EDTA 細胞継代ワーキングソリューション（使用液）

取扱説明書

一、製品概要

hPSC Dissociation bufferは、0.5mMのEDTAを含み、この消化液はろ過および滅菌処理がされており、多能性幹細胞の消化に直接使用できます。本消化液は簡便かつ迅速に作用し、通常37℃で約8分間消化するだけで、大部分の多能性幹細胞を消化することができます。

二、製品情報

表 1：hPSC Dissociation Buffer 製品詳細

製品情報	品番	規格	濃度
hPSC Dissociation Buffer	RP01007	500 ml	0.5 mM EDTA

三、保存条件

1. 保存温度：室温 15-25℃。
2. 有効期間：12ヶ月。

四、使用説明

1. hPSCウェル内の培地を吸引除去し、2 mL/ウェルのDPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を添加し、軽く揺らしてDPBSを吸引除去します。
2. 2 mL/ウェルのhPSC Dissociation Bufferを添加し、溶液がウェルの底を完全に覆うようにします。
3. 37℃のインキュベーターで7～8分間インキュベートします。

TIPS：（1）8分間消化後、顕微鏡下で細胞の状態を確認します。大部分の細胞が明るく丸くなり、かつ細胞が基質から剥離または浮遊していない状態で消化を終了します（図 1C）。大部分の細胞がまだ明るくなっていない場合は、消化時間を延長する必要があります（図1A&B）。

（2）6ウェルプレートは、インキュベーターの金属製仕切り板に直接接触させ、均一に加熱されるようにします。積み重ねはしないでください。

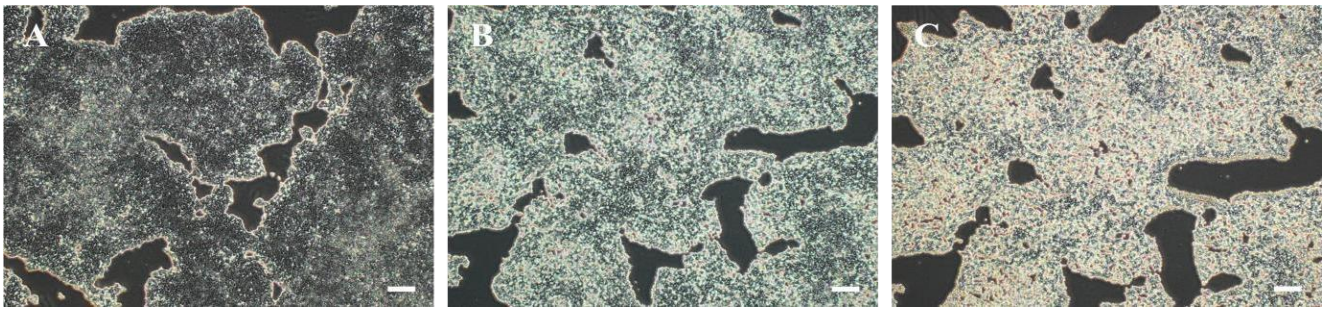

図 1： hPSC Dissociation Buffer を用いたhPSC消化

（A）EDTAで消化4分後（B）EDTAで消化6分後（C）EDTAで消化8分後　スケールバー：200 μm

4. 消化処理終了後、細胞培養プレートを軽くバイオセーフティキャビネットに取り戻し、細胞を振盪させないように注意し、プレートを傾けてhPSC Dissociation Bufferを吸引除去します。
5. 直ちに、予温したROCK阻害剤を含むhPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget、Blebbistatin 2.5μMまたはY27632-2HCL 10μM）を2 mL/ウェルで添加し、6ウェルプレートを水平方向に十字振ることで、細胞を基質から剥離させます。

TIPS：（1）ROCK阻害剤を含むhPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget）を添加する際、細胞を1～2回穏やかにピペッティングしてください。単細胞になることを防ぐために、2回を超えないようにします。

（2）細胞をこすらないように注意します。一部の細胞（10～15%）が基質から剥離しないのは正常です。大量の細胞が剥離しない場合は、消化時間を延長する必要があります。

（3）一度に1枚の6ウェルプレートのみを処理します。hPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget）を添加したら、速やかに吸い出してください。hPSC完全培地を添加するとEDTA継代液は急速に失活し、また細胞はすぐに再接着します。hPSCはhPSC Dissociation Buffer内に長時間（<15min）留めることができないため、細胞の回収と播種は迅速に行う必要があります。

6. 播種：

6.1 MatrigelまたはVitronectinでコーティングした6ウェルプレートのコーティング液を吸引除去し、予温したROCK阻害剤を含む完全培地（Blebbistatin 2.5μMまたはY27632-2HCL 10μM）を2 mL/ウェル添加します。

6.2 6ウェルプレートに細胞名、継代数（P#）、継代比率（#:#）、日付、作業者IDを記入します。

ステップ5で調製した細胞懸濁液を軽く振り混ぜ、予め設定した継代比率に従って細胞を6ウェルプレートに均等に分配します。

TIPS：必要に応じて、各プレートの継代に必要な細胞量を算出した後、15 mL遠心管に移し、予温したROCK阻害剤を含む完全培地（Blebbistatin 2.5μMまたはY27632-2HCL 10μM）で懸濁し12 mLに定容し、コーティング液を除去した6ウェルプレートに均等に分配することも可能です（他のプレートも同様）。

7. 6ウェルプレートを水平方向に十字振りを3回実施後、37℃・5% CO・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再度水平方向に十字振りを3回行い、一晩培養します。
8. 18～24時間後に新しいhPSC完全培地（ncEpicまたはncTarget）に交換します。以降は毎日培地を交換し、4～5日後に継代または凍結保存を行います。