

ユーザーガイド

Ceglu™ multiwell plate, 6well, 96well
Ceglu™ dish 100mm

■はじめに

Ceglu™ multiwell plate、Ceglu™ dishは接着性、均質性、保存安定性に優れた細胞培養用化学合成足場材Ceglu™をコートしたウェルプレート、ディッシュで、開封後すぐにご使用いただけます。このユーザーガイドでは、iPSC（人工多能性幹細胞）とMSC（間葉系間質細胞、旧称：間葉系幹細胞）の培養方法について記載しています。記載の手順は一般的なものであり、細胞株や使用培地等によって最適化が必要な場合があります。また他の足場材環境で培養した細胞を、本製品でiPSCを培養する際には、「3. Ceglu™ multiwell plateへの馴化」に記載の馴化操作を行った後、目的の実験を実施することを推奨いたします。

■目次

For iPSC

1. 繼代培養
 - i. シングルセル培養
 - ii. クランプ培養
2. 凍結ストックからの融解
3. Ceglu™ multiwell plateへの馴化

For MSC

4. 繼代培養
5. 凍結ストックからの融解

1. 繼代培養 (For iPSC)

| | | |
|------|---|--|
| 容器 : | Ceglu™ multiwell plate, 6well | [本製品] |
| 細胞 : | 60-80%コンフルエントのヒトiPS細胞 | |
| 試薬 : | StemFit® AK02N 0.5mM EDTA/PBS溶液 またはTrypLE™ Select (1x) CultureSure® Y-27632 1 x D-PBS (-) | [味の素ヘルシーサプライ株式会社] [ナカライトスク株式会社] [ThermoFisher Scientific] [富士フィルム和光純薬株式会社] [ナカライトスク株式会社] |

※必要量の培地や試薬類を室温に戻しておく

i. シングルセル培養

1. ウェルから培地を除去する。
2. 2 mL PBSを加えて細胞を洗浄し、PBSを除去する。
3. 1 mLの0.5 mM EDTA/PBS溶液、もしくはTrypLE™ Select (1 x) を加えて、37°Cの CO₂インキュベーター内で7-8分程度保温する。
4. インキュベーターから取り出して観察し、細胞が丸く浮き上がっていることを確認する。
※インキュベートが足りなければ再度1-2分反応させる。
5. ウェルからEDTA/PBS溶液またはTrypLE™ Selectを除去する。
6. ROCK阻害剤 (10 μM Y-27632) を含む培地1 mLを吹き付けて細胞を剥がし、遠沈管に回収する。
7. 新しい培地1 mLで再度繰り返す。
8. 遠沈管を260 xg、3分、室温で遠心する。
9. 細胞が沈殿していることを確認し、上清を除去する。
10. 1-2 mL ROCK阻害剤を含む培地で細胞ペレットを懸濁する。
11. 細胞数を計測し、細胞懸濁液を調製する。
12. 本製品の各ウェルに細胞懸濁液を2 mLずつ播種する ($3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/well)。
13. 37°CのCO₂インキュベーター内に置き、プレートを素早く前後左右に数回揺らし、細胞を均一に分布させる。
14. 24時間後ROCK阻害剤を含まない培地に交換し、以降培地を毎日交換する（土日除く）。
15. 60-80%コンフルエントに達した時点で継代を行う（通常、Day7）。

| | 6well | 96well | 100mm |
|-------------------------------|--|--|--|
| 使用容器（品番/会社） | 3516/Corning社 | 3595/Corning社 | 664160/Greiner |
| 培養面積 (cm ²) | 9.5 | 0.32 | 58 |
| 播種細胞数 (cells/well) | $3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ | $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ | $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ |
| 播種密度 (cells/cm ²) | $3.2 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ | $6.3 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^4$ | $1.7 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^3$ |
| 培地量 (mL/well) | 2 | 100~150 (μL/well) | 7~10 |
| 剥離剤量 (mL/well) | 1 | - | 3~5 |

ii. クランプ培養

1. ウェルから培地を除去する。
2. 2 mL PBSを加えて洗浄し、PBSを除去する。
3. 1 mLの0.5 mM EDTA/PBS溶液を加えて、37°CのCO₂インキュベーターで6分程度保温する。
4. インキュベーターから取り出して観察し、細胞が丸く浮き上がっていることを確認する。
※インキュベートが足りなければ再度1-2分反応させる。
5. 細胞を吸引しないように、EDTA/PBS溶液を除去する。
6. 5 mLのディスポビペットで培地2 mLを1回吹き付けて細胞を剥がし、遠沈管に回収する。
※太口の1 mLビペットチップを用いてもよい。
7. 新しい培地（ROCK阻害剤不含）1 mLをウェルに加えて回収する。
※接着力が弱い細胞株の場合、ROCK阻害剤（10 μM Y-27632）を含む培地を使用してもよい。
8. 回収した細胞を本製品に1:4から1:20程度に分割して播種する。
※このとき細胞凝集塊サイズが100-200 μmであることが望ましい。播種時にROCK阻害剤を含む培地を使用する場合は1:20から1:80程度に細胞を分割播種する。
9. 37°CのCO₂インキュベーターに置き、プレートを素早く前後左右に数回揺らし、細胞を均一に分布させる。
10. 翌日から培地を毎日交換する（土日除く）。
11. 60-80%コンフルエントに達した時点で継代を行う（通常、Day7）。

