

Myoridge Cell Manual with CarmyA Medium UG ver.3.2

心筋細胞 解凍・培養マニュアル



株式会社マイオリッジ | info@myoridge.co.jp

心筋細胞 解凍・培養マニュアル

目次

1.	構成	2
2.	関連製品 (表 2 参照)	3
3.	別途ご用意いただくもの	5
4.	心筋細胞の解凍フロー	6
5.	プレートのコート - 96 well plate (低面積: 約 34 mm ²)	7
6.	心筋細胞の解凍	7

1. 構成

- 心筋細胞解凍・培養マニュアル
- クライオチューブ凍結心筋シングル細胞 CarmyA シリーズ (表1参照)

表1 クライオチューブ凍結心筋シングル細胞 CarmyA シリーズ

製品コード	製品名	容量
H-011106	CarmyA	1.0×10 ⁶ cells / vial
H-011107	ヒト iPS 細胞由来心筋細胞	1.0×10 ⁷ cells / vial
G-011106	CarmyA-GCaMP	1.0×10 ⁶ cells / vial
G-011107	ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (GCaMP 導入株)	1.0×10 ⁷ cells / vial
M-011106	CarmyA-Monkey サル iPS 細胞由来心筋細胞	1.0×10 ⁶ cells / vial

■ CarmyA シリーズ

- ・細胞はドライアイスとともに梱包してお送りします。-80℃以下のフリーザー又は液体窒素等で保存してください。
- ・一か月以上保存する場合の推奨温度帯は-150℃以下です。
- ・細胞の解凍と維持には **CarmyA®用播種・維持培地キット** をご用意ください。(2 関連製品参照)

2. 関連製品 (表2参照)

- **CarmyA®用播種・維持培地キット**

必要量は心筋細胞 1.0×10^6 cells / vial 1本につき1キットが目安です。

- **CarmyA®維持用培地 UG**

CarmyA®用播種・維持培地キットの維持用培地 UG が追加で必要な場合はこちらをお求めください。

表2 CarmyA®専用培地

製品コード	商品名	容量
ME-12A001KT	CarmyA®用播種・維持培地キット	CarmyA®播種用培地-2TM 10 mL
		CarmyA®播種用培地-TB 10 mL
		CarmyA®維持用培地 UG 40 mL
		2 TM 専用サプリメント 1 本
		維持培地 UG 専用サプリメント 1 本
ME-01A00241	CarmyA®維持用培地 UG	CarmyA®維持用培地 UG 40 mL 維持培地 UG 専用サプリメント 1 本

■ CarmyA®維持用培地 UG

- ・40 mL 強入りです。
- ・解凍播種の翌日に使用します。
- ・**CarmyA®維持用培地 UG** と **維持培地 UG 専用サプリメント** を 4°C で一晩または室温で数時間かけて解凍してください。
- ・**維持培地 UG 専用サプリメント** はボルテックスやタッピングを避けてスピンドウンしてください。
- ・培地は解凍後に転倒混和してから残渣を除去するために $300 \times g$ で5分間遠心分離して上清を40 mL 回収し、**維持培地 UG 専用サプリメント** 1本を添加して転倒混和により、培地をよく混ぜてご使用ください。
- ・培地の加温は必要量を分取しておこなってください。
- ・培地の保証保存期間は、 -20°C 以下で6カ月間、解凍して**維持培地 UG 専用サプリメント** を添加した後は 4°C で2週間です。(再凍結・融解は不可)

■ CarmyA®播種用培地-2TM

- ・ 10 mL 入りです。
- ・ 解凍播種時に使用します。
- ・ CarmyA®播種用培地-2TM と 2TM 専用サプリメントを 4 °Cで一晩または室温で数時間かけて解凍してください。
- ・ サプリメントはボルテックスやタッピングを避けてスピンドウンしてください。
- ・ 培地は解凍後に転倒混和してから残渣を除去するために 300 ×g で 5 分間遠心分離して上清を 9.6 mL 回収し、2TM 専用サプリメント 1 本を添加して転倒混和により、培地をよく混ぜてご使用ください。
- ・ 培地の加温は必要量を分取しておこなってください。
- ・ 培地の保証保存期間は、-20°C以下で 6 カ月間、解凍して 2TM 専用サプリメントを添加した後は 4 °Cで 2 週間です。(再凍結・融解は不可)

