

mTeSR™ Plus <簡易マニュアル>
ヒト ES/iPS 細胞の継代 (6-well プレートから 6-well プレートへ)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

【対象製品】

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
ST-05825	mTeSR™ Plus	500 mL	冷蔵/冷凍	冷蔵/冷凍

【準備するもの】

細胞

- 至適なコンフルエントに達した、ヒト ES/iPS 細胞

試薬

- Matrigel (Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, ST-07181)、Vitronectin XF (ST-07180) または、Human recombinant laminin 521 (BLA-LN521-02)
- ReLeSR (ST-05872)
- D-PBS (Without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) (ST-37350)
- 維持培養培地 mTeSR Plus (ST-05825)
- DMEM/F-12 with 15mM HEPES (ST-36254)

物品

- 6-well プレート Non-tissue culture-treated 6-well plates* (例えば、ST-27147 又は ST-38040)、Tissue culture-treated cultureware** (例えば、ST-38016 (6-well plates))
- 15/50 mL コニカルチューブ
- ピペット

*Vitronectin XF をご使用の場合にご使用ください。

**Matrigel 又は Human recombinant laminin 521 をご使用の場合にご使用ください。

【手順】

1. 培地の準備

mTeSR Plus 5X Supplement を、室温 (15 - 25°C) または 2 - 8°C で一晩解凍する。室温まで温め、十分に混ぜる。100 mL の mTeSR Plus 5X Supplement を、400 mL の mTeSR Plus Basal Medium に添加し、十分に混ぜる。

2. プレートのコーティング

継代の少なくとも 1 時間前に、新しいプレートを Matrigel® または Vitronectin XF でコーティングする。あるいは、少なくとも一晩 (または 2 時間) 前に Human recombinant laminin 521 でコーティングする。

2.1 Matrigel コーティング手順

注：組織培養処理 (tissue culture-treated) 6-well プレートを使用する。

1. 1 回分の Matrigel® を氷上で解凍する。
2. 24 mL の冷 DMEM/F-12 with 15 mM HEPES を、50 mL コニカルチューブに分注し氷上に静置する。
3. 融解した Matrigel® を冷 DMEM/F-12 (50 mL チューブ内) に加えてよく混ぜる。必要なら、バイアルを冷培地で洗浄してもよい。
4. すぐに 1 mL/ウェルの希釈した Matrigel® 溶液を使用して、組織培養処理 6-well プレートをコートする。
5. プレートを回転させて、Matrigel® 溶液を表面全体に均一に広げる。
6. 使用前に少なくとも 1 時間室温 (15 - 25°C) でインキュベートする。Matrigel® 溶液を蒸発させない。
7. プレートを片側に静かに傾け、余分な Matrigel® 溶液を端に集める。血清用ピペットまたは吸引に

より、余分な溶液を取り除く。コート面に傷がないことを確認する。

8. mTeSR Plus を直ちに添加する (6-well プレーツの場合ハ 2 mL/ウェル)。

2.2 Vitronectin XF コーティング手順

注：非組織培養処理 (non-tissue culture-treated) 6-well プレーツを使用する。

1. Vitronectin XF を室温 (15 - 25°C) で解凍する。
2. CellAdhere Dilution Buffer で Vitronectin XF を希釈し、最終濃度が 10 µg/mL になるようにする (すなわち、1 mL の CellAdhere Dilution Buffer あたり 40 µL の Vitronectin XF を使用)。希釈には 50 mL のポリプロピレンコニカルチューブを使用する。
3. 希釈した Vitronectin XF をおだやかに混ぜる。ボルテックスしない。
4. すぐに 1 mL/ウェルの希釈した Vitronectin XF 溶液を使用して、非組織培養処理 6-well プレーツをコートする。
5. プレーツを前後にゆっくり揺らし、Vitronectin XF 溶液を表面全体に均一に広げる。
6. 使用前に少なくとも 1 時間室温 (15 - 25°C) でインキュベートする。Vitronectin XF 溶液を蒸発させない。
7. プレーツを片側に静かに傾け、余分な Vitronectin XF 溶液を端に集める。血清用ピペツまたは吸引により余分な溶液を取り除く。コート面に傷がないことを確認する。
8. CellAdhere Dilution Buffer を使用してプレーツを 1 回洗浄する (6-well プレーツの場合ハ 2 mL/ウェルを使用)。
9. 洗浄液を吸引し、mTeSR Plus を添加する (6-well プレーツの場合ハ 2 mL/ウェル)。

