



## Ex-iPS Cell Medium

製品コード ME-09J00112、ME-09J00152

### 1 製品概要と保存温度

製品名：Ex-iPS Cell Medium

Ex-iPS Cell Medium は iPS 細胞に安定的な増殖能を示す無血清・Xeno-free（異種動物成分不含）です。培養容器に対する接着性に優れ、培地交換頻度を低減できる性質を実現しています。

製品コード：ME-09J00112

	容量	保存温度
基礎培地	100 mL	-20 °C
付属サプリメント	4 mL	-20 °C

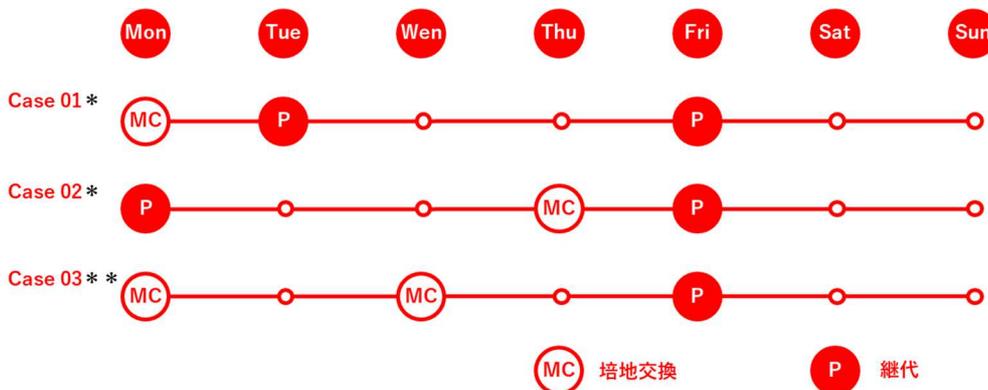
100mL タイプは数量限定販売のため、なくなり次第販売終了です。

製品コード：ME-09J00152

	容量	保存温度
基礎培地	500 mL	-20 °C
付属サプリメント	20 mL	-20 °C

#### 培地交換及び継代のスケジュール

週末の培地交換が不要



\* 京都大学 253G1 株、信州大学カニクイザル iPS 株を用いてフィーダーフリー培養による増殖を確認

\*\* 増殖が遅い株の場合



## 2 調製方法

### 2.1 解凍方法

基礎培地と付属サプリメントを使用日前日に 2 - 8 °C の冷蔵庫内で解凍するか、又は使用する数時間前に室温で解凍、又は使用直前に 37 °C ウォーターバス等で解凍してください。室温や 37 °C で長時間温めないようにしてください。

### 2.2 調製方法

解凍した基礎培地に付属サプリメントを全量添加後、よく混和してください。これを Ex-iPS Cell Medium としてご使用ください。

### 2.3 保存方法

解凍して混和後、なるべく早くご使用ください。保管する場合は、2 - 8 °C で推奨 1 週間、最長で 2 週間保存可能です。1 週間以内に使用しない分はなるべく早めに再凍結して使用頂くことを推奨します。1 回のみ再凍結後、解凍して使用可能です。

## 3 培養方法（例）

### 3.1 培養容器のコーティング

本製品は低濃度の iMatrix511（組換えラミニン）を含有\*しており、iPS 細胞の株によっては、そのままコーティング無しでもご使用いただけます。**接着状態が悪い場合は、iMatrix511 を追添加\*\*して頂くか、培養容器をラミニン、ビトロネクチン等でコーティングされたものを用いてください。**

\* iMatrix511 を含有しない培地をご希望の方は別途相談ください。

\*\* 基本的に接着能の高い培地ですので、追添加の際は iMatrix511 溶液（0.5 mg/mL）を培地に対して 1/5000 - 1/2000（0.02 - 0.05 %）で追加して頂ければ十分です。

### 3.2 培地量

使用する細胞に対して、培養ディッシュ、フラスコ、プレートの面積当たり、約 0.2 - 0.5 mL/cm<sup>2</sup> の培地量でご使用ください。

### 3.3 培地交換

培地量、細胞数、細胞種に合わせて 2 - 3 日ごとを目安に培地交換してください。3 日間培地交換を行わない場合、培地量を多めに（0.3 - 0.5 mL/cm<sup>2</sup>）添加してください。（**1 製品概要と保存温度**参照）

### 3.4 細胞の剥離、継代時の酵素処理

細胞剥離液は 0.5 mM EDTA in PBS 溶液（nacalai 製 # 13567-84）を推奨します。細胞を PBS で洗浄後、前述の EDTA 溶液を 0.03 - 0.1 mL/cm<sup>2</sup> で添加し、5 - 20 分間を目安に処理して剥離してください。



EDTA 溶液で剥離しにくい細胞株の場合、TrypLE Select (1X) で3 - 10 分間を目安に処理してください。EDTA 溶液は比較的長い時間処理しても問題ありませんが、酵素を使用する場合は処理時間がなるべく短い方が細胞の状態は良い傾向にあります。

また、オーバーコンフルエントの場合は細胞が剥離しにくい場合がありますので、コンフルエント手前で処理するか、処理時間を調整して剥離してください。

#### 4 iPS 継代培養の推奨プロトコル例

以下に、当社 Ex-iPS cell Medium を使用した iPS 細胞のフィーダーフリー培養プロトコルの推奨例を記載します。

4.1 6 ウェルプレート、3.5 cm、6 cm、10 cm カルチャーディッシュ等で培養された 80 - 90 % コンフルエントのフィーダーフリー iPS 細胞\*を用意する。

