

Laminin-521 上での ES/iPS 細胞の培養方法

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。英文マニュアル

(http://www.veritastk.co.jp/attached/5197/instructions-bl001_003_004_Laminin521.pdf) もご確認下さい。

内容:

コード No.	品名	梱包単位
BLA-LN521-02	Human recombinant laminin 521	100 ug
BLA-LN521-03	Human recombinant laminin 521	1 mg
BLA-LN521-04	Human recombinant laminin 521	5 mg

操作方法:

コーティング手順

1. ラミニンを 2-8℃でゆっくりと溶かします。この「ラミニンストック溶液」(100 ug/mL) は 2-8℃、無菌状態で 3 ヶ月保存可能です (-20℃では 2 年保存可能です)。ただし凍結融解の繰り返しは避けてください。
2. ラミニンストック溶液を 1 x DPBS (Ca²⁺/Mg²⁺) で 5-10 ug/mL に希釈し「ラミニン希釈溶液」とします。ラミニン希釈溶液を細胞培養用容器に 0.5-2 ug/cm²で添加します (Table.1, Table.2 参照)。
 - Ca²⁺/Mg²⁺を含む DPBS をご使用下さい。二価イオンはタンパク構造と機能に重要です。
 - プラスチック製容器のうち Falcon, Sarstedt, Corning での結果が比較的良いことが分かっています。
 - ガラス製容器もコーティング可能です。
3. ラミニン希釈溶液が容器表面全体に均一に広がったことを確認します。
4. 2-8℃、一晚 (または 37℃、2 時間) インキュベートして容器をコーティングします。
 - 2-8℃、一晚のインキュベートを強くお勧めします (信頼性が高い)。
 - コーティング後の容器とラミニン希釈溶液は 2-8℃、無菌状態で 4 週間保存可能です。蒸発とコンタミネーション防止のため、パラフィルムなどでシールして下さい。また、液が少なくなったら 1 x DPBS (Ca²⁺/Mg²⁺) を追加して下さい。ラミニンは乾燥すると不活化してしまいます。
5. 細胞培養に使用する際には、容器からラミニン希釈溶液をピペットで除去し、任意の培地を加えます。
 - ラミニンコートした容器を洗浄する必要はありません。

継代手順

下記は 6 ウェルプレートの場合です。ご使用容器のサイズに合わせて量を調整して下さい。

1. ラミニンでコーティングしたウェルの表面を乱さないように注意深くラミニン希釈溶液を除去し、ただちに新鮮な培地を 1 mL/ウェル加えます。37℃、5% CO₂の下で平衡化します。
2. 細胞が 60%以上コンフルントになったウェルから培地を除去し、1 x DPBS (Ca²⁺/Mg²⁺不含) で穏やかに洗浄します。
 - 二価イオンが解離酵素を阻害することがあるため、Ca²⁺/Mg²⁺不含のDPBSをご使用ください。
3. 任意の酵素 (TrypLE™など) を 1 mL/ウェル加え、37℃、3 - 5分インキュベートします。
 - インキュベート時間は細胞株、解離試薬の種類に依存します。
 - 信頼性の高い継代方法として、酵素でシングルセル化することを推奨しますが、酵素フリー (EDTAなど) での解離も可能です。
 - 解離酵素での処理が長すぎたり、機械的な力が加わりすぎると細胞の生存率に影響することがあります。
4. 解離液を除去し、37℃の新鮮な培地を 1 mL/ウェル加えます。穏やかに 6-10回ピペッティングしてシングルセルサスペンションにします。
 - 顕微鏡下でシングルセルへの解離を確認し、過度な機械的刺激を避けてください。
5. コニカルチューブに細胞懸濁液を回収します。
6. 室温 (15-25℃) で 100 x g、4分間遠心し、上清を除去します。
7. 37℃の新鮮な培地 1-2 mL/ウェルをペレットに加え再懸濁します。

