氷上で解凍する。
2. 25 mL の冷 DMEM/F-12 with 15 mM HEPES を、50 mL コニカルチューブに分注し氷上に静置する。
3. 融解した Matrigel® を冷 DMEM/F-12 (50 mL チューブ内) に加えてよく混ぜる。必要なら、バイアルを冷培地で洗浄してもよい。
4. 直ちに、希釈した Matrigel® 溶液で組織培養処理済み培養容器をコートする (推奨コーティング量は表 1 を参照)。
5. 培養容器を回転させて、Matrigel® 溶液を表面全体に均一に広げる。
注： 培養容器の表面全体が Matrigel® 溶液でコートされていない場合、ヒト ES/iPS 細胞培養に使用しないでください。
6. 使用前に少なくとも 1 時間室温 (15 - 25°C) でインキュベートする。Matrigel® 溶液を蒸発させない。
注： すぐに使用しない場合、必ず培養容器を密封し (Parafilm® などを使用)、Matrigel® 溶液の蒸発を防いでください。コーティング後に 2 - 8°C で最大 1 週間保存できます。使用する 30 分前に室温 (15 - 25°C) に取り出しておき、7. に進んでください。
7. 培養容器を片側に静かに傾け、余分な Matrigel® 溶液を端に集める。血清用ピペットまたは吸引により、余分な溶液を取り除く。コート面に傷がないことを確認する。
8. mTeSR Plus を直ちに添加する (6-well プレートの場合は 2 mL/ウェル)。

2.2 Vitronectin XF コーティング手順

注： **非組織培養処理 (non-tissue culture-treated)** の培養容器をご使用ください。

1. Vitronectin XF を室温 (15 - 25°C) で解凍する。
2. CellAdhere Dilution Buffer で Vitronectin XF を希釈し、最終濃度を 10 µg/mL にする (すなわち、1 mL の CellAdhere Dilution Buffer あたり 40 µL の Vitronectin XF を使用)。Vitronectin XF を希釈するにはには 50 mL のポリプロピレンコニカルチューブ (例: ST-38010) を使用する。
3. 希釈した Vitronectin XF をおだやかに混ぜる。ボルテックスは避ける。
4. 直ちに、希釈した Vitronectin XF 溶液で非組織培養処理の培養容器をコートする (推奨コーティング量は表 1 を参照)。
5. 培養容器を前後にゆっくり揺らし、Vitronectin XF 溶液を表面全体に均一に広げる。
注： 培養容器の表面全体が Vitronectin XF 溶液でコートされていない場合、ヒト ES/iPS 細胞培養に使用しないでください。
6. 使用前に少なくとも 1 時間室温 (15 - 25°C) でインキュベートする。Vitronectin XF 溶液を蒸発させない。
注： すぐに使用しない場合、必ず培養容器を密封し (Parafilm® などを使用)、Vitronectin XF 溶液の蒸発を防いでください。コーティング後に 2 - 8°C で最大 1 週間保存できます。使用する 30 分前に室温 (15 - 25°C) に取り出しておき、7. に進んでください。
7. プレートを片側に静かに傾け、余分な Vitronectin XF 溶液を端に集める。血清用ピペットまたは吸引により余分な溶液を取り除く。コート面に傷がないことを確認する。
8. CellAdhere Dilution Buffer を使用してプレートを 1 回洗浄する (6-well プレートの場合は 2 mL/ウェルを使用)。
9. 洗浄液を吸引し、mTeSR Plus を添加する (6-well プレートの場合は 2 mL/ウェル)。

2.3 Laminin 521 (Human recombinant Laminin 521) コーティング手順

注： **組織培養処理済み (tissue culture-treated)** の培養容器をご使用ください

1. Laminin 521 を 2 - 8°C で解凍する。
注： すぐに使用しない場合、2 - 8°C で最大 3 か月間保存できます。
2. D-PBS (With Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) で Laminin 521 を希釈し、最終濃度を 5 - 10 µg/mL にする。
注： 新しい培養マトリックスに適応させる場合、最初の数回の継代で Laminin 521 濃度を高めにすることが細胞に良好な影響を与える可能性があります。
3. 希釈した Laminin 521 をおだやかに混ぜる。ボルテックスは避ける。
4. 直ちに、希釈した Laminin 521 溶液で組織培養処理済み培養容器をコートする (推奨コーティン

