

## 凍結ストックの解凍

### 【準備するもの】

#### 細胞

- iPS細胞の凍結バイアル

#### 試薬

- iMatrix-511 (Laminin-511 E8)
- 10 mM Y-27632
- PBS (-)
- 維持培養培地 StemFit®培地 (AK03NもしくはAK02N)

#### 物品

- 6-well プレート
- 15/50 mL コニカルチューブ
- ピペット
- 広口チップ

### 【手順】

#### I. 培地の準備

必要量のStemFit®培地に培地の1/1000量の10 mM Y-27632を加えておく（最終濃度10 $\mu$ M）（以下、StemFit+Yとする）。

#### II. プレートのコーティング

1. PBS (-)で3.2  $\mu$ g/mLに希釈したLaminin-511 E8溶液を、コートするウェルに1.5 mLずつ入れる。コート量は4.8  $\mu$ g/well (0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) となる。  
\*まず、必要量のPBS (-)を50 mLチューブなどに入れ、そこに3.2  $\mu$ g/mLになるようにLaminin-511 E8を加え、すぐによく混ぜた後、すみやかに各ウェルに1.5 mLずつ分注する。
2. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで60 min以上反応させる。
3. 反応後インキュベーターから取り出す。
4. StemFit®培地を0.75 mL/wellずつ加え良くなじませる。
5. 上清を除去する。
6. StemFit+Yを1.5 mL/well加え、15 min以上（最長で60 min）インキュベーターに入れておく。

#### III. 融解

1. ウォーターバスを37°Cに温めておき、培地を室温に戻しておく。
2. 15/50 mL コニカルチューブに5 mLのStemFit+Yを入れる。

3. 液体窒素タンクからiPS細胞の凍結バイアルを取り出し、ウォーターバスで素早く解凍する（氷塊が少し残っている程度の状態で）。
4. ステップ3 の細胞懸濁液を15/50 mL コニカルチューブに広口チップを用いて移す（ピペッティングは1, 2回程度）。
5. 800 rpm（160 x g）、22°C、5 minで遠心する。
6. 上清を取り除く。
7. ペレットをタッピングで崩し、細胞測定に適量のStemFit®培地（0.2～1mL）を加える。
8. セルカウントを行う。
9. Laminin-511 E8コーティングした6-wellプレート 1 wellに65,000個の生細胞を播種する。
10. 細胞が均一になるようにプレートを揺らす（細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレートを揺らし均一に広げる）。
11. 37°C、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで培養する。
12. 翌日、Y-27632を加えていないStemFit®培地に交換する。

\* 培地交換は解凍翌日、それ以降は細胞密度が低いときは隔日もしくは2日おき、細胞密度が高いときは毎日培地交換を行うことが望ましい。細胞の継代は7日±1日を目途に行う。下記表に弊社における培地交換スケジュール例を示す。

\* 弊社における201B7株<sup>1), 2)</sup>の培養スケジュール例

| WED | THU  | FRI  | SAT | SUN | MON  | TUE  |
|-----|------|------|-----|-----|------|------|
| 解凍  | 培地交換 | 培地交換 | —   | —   | 培地交換 | 培地交換 |

#### 【参考・参考文献】

- 1) Takahashi K, et al. *Cell*, 2007 Nov.30; 131(5): 861-72.
- 2) Nakagawa M, et al. *Scientific Reports* 4: 3594 (2014)
- 3) 京都大学 iPS 研究所 (CiRA) HP : 「フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立および維持培養」  
[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hipsprotocolFf\\_140311.pdf](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hipsprotocolFf_140311.pdf)