- 多くの市販培地（例：mTeSR™ 1, TeSR™ 2, TeSR™-E8™）で実績があります。
 - 培地の移行が必要な場合、新しい培地の割合を徐々に増やしてください。培地とマトリックスの同時変更はお薦めできません。マトリックスをLaminin-521に移行してから、培地を移行するのがおすすめです。
8. 細胞数をカウントし、**30,000-50,000 cells/cm²**の密度になるように1:10から1:30の比率で細胞を播種します。
- 最低で5,000 cells/cm²まで生存をサポート可能ですが、最適播種密度は細胞株ごとに異なります。
 - 他のフィーダーフリーマトリックス（Matrigelなど）から移行する際は、最初の数継代は24-ウェルや48-ウェルを使用し、高密度（50,000-100,000 cells/cm²）で播種して馴化させることを推奨します。
9. 細胞が均一に分布するように穏やかにプレートをゆすり、インキュベーター（37℃、5% CO₂）に入れます。
10. 次回の継代まで毎日培地交換を行います。継代の24時間後は培地を数滴加えるだけにします。48時間後には培地を完全に交換します。
- 細胞が60%以上コンフレントになったら継代可能です。
 - 多くの細胞株では最適条件下で4-6日以内にコンフレントに達し、10-25倍増殖します。下図は単層培養の様子です（他のマトリックスの様なコロニー形成をしません）。



Table.1 初回および馴化時に推奨されるラミニンコーティング密度と使用量

培養容器	ラミニンコーティング密度 (ug/cm ²)	ラミニン希釈溶液の濃度 (ug/mL)	ラミニン希釈溶液の使用量 =①+②	ラミニンストック溶液 (100 ug/mL) の使用量 =①	1 x DPBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺) の使用量 =②
6 ウェルプレート	0.9	10	1000 uL/ウェル	100 uL/ウェル	900 uL/ウェル
12 ウェルプレート	1.02	10	500 uL/ウェル	50 uL/ウェル	450 uL/ウェル
24 ウェルプレート	1.09	10	300 uL/ウェル	30 uL/ウェル	270 uL/ウェル
48 ウェルプレート	0.98	10	150 uL/ウェル	15 uL/ウェル	135 uL/ウェル
96 ウェルプレート	0.93	10	70 uL/ウェル	7 uL/ウェル	63 uL/ウェル
T-25cm ² フラスコ	1.09	10	3000 uL/フラスコ	300 uL/フラスコ	2700 uL/フラスコ
T-75cm ² フラスコ	1.02	10	8000 uL/フラスコ	800 uL/フラスコ	7200 uL/フラスコ

Table.2 ルーチン使用時に推奨されるラミニンコーティング密度と使用量（最適条件は細胞株によって異なります）

培養容器	ラミニンコーティング密度 (ug/cm ²)	ラミニン希釈溶液の濃度 (ug/mL)	ラミニン希釈溶液の必要量 =①+②	ラミニンストック溶液 (100 ug/mL) の使用量 =①	1 x DPBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺) の使用量 =②
6 ウェルプレート	0.45	5	1000 uL/ウェル	50 uL/ウェル	950 uL/ウェル
12 ウェルプレート	0.51	5	500 uL/ウェル	25 uL/ウェル	475 uL/ウェル
24 ウェルプレート	0.55	5	300 uL/ウェル	15 uL/ウェル	285 uL/ウェル
48 ウェルプレート	0.49	5	150 uL/ウェル	7.5 uL/ウェル	142.5 uL/ウェル
96 ウェルプレート	0.46	5	70 uL/ウェル	3.5 uL/ウェル	66.5 uL/ウェル
T-25cm ² フラスコ	0.55	5	3000 uL/フラスコ	150 uL/フラスコ	2850 uL/フラスコ
T-75cm ² フラスコ	0.51	5	8000 uL/フラスコ	400 uL/フラスコ	7600 uL/フラスコ

注意事項

- ◆ 本プロトコルはあくまで一般的なものですので、場合により最適化が必要となります。
- ◆ ラミニンストック溶液（100 ug/mL）の凍結融解繰り返しは避けてください。解凍した後に一回分ずつ分注して、-20℃保存すると良いでしょう（2年保存可能）。
- ◆ コーティングした容器とラミニン希釈溶液は2-8℃で4週間保存可能です。
- ◆ ラミニンのマトリックスは乾くと不活化してしまうため、ウェルが常に乾かないようご注意ください。
- ◆ 本プロトコルでうまくいく場合、**週末培地交換不要のウィークエンドフリープロトコル**への変更も可能です。詳しくは、<http://www.veritastk.co.jp/news.php?id=808>よりご覧ください。

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14 住友東新橋ビル3号館5階
 TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076
 技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail techservice@veritastk.co.jp