\* オンフィーダーの iPS 細胞の剥離については、一般的なフィーダーフリー化のプロトコルを参照してください。

4.2 継代に使用する Ex-iPS Cell Medium を計量し、3 - 5  $\mu\text{M}$ \*になるように Y-27632 を添加する。

\* 5  $\mu\text{L}$  を超えて添加する場合は翌日の培地交換を推奨します。

4.3 80 - 90 % コンフルエントのフィーダーフリー iPS 細胞を、PBS で洗浄し、PBS を除去する。

4.4 0.5 mM EDTA in PBS 溶液を 0.03 - 0.1 mL/cm<sup>2</sup> で添加し、5 - 20 分間\*、37 °C インキュベーターで処理する。

\* 5 分以上経ったら、時々インキュベーターから取り出し、軽くディッシュを揺する又は軽くタッピングして細胞が自然に剥がれるまで処理する。剥がれ次第回収する。

4.5 4.2 の Y-27632 を添加した Ex-iPS Cell Medium を、1 mL チップやピペットを使用して細胞に吹き付けることで完全に剥離\*させる。

\* 培地を添加すると、剥がれかけている細胞がすぐに再接着するため、なるべく時間をかけずに、ディッシュを回しながら全体に培地を細胞に吹き付けることを推奨します。細胞が剥がれにくい場合、EDTA 処理時間を延長して細胞をしっかり剥離させてください。

4.6 細胞懸濁液をチューブに回収し、必要に応じてセルカウントを行う。

4.7 細胞懸濁液を 180g X 3 分間遠心\*し、上清を捨て、4.2 の Y-27632 を添加した Ex-iPS Cell Medium を添加して再懸濁する。細胞株によっては、iMatrix511 溶液を播種直前に 1/10000 - 1/2000 量添加 (10 mL の培地に対して、1 - 5  $\mu\text{L}$ ) する。



\* EDTA 溶液の最終濃度が播種時の培地に対して 3%以下である場合、遠心せずにそのまま以下の手順で播種することも可能です。

4.8 細胞株ごとに適切な細胞数、スプリットレート、添加培地量でプレートやディッシュに播種し、播種後すぐに容器を振って均一に攪拌\*する。

\* 容器への接着が早いため、播種後なるべく早く攪拌する。インキュベーターに移す前に、10 - 20 分間静置して細胞接着を待ってから移すことを推奨します。

4.9 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターに静置する。

4.10 2 - 3 日ごとに Ex-iPS Cell Medium\* で培地交換を行い、細胞のコンフルエンスに合わせて 3 - 6 日で継代を行う。

\* 培地交換時は ROCK 阻害剤の添加は不要です。

## 5 トラブルシューティングガイド

	問題	対処
1	細胞の接着不良	<ul style="list-style-type: none"> <li>・本培地はそのまま使用しても容器に細胞接着する場合がありますが、細胞株や培養容器の種類によっては細胞が底面に接着しにくい場合があります。また、長期間冷蔵保管すると接着能が低下します。その場合は iMatix511 を少量添加 (3.1 参照) して播種して頂くか、ラミニンやビトロネクチンでコートされた容器をお使いください。</li> </ul>
2	増殖率が低い	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞株によっては増殖率が低い場合があります。継代時のスプリットレートを上げて培養してください。本培地に切り替えてから、しばらく継代培養を続けることで増殖が安定する場合があります。</li> <li>・シングルセル継代をお試してください。0.5 mM EDTA in PBS 溶液を用いて、10 分から 20 分間程度の剥離処理と軽いピペッティングを行うことで、シングルセル化し継代することが可能です。TrypLE Select でも可能ですが、その場合は処理時間を 3 分から 7 分間ほどの短い時間で処理してください。(4iPS 継代培養の推奨プロトコル例 参照)</li> <li>・iMatrix511 を培地量に対して 1/5000(5ml の培地に対して 1ul) 添加して頂くか、ビトロネクチンコートをお試してください。</li> </ul>
3	コロニーのエッジが尖っている	<ul style="list-style-type: none"> <li>・形態が異なることがありますが未分化維持や増殖には問題がない場合がございます。細胞形態 (写真) など情報を頂けましたら、当社でサポートをいたしますのでご相談ください。</li> </ul>
4	未分化性細胞のみを維持して継代したい	<ul style="list-style-type: none"> <li>・シングルセル継代を 2~3 回繰り返すことで、未分化細胞のポピュレーションが維持できるケースがございます。0.5mM EDTA in PBS 溶液を用いて、10 分から 20 分間程度の剥離処理と軽いピペッティングを行うことで、シングルセル化し継代することが可能です。TrypLE Select でも可能ですが、その場合の処理時間は 3 分から 7 分間ほどの短い時間で処理してください (4iPS 継代培養の推奨プロトコル例参照)</li> <li>・未分化性維持を促進する研究用サプリメントをご提案いたしますのでご相談ください。</li> <li>・剥離処理したのち、遠心分離の代わりに 3-7 分間静置した後、上清を除去することで分化傾向の細胞の除去が可能です。</li> </ul>
5	分化能が低い細胞です	<ul style="list-style-type: none"> <li>・分化誘導の前に iPS 細胞を酵素処理する必要がある場合、EDTA 処理に変更すると改善する場合があります。本培地に切り替えてから、しばらく継代培養を続けることで未分化状態や分化能が安定する場合があります。</li> </ul>

## 6 注意

本製品は研究用試薬です。ヒトや動物の医療用・臨床診断には使用しないでください。

## 7 お問い合わせ

お問い合わせの際は、下記当社連絡先までご連絡お願い致します。

お電話の場合、オペレーターにご用件をお伝えいただいた後、当社から折り返しお電話させていただきます。

-Tel : 075-585-4560

-Email : sales@myoridge.co.jp

-URL : <https://myoridge.co.jp>

-所在地 : 京都府京都市左京区吉田河原町 14 番地 公益財団法人京都技術科学センター 本館 B5 号室