

## hPSC Dissociation Buffer

目次 #RP01007 500mL

### 製品説明

hPSC Dissociation Buffer は、0.5 mM EDTA を含む消化液です、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 °C 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。

### 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	500mL	0.5 mM EDTA

\*本品をご使用前に、室温まで戻してください。

### 保存条件

- 保存温度 : 2-8 °C。
- 有効期間 : 12ヶ月。

### 使用説明

- hPSC ウエ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 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 °C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。

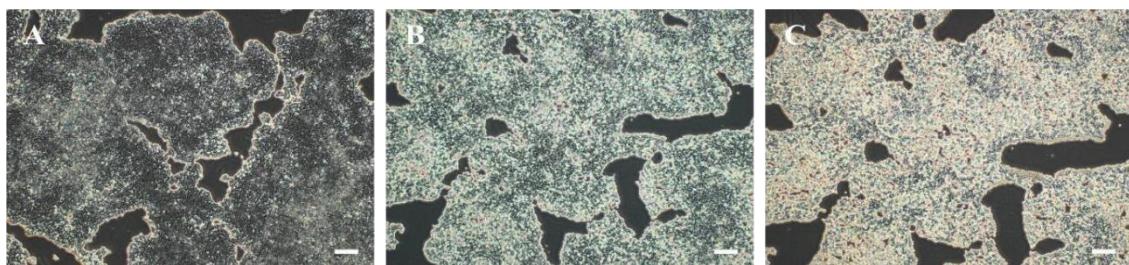


図 1: hPSC Dissociation Buffer を用いたhPSC消化

(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2mL/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回穩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 hPSC Dissociation Buffer 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 2.5 μM または Y27632-2HCL 10 μM) 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 2.5 μM または Y27632-2HCL 10 μM) 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 °C・5% CO<sub>2</sub>・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。