2.3 Laminin-521 (Human recombinant laminin 521) コーティング手順

注：組織培養処理 (tissue culture-treated) 6-well プレーツを使用する。

1. Laminin-521 を 2 - 8°C で解凍する。
2. D-PBS (With Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) で Laminin-521 を希釈し、最終濃度が 5 - 10 µg/mL になるようにする。
3. 希釈した Laminin-521 をおだやかに混ぜる。ボルテックスしない。
4. すぐに 1 mL/ウェルの希釈した Laminin-521 溶液を使用して、組織培養処理 6-well プレーツをコートする。
5. プレーツを前後にゆっくり揺らし、Laminin-521 溶液を表面全体に均一に広げる。
6. 使用前に一晩、2 - 8°C でインキュベートする。より速くする必要がある場合は、少なくとも 2 時間、37°C でインキュベートする。Laminin-521 溶液を蒸発させない。
7. Laminin-521 溶液を吸引する。洗浄は不要。
8. mTeSR Plus を直ちに添加する (6-well プレーツの場合ハ 2 mL/ウェル)。

3. 継代

ReLeSR によるヒト ES/iPS 細胞塊の継代

ReLeSR は、ヒト ES/iPS 細胞を細胞塊として解離および継代するための酵素フリー試薬です。分化した領域の手動選択や、スクレイパーによる細胞塊の除去は必要ありません。

ReLeSR による継代のビデオマニュアル

https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/Movie_2_126.html

以下の手順は、6-well プレーツの 1 つのウェルから細胞を継代するためのものです。他の培養器具を使用する場合は、サイズに応じ容量を調整してください。

1. 十分な量の mTeSR Plus を分注し、室温 (15 - 25°C) まで温める。
注：mTeSR Plus を 37°C のウォーターバスで温めない。
2. 細胞を 1 mL の D-PBS (Without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺) で洗浄し、吸引する。
注：分化細胞の領域を除去する必要はありません。
3. 1 mL の ReLeSR を加え、1 分以内に吸引する。コロニーが液体の薄い層にさらされるようにする。

4. 37°Cで6~8分間インキュベートする。
注：最適な解離時間は、使用する細胞株によって異なるので、細胞株を初めて ReLeSR で継代するときは、最適な解離時間を決定するようにしてください。
5. 1 mL の mTeSR Plus を加える。
6. プレート用ボルテックスミキサー（例：Multi-MicroPlate Genie、120 V、Scientific Industries Model SI-4000、1200 rpm）上に室温で2~3分間置いてコロニーを剥離する。あるいは、片手でプレートを持ち、もう片方の手でプレートの側面をおよそ30~60秒間強く叩いてコロニーを剥離する（上記ビデオマニュアル参照）。
7. 5 mL 血清用ピペットを使用して、剥離した細胞凝集体を15 mL コニカルチューブに移す。細胞塊はプレーティングに適した大きさ（平均で約50 - 200 μm）になっているはずである。
注：チューブに移さずウェルから直接細胞塊をプレーティングする場合、5 mL ピペットを使用して細胞塊の溶液を上下に1回ピペッティングする。これにより、残存している可能性のある大きな塊を確実に破碎できます。
8. mTeSR Plus を入れたコーティング済みのウェルに、細胞塊を目的の密度でプレーティングする。コロニーが最適密度にある場合、培養物は4~7日毎に1:10 から1:50 の分割比で継代できる（すなわち、1ウェルからの細胞塊を10~50ウェルに播種できる）。コロニーの密度が高すぎるか低すぎる場合は、次の継代時にそれに応じて分割比を調整する。
9. プレートを37°Cのインキュベーターに入れる。プレートを素早く前後左右に数回動かし、細胞塊を均一に分布させる。プレートは24時間動かさない。
注：細胞塊の不均一な分布は、ヒト ES/iPS 細胞の分化を増加させる恐れがあります。
10. 必要に応じて mTeSR Plus の培地交換を行い、次の継代時まで培養状態と増殖を観察する。培地は毎日または一日おきに交換する。2日間連続して培地交換をスキップするには、2倍量の培地を加える。

mTeSR Plus のフレキシブルな培養スケジュール例

月	火	水	木	金	土	日
継代	—	培地交換 (F)	—	培地交換(2F)	—	—

F：1倍量で培地交換、2F：2倍量で培地交換

mTeSR Plus 培地交換のルール：

2F の場合、培地交換を2日連続でスキップが可能です。F の場合、培地交換を1日スキップが可能です。このルールに従って、ご自身のフレキシブルな培養スケジュールを作成してください。

【その他】

- Single-cell passaging による継代
単一細胞まで解離して播種する single-cell passaging は遺伝的異常を引き起こす可能性があるためおすすめできかねます。上記でご紹介しているように、細胞塊の状態に解離して播種する clump passaging が適しています。Single-cell passaging から clump passaging への移行方法は、補足マニュアルをご参照ください。
- 英語版完全マニュアル
<https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/10000005507-Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSR Plus.pdf? ga=2.261715085.1691892708.1570496080-2012799662.1559521005>