

# hPSC 高効率凍結保存液

## 取扱説明書

### 一、製品概要

当社製hPSC凍結保存液は、血清・外来タンパク質を含まず、化学成分が明らかなヒト多能性幹細胞（hPSC）用凍結保存液製品です。本製品はhPSCの凍結保存に特化した特殊処方により、凍結過程における細胞損傷を大幅に低減し、解凍後の細胞生存率を向上させるとともに、長期間にわたりhPSCの多分化能を効果的に維持します。化学成分が明確で、外来タンパク質を含まず、ロット間の品質バラツキが少ないため、研究グレード細胞保存に適用可能です。

### 二、製品情報

表1：hPSC凍結保存液 製品詳細

| 製品情報         | 規格    | 品番         | 保存条件  |
|--------------|-------|------------|-------|
| hPSC高効率凍結保存液 | 50 mL | SN-06-1210 | 2℃～8℃ |

### 三、保存条件

1. 保存温度：4℃。
2. 有効期間：12ヶ月。

### 四、hPSCの凍結保存（6ウェルプレート为例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

1. 細胞が約85%コンフルエンスに達したら回収・凍結保存可能です。一般的に、6ウェルプレートでは1ウェルあたり2-4×10<sup>6</sup>個の生存細胞を回収し、1本の凍結管に保存します。
2. 必要数の1.5/2 mL凍結管を用意し、細胞名、継代回数（P#）、日付、操作者IDを明記します。
3. 4℃冷蔵庫からhPSC凍結保存液を取り出し、室温で温めておきます。**使用前によく振り混ぜます。**
4. hPSC培養上清を吸引除去し、DPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を2 mL/ウェル添加し、数回軽く揺らしてから、吸引除去します。
5. hPSC継代使用液を2 mL/ウェル添加し、37℃インキュベーターで7-8分間静置します。
6. 消化処理終了後、プレートを静かに取り出し、EDTA溶液を吸引除去します。
7. 予温したhPSC凍結液をよく振り混ぜ、各ウェルに1 mLの凍結液を添加し、穏やかにピペッティング

します。水平方向に3回十字振りした後、懸濁液をを吸引して1.5/2 mL凍結管に加えます。

- 細胞をプログラム凍結ボックスに入れ、-80℃のフリーザーに一晩保存し、翌日液態窒素タンクに移して長期保存します。または、プログラム凍結装置を使用して細胞を-80℃以下に冷却し、そのまま液態窒素に移して保存します。

## 五、hPSCの解凍（6ウェルプレート为例とします。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

- ウォーターバスを37℃に予熱します。
- Vitronectin でコーティングした6ウェルプレートを、バイオセーフティキャビネット内に約1時間静置し、室温（15～30℃）に戻しておきます。
- hPSC完全培地（NcEpicまたはNcTarget）4 mL を準備し、1 μLの Blebbistatin（10 mM）を1:4000で添加後、室温（15～30℃）に戻します。

**Tips：培地を37℃のウォーターバスで予温しないでください。**

- 冷凍保存した細胞1本を取り出して37℃ウォーターバスで軽く振りながら1分以内に解凍します。肉眼で細胞懸濁液内の氷晶がほぼ消失した時点で取り出します。
- 凍結管の表面を75%エタノール無塵紙で拭浄後、バイオセーフティキャビネットに移します。細胞懸濁液を予め準備した15 mL遠心管に移し、DMEM/F12 10 mL を滴下しながら、軽く振り混ぜて細胞を均一に分散させます。160×g、5分間 遠心します。
- 上清を吸引除去し、予温したBlebbistatin+ hPSC完全培地（NcEpicまたはNcTarget）4 mL を加え、細胞をよく懸濁します。ピペッティングはしないようにします。
- 6ウェルプレートの2ウェル分のVitronectinコーティング液を吸引除去し、懸濁した細胞を2 mL/ウェルで2ウェルに播種します。
- 水平方向に3回十字振りを実施後、37℃・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3回十字振りを行ない、インキュベートします。
- 18～24時間後に新鮮なhPSC完全培地（NcEpicまたはNcTarget）に交換し、以降は毎日培地を交換します。