

ヒト多能性幹細胞用増殖制御基礎培養液
Xyltech BOF-01

使用説明書

Ver. 4.4

2017, Oct

BOURBON Biomedical Advanced Research Laboratories, Inc

Xyltech BOF-01 を用いたヒト iPS 細胞増殖制御培養プロトコール

1. 商品