2. 凍結ストックからの融解 (For iPSC)

| | | |
|------|-------------------------------|-------------------|
| 容器 : | Ceglu™ multiwell plate, 6well | [本製品] |
| 細胞 : | 凍結したヒトiPS細胞（シングルセル培養） | |
| 試薬 : | StemFit® AK02N | [味の素ヘルシーサプライ株式会社] |
| | CultureSure® Y-27632 | [富士フィルム和光純薬株式会社] |

※必要量の培地や試薬類を室温に戻しておく

1. 遠沈管にROCK阻害剤（10 μ M Y27632）を含む培地を細胞凍結液の10倍量用意する。
※細胞凍結液1 mLの場合、培地10 mLを用意。
2. 凍結細胞を37°Cで素早く融解し、1.の遠沈管に回収する。
3. 遠沈管を260 xgで5分、室温で遠心する。
4. 細胞が沈殿していることを確認し、上清を除去する。
5. 1-2 mL ROCK阻害剤を含む培地で細胞を懸濁する。
6. 細胞数を計測し、細胞懸濁液を調製する。
7. 本製品の各ウェルに細胞懸濁液を2 mLずつ添加する ($5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/well)。
8. 37°CのCO₂インキュベーターに置き、プレートを素早く前後左右に数回揺らし、細胞を均一に分布させる。
9. 24時間後ROCK阻害剤を含まない培地に交換し、以降毎日培地（ROCK阻害剤不含）を交換する（土日除く）。
10. 60~80%コンフルエントに達した時点で継代を行う（通常、Day7）。
※クランプ培養の場合はROCK阻害剤なしの培地を用いてもよい。

3. Ceglu™ multiwell plateへの馴化

上記記載のシングルセルもしくはクランプ培養の方法で、本製品を使用し、概ね2~3継代培養を行う。培養初期は分化細胞が出現する場合があるが、取り除いて継代を行うことで分化細胞の出現が低下して増殖も安定する。

詳しくは、ユーザーガイド プラス（iPSC培養における馴化）を参照ください。

■参考文献

Shimizu, E., Iguchi, H., Le, M.N.T. et al. A chemically-defined plastic scaffold for the xeno-free production of human pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. 2022, 15, 12, 2516

4. 繼代培養 (For MSC)

容器 : Ceglu™ multiwell plate, 6well

[本製品]

細胞 : 70-80%コンフルエントのヒトMSC

試薬 : R:STEM Medium for hMSC High Growth

[ロート製薬株式会社]

TrypLE™ Express (1x)

[ThermoFisher Scientific]

1 x D-PBS (-)

[ナカライトスク株式会社]

※必要量の培地や試薬類を室温に戻しておく

1. ウェルから培地を除去する。
2. 2 mL PBSを加えて細胞を洗浄し、PBSを除去する。
3. 1 mLのTrypLE™ Express (1×) を加えて37°CのCO₂インキュベーターで5-7分保温する。
4. 軽くピッティングして細胞を剥離する。
5. 細胞剥離液を遠沈管に回収する。
6. 剥離剤の2倍量 (2 mL) の培地をウェルに添加し、残りの細胞を5.の遠沈管に回収する。
7. 遠沈管を400 xgで5分、室温で遠心する。
8. 細胞が沈殿していることを確認し、上清を取り除く。
9. 1-2 mLの培地で細胞を懸濁する。
10. 細胞数を計測し、細胞懸濁液を調製する。
11. 本製品の各ウェルに細胞懸濁液を2 mLずつ播種する (3×10⁴~1×10⁵ cells/well)。
12. 37°CのCO₂インキュベーターに置き、プレートを素早く前後左右に数回揺らし、細胞を均一に分布させる。
13. 70~80%コンフルエントに達した時点で継代を行う。

5. 凍結ストックからの融解 (For MSC)

容器 : Ceglu™ multiwell plate, 6well

[本製品]

細胞 : 凍結したヒトMSC

試薬 : R:STEM Medium for hMSC High Growth

[ロート製薬株式会社]

※必要量の培地や試薬類を室温に戻しておく

1. 細胞凍結液の10倍量の培地を遠沈管に用意する。
※細胞凍結液1 mLの場合、培地10 mLを用意。
2. 37°Cで素早く凍結細胞を融解し、1の遠沈管に回収する。
3. 遠沈管を400 xgで5分、室温で遠心する。
4. 細胞が沈殿していることを確認し、上清を取り除く。
5. 1~2 mLの培地で細胞を懸濁する。
6. 細胞数を計測し、細胞懸濁液を調製する。
7. 本製品の各ウェルに細胞懸濁液を2 mLずつ添加する (5×10⁴~1×10⁵ cells/well)。
8. 37 °CのCO₂インキュベーターに置き、プレートを素早く前後左右に数回揺らし、細胞を均一に分布させる。
9. 70~80%コンフルエントに達した時点で継代を行う。



Ceglu™およびその他の製品については、
弊社ウェブサイトをご覧ください。

SEKISUI

積水化学工業株式会社

〒105-8566 東京都港区虎ノ門 2-10-4
お問い合わせ : support_life@sekisui.com