グ量は表 1 を参照)。

5. 培養容器を前後にゆっくり揺らし、Laminin 521 溶液を表面全体に均一に広げる。
6. Laminin 521 溶液の蒸発を防ぐため、培養容器を密封する (Parafilm®などを使用)。2-8°C で一晚インキュベートする。より迅速なコーティングが必要な場合は、使用前に 37°C で少なくとも 2 時間インキュベートする。
注： すぐに使用しない場合、コーティング後の培養容器は 2-8°C で最大 4 週間保存できます。マトリックスが不活性になるので、培養表面を乾燥させないでください。
7. 細胞を播種する準備ができたなら、Laminin 521 溶液を吸引する。
注： コーティングを使用前に洗浄する必要はありません。
8. mTeSR Plus を直ちに添加する (6-well プレートの場合は 2 mL/ウェル)。

3. 継代

ReLeSR によるヒト ES/iPS 細胞塊の継代

ReLeSR は、ヒト ES/iPS 細胞を細胞塊として解離および継代するための酵素フリー試薬です。分化した領域の手動選択や、スクレイパーによる細胞塊の除去は必要ありません。

ReLeSR による継代のビデオマニュアル

https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/Movie_2_126.html

以下の手順は、6-well プレートの 1 つのウェルから細胞を継代するためのものです。他の培養容器を使用する場合は、サイズに応じ容量を調整してください。

1. 継代の少なくとも 1 時間前に Matrigel®または Vitronectin XF で新しいプレートにコーティングする (上記 2.1 または 2.2 参照)。
2. 十分な量の mTeSR Plus を分注し、室温 (15-25°C) まで温める。
注： mTeSR Plus を 37°C のウォーターバスで温めないでください。
3. 細胞を 1 mL の D-PBS (Without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) で洗浄し、吸引する。
注： 分化細胞の領域を除去する必要はありません。
4. 1 mL の ReLeSR を加え、1 分以内に吸引する。コロニーが液体の薄い層にさらされるようにする。
5. 37°C で 6~8 分間インキュベートする。
注： 最適な解離時間は、使用する細胞株によって異なるので、細胞株を初めて ReLeSR で継代するときは、最適な解離時間を決定するようにしてください。
6. 1 mL の mTeSR Plus を加える。
7. プレートをプレート用ボルテックスミキサー (例：Multi-MicroPlate Genie、120 V、Scientific Industries Model SI-4000、1200 rpm) 上に室温で 2~3 分間置いてコロニーを剥離する。あるいは、片手でプレートを持ち、もう片方の手でプレートの側面をおよそ 30~60 秒間強く叩いてコロニーを剥離する (上記ビデオマニュアル参照)。
8. 5 mL 血清用ピペット (例：ST-38003) を使用して、剥離した細胞凝集体を 15 mL コニカルチューブに移す。細胞塊はプレーティングに適した大きさ (平均で約 50-200 μm、図 1 参照) になっている。
注： チューブに移さずウェルから直接細胞塊をプレーティングする場合、5 mL ピペットを使用して細胞塊の溶液を上下に 1 回ピペッティングしてください。これにより、残存している可能性のある大きな塊を確実に破碎できます。
9. mTeSR Plus を入れたコーティング済みのウェルに、細胞塊を目的の密度でプレーティングする。コロニーが最適密度にある場合、培養物は 4~7 日毎に 1:10 から 1:50 の分割比で継代できる (すなわち、1 ウェルからの細胞塊を 10~50 ウェルに播種できる)。コロニーの密度が高すぎるか低すぎる場合は、次の継代時にそれに応じて分割比を調整する (英文マニュアル 6.4 参照)。
10. プレートを 37°C のインキュベーターに入れる。プレートを素早く前後左右に数回動かし、細胞塊を均一に分布させる。プレートは 24 時間動かさない。
注： 細胞塊の不均一な分布は、ヒト ES/iPS 細胞の分化を増加させる恐れがあります。
11. 必要に応じて mTeSR Plus の培地交換を行い、次の継代時まで培養状態と増殖を観察する。培地