■ CarmyA®播種用培地-TB

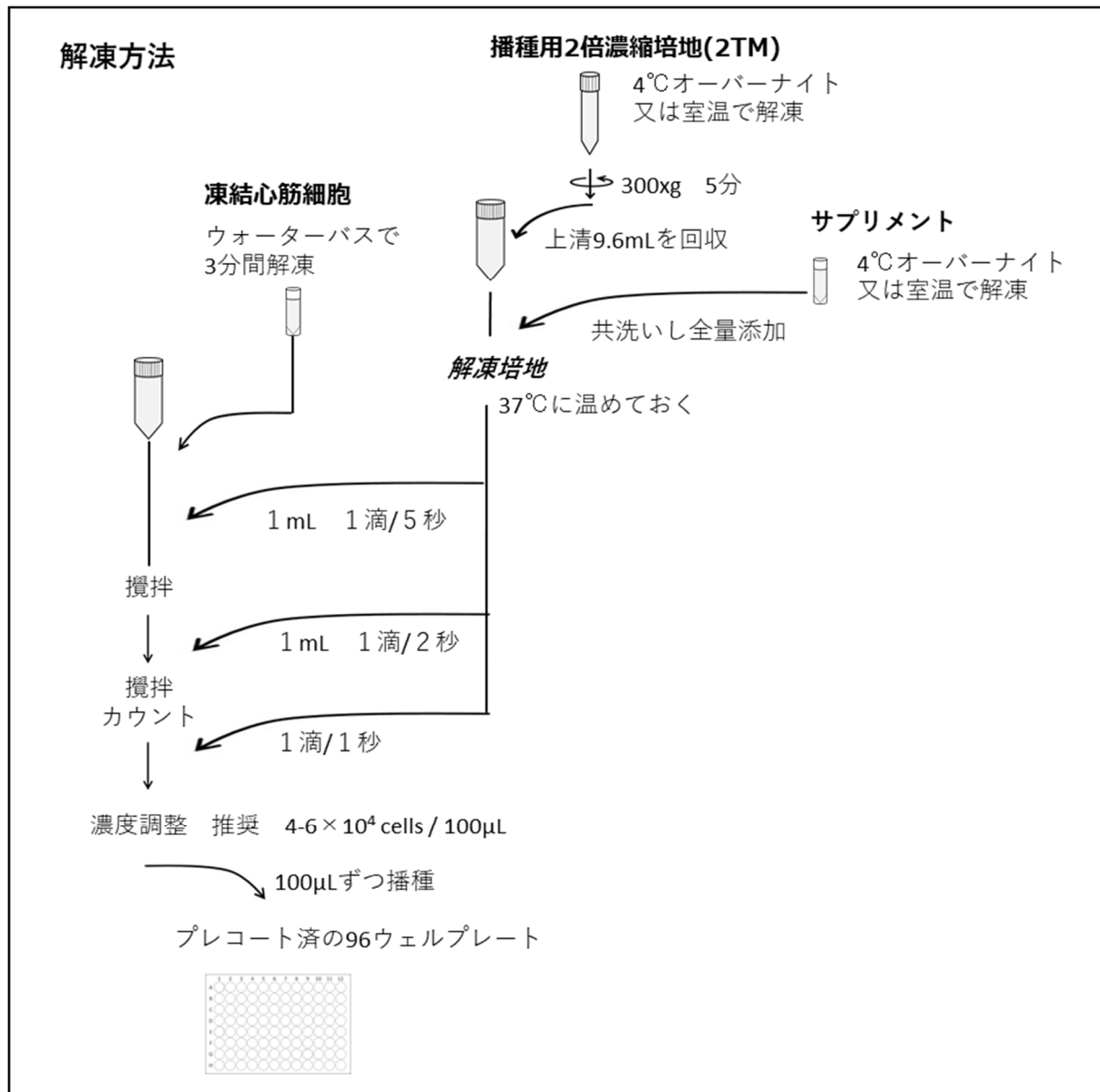
- ・ 10 mL 入りです。
- ・ 細胞の解凍播種時前にプレートをコートする際に使用します。
- ・ CarmyA®播種用培地-TB を 4 °Cで一晩または室温で数時間かけて解凍してください。
- ・ 培地は解凍後に転倒混和してから残渣を除去するために 300 ×g で 5 分間遠心分離して上清を 9.6 mL ほど回収してご使用ください。
- ・ 培地の保証保存期間は、-20°C以下で 6 カ月間、解凍後は 4 °Cで 2 週間です。(再凍結・融解は不可)

