

hES 細胞解凍手順

Ver 1.0 : 2018 年 5 月 11 日

Ver 1.01 : 2019 年 3 月 5 日

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University

試薬一覧

試薬	メーカー	型番
StemFit	味の素ヘルシーサプライ	AK03N
iMatrix-511MG	ニッピ	892005
Culture Sure 10mmol/L Y-27632	富士フィルム和光純薬	039-24591
細胞培養プレート, 6 ウェル	住友ベークライトなど	MS-80060S

StemFit AK03N→ StemFit AK02N, iMatrix-511MG→ iMatrix-511, また他は同等品に代えても培養自体は可能と思われる。

インキュベータは 37°C、5%CO₂、5%O₂ を推奨

手順

1. コーティング

- 1) well あたり 1.5mL の PBS を加え、4.8 μL の iMatrix を添加しよく混ぜる。
- 2) 37°C で 1 時間以上インキュベートする。当日使用しない場合はプレートをパラフィルムなどでシールし 4°C で保存。3 日以内に使用すること。

2. 解凍準備

バイアルあたりおよそ 1 x 10⁶ 個の細胞が入っている。

解凍後の生細胞を 5x, 2x, 1x 10⁵/well などを目安に播種密度を振ると良い。3-4 well 程度使用することになる。

1 バイアルの解凍/播種につき 12mL の StemFit を遠心管に入れ、Y-27632 を 12μL (final 1μM) 加える

プレートからコーティング液を除き、Y 入り培地を 2mL 加える

プレートをインキュベーターに入れる

- 1) StemFit [10mL/バイアル] を遠沈管に入れ、4°C に冷却しておく。
- 2) ウォーターバスを 37°C に加温する。
- 3) スタイロフォームなどの容器に液体窒素を入れる。
- 4) 凍結保存容器より、凍結バイアルを取り出し、スタイロフォーム容器の液体窒素中に移動する。

3 解凍

- 1) 凍結細胞バイアルを Water Bath に入れる。軽く揺すりながら解凍し、氷が見えなくなったら直ちに次の工程に移る。

- 2) Water Bath よりバイアルを取り出して、アルコールで清拭し、15mL 遠沈管に細胞懸濁液を移す。
- 3) 4°Cに冷却した StemFit 1mL を、細胞懸濁液にゆっくり混ぜながら加える。
- 4) 更に 8mL の 4°Cに冷却した StemFit を、軽く混和しながらゆっくり加える。
- 5) 遠心機にて室温、1000rpm、5min 遠心する。
- 6) 遠心終了後、上清を除去する。
- 7) StemFit+Y を 2000 μ L 加え、懸濁する。
- 8) マイクロチューブに細胞数検査用検体 100 μ L を採取し、総細胞数、生存率を求める
生細胞数はおよそ $4\text{-}5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ となっているはずである。
- 9) ~~播種する well 数につき 2 mL の StemFit を遠沈管に加える。~~
- 10) $5 \times 10^5 \text{ cells}$ 、 $2 \times 10^5 \text{ cells}$ 、 $1 \times 10^5 \text{ cells}$ になる細胞懸濁液量を計算する。それぞれおよそ 1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L 前後になるだろう。
- 11) ~~細胞懸濁液に final 10 μ M になるよう ROCK Inhibitor を添加する。~~
- 12) ~~コート済みのプレートを取り出し、コート液を除去する。~~
- 13) 各 well に計算した細胞懸濁液を加える。播種したらすぐにプレートを揺すって均一に広げる。
接着が早いので、細胞が偏らないように注意。
- 14) プレートをインキュベータに入れ、培養を開始する。

4. 解凍後

翌日、顕微鏡で細胞の状態を確認する。

通常解凍した翌日は、多数の細胞が死んでいるのが確認される。毎日 1 回培地交換 (Y27632 なし) を継続する。早ければ、4 日目で継代可能な状態になる。

細胞密度が低い、single cell の割合が多い、などがあれ培地交換を翌々日からとして良い。