

ユーザーガイド

Ceglu™ multiwell plate, 6well

■はじめに

Ceglu™ multiwell plate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をコートした6ウェルプレートで、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、本製品で培養する際には3.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. 継代培養
 - 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. 継代培養
 5. 凍結ストックからの融解
-

1. 継代培養

| | | |
|-----|-------------------------------|---------------------------|
| 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 | [味の素ヘルシーサプライ株式会社] |
| | 0.5mM EDTA/PBS溶液 | [ナカライテスク株式会社] |
| | またはTrypLE™ Select (1x) | [ThermoFisher Scientific] |
| | CultureSure® Y-27632 | [富士フィルム和光純薬株式会社] |
| | 1 x D-PBS (-) | [ナカライテスク株式会社] |

※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. 培地を除去する。
2. PBS (-) を加えて細胞を洗浄し、PBS (-) を除去する。
3. 1mLの0.5mM 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. EDTA/PBS容器またはTrypLE™ Selectを除去する。
6. ROCK阻害剤 (10µM Y-27632) を含む培地1mL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1mLで再度繰り返す。
8. 遠沈管を260g、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. ROCK阻害剤を含む培地で細胞ペレットを懸濁する。
11. 細胞数を計測する。
12. 本製品の各ウェルに2 mLずつ播種する (3×10⁴~1×10⁵ 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。

ii. クランプ培養

1. 培地を除去する。
2. PBSを加えて洗浄し、PBSを除去する。
3. 1mLの0.5mM EDTA/PBS溶液を加えて、37°Cの CO₂インキュベーターで保温する。
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。
1. 細胞を吸引しないように、EDTA/PBSを除去する。
2. 5mLのピペットで培地2mLを1回吹き付けて細胞を剥がし、遠沈管に回収する。
3. 新しい培地 1 mLをプレートに加えて回収する。
4. 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100-200µm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。

2. 凍結ストックからの融解

| | | |
|-----|-------------------------------|-------------------|
| 容器： | Ceglu™ multiwell plate, 6well | [本製品] |
| 細胞： | 凍結したヒトiPS細胞 | |
| 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。
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260g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. ROCK阻害剤を含む培地で細胞を懸濁する。
6. 細胞数を計測する。
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 10⁴~1 \times 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. 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。
10. 60~80%コンフルエントに達した時点で継代を行う。
※クランプ細胞の場合はROCK阻害剤なしの培地を用いる

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、3~5継代培養を行う。培養初期は分化細胞が出現する可能性があるが、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。

■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 12, 2516 (2022) .

4. 継代培養

| | | |
|-----|------------------------------------|---------------------------|
| 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 (-) | [ナカライテスク株式会社] |

※必要量の培地や試薬類を室温に戻しておく

1. 培地を除去する。
2. PBS (-) を加えて細胞を洗浄し、PBS (-) を除去する。
3. 1mL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. 軽くピペ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400g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. 培地で細胞を懸濁する。
10. 細胞数を計測する。
11. 本製品の各ウェルに2mLずつ播種する ($3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 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

| | | |
|-----|------------------------------------|-------------|
| 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。
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400g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. 培地で細胞を懸濁する。
6. 細胞数を計測する。
7. 本製品の各ウェルに2mL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. 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