は毎日または一日おきに交換する。2日間連続して培地交換をスキップするには、2倍量の培地を加える。

mTeSR Plus のフレキシブルな培養スケジュール例

| 月 | 火 | 水 | 木 | 金 | 土 | 日 |
|----|---|----------|---|----------|---|---|
| 継代 | — | 培地交換 (F) | — | 培地交換(2F) | — | — |

F : 1 倍量で培地交換、2F : 2 倍量で培地交換

mTeSR Plus 培地交換のルール :

2F の場合、培地交換を 2 日連続でスキップが可能です。F の場合、培地交換を 1 日スキップが可能です。このルールに従って、ご自身のフレキシブルな培養スケジュールを作成してください。

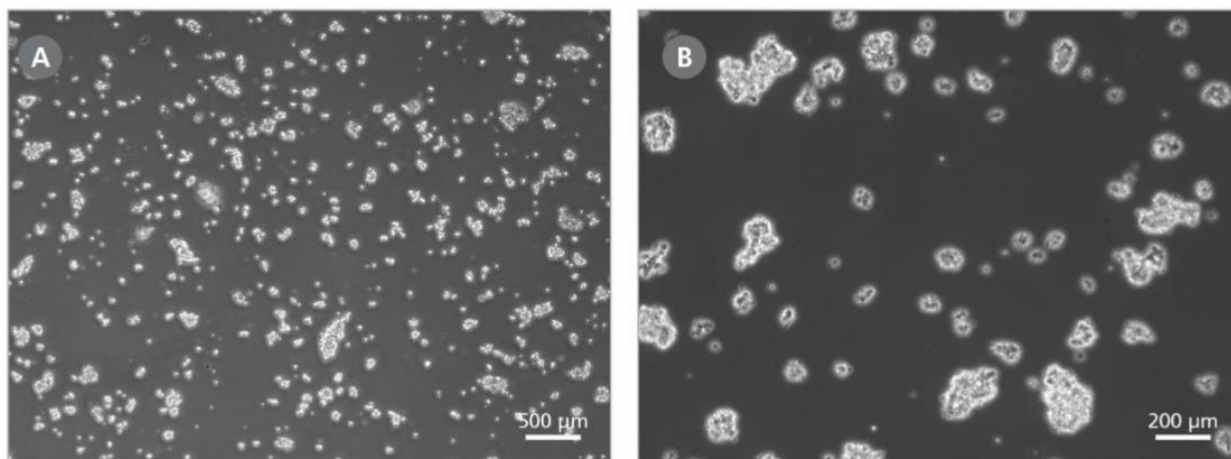


図 1. ReLeSR で継代したヒト ES/iPS 細胞塊のサイズ

上記の継代ステップ 8. で得られた理想的な細胞塊 (平均サイズ約 50 - 200 μm) を 40 倍(A)および 100 倍(B)で観察した例。細胞塊がこのようにならない場合、継代操作のさらなる最適化もご検討ください (詳細は英文マニュアル 8.0 参照)。

【その他】

- Single-cell passaging による継代
単一細胞まで解離して播種する single-cell passaging は遺伝的異常を引き起こす可能性があるためおすすめできかねます。上記でご紹介しているように、細胞塊の状態に解離して播種する clump passaging が適しています。Single-cell passaging から clump passaging への移行方法は、補足マニュアルをご参照ください。
- 英語版完全マニュアル
<https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/10000007757-Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSR Plus.pdf>

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目18-16 住友浜松町ビル6階
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0086
技術的なお問い合わせは : TEL 03-5776-0040 E-mail Tech_support@veritastk.co.jp