3. 別途ご用意いただくもの

- -80°Cフリーザー
- -150°Cディープフリーザー又は細胞保存用液体窒素タンク（1カ月以上保存の場合）
- -20°Cフリーザー
- 20 µL ピペットマン、20 µL チップ、200 µL ピペットマン、200 µL チップ、1000 µL ピペットマン、1000 µL チップ
- 50 mL 遠沈管、15 mL 遠沈管
- ウォーターバス 37°C
- インキュベーター 37°C 5% CO₂
- ROCK Inhibitor (Y-27632)
- 接着因子 (Fibronectin Sigma F0895)
- 血球計算盤、自動セルカウンター
- トリパンプルー等
- PBS (-) (富士フィルム和光純薬 164-23551)

4. 心筋細胞の解凍フロー

図 1 解凍方法



5. プレートのコート - 96 well plate (低面積：約 34 mm²)

- 5.1 **CarmyA®播種用培地-TB** を解凍して調製する。(3 ページを参照)
コートするウェルの目安：1×10⁶ cells/1 本あたり 16-30 ウェル
- 5.2 0.1%の Fibronectin 溶液を 5.1 の **CarmyA®播種用培地-TB** で 100 倍希釈し、96 ウェルプレート 1 ウェル対して 100 μL を添加して、37°C 5% CO₂ インキュベーターで 1 時間または室温で 3-4 時間静置する。使用しないウェルには PBS またはミリ Q 水をいれておく。コート後、コート剤は抜かずに細胞播種に使用する。

6. 心筋細胞の解凍

- 6.1 **CarmyA®播種用培地-2TM** を解凍して調製する。(3 ページを参照)
- 6.2 15 mL 遠沈管に **2TM 専用サプリメント** を添加した **CarmyA®播種用培地-2TM** を 8 mL とり、ROCK inhibitor (Y-27632, Ri) を 20 μM になるように添加し、ピペッティングにより混和する。これを**解凍播種培地**とし、室温に戻して使用する。
- 6.3 プレコートしておいた 96 ウェルプレートをインキュベーターから出し、15 分程度静置して室温に戻す。
- 6.4 凍結心筋シングル細胞が入った 1 本のクライオチューブを 37°C のウォーターバスで 3 分間温め、解凍する (3 分以上は温浴しない)。クリーンベンチ内で、1000 μL チップを用いて、クライオチューブから細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管にゆっくりと移す。
注意：ピペッティングは行わない。
- 6.5 用意した**解凍播種培地** 1 mL を 1 滴/5 秒の速度で 50 mL チューブの細胞懸濁液に添加し、緩やかに振り混ぜる。
- 6.6 再度 1 mL の**解凍播種培地**を 1 滴/2 秒で加え緩やかに振り混ぜる。
- 6.7 細胞懸濁液からセルカウントを行う。細胞が沈降するため、6.6 で細胞懸濁液を振り混ぜた後、速やかにカウントを行う。
Note: 生細胞密度はおよそ 0.3-1×10⁶ cells/mL 又は 0.3-1×10⁷ cells/mL ほどになる。
- 6.8 適量の**解凍播種培地**を 1 滴/秒で加え緩やかに振り混ぜ細胞密度を調整する。
Note: 推奨細胞濃度は 6×10⁴ cells / 100 μL
- 6.9 細胞懸濁液を緩やかに 2-3 回ピペッティングで混和し、6.3 のプレートに 100 μL

添加して播種する。

注意：プレートのプレコート液は除かずに細胞懸濁液を添加する。

- 6.10. 細胞接着の偏りをなくすため、クリーンベンチ内で15分間静置したのち、細胞を揺らさないようにゆっくりと37°Cの5% CO₂ インキュベーターに移す。
- 6.11. 播種した翌日、**CarmyA®維持用培地UG**を解凍して調製する。(3ページを参照) 必要量を分取して37°Cに温める。(必要量 100 µL/well)
- 6.12. プレートの培地を150 µL 除き、6.11 の培地を100 µL/well 添加する。
- 6.13. 以降は2-3日ごとに、培地130 µL を除き、6.11 で調製した **CarmyA®維持用培地UG** を130 µL 加える。(培地は必要量を分取して37°Cに温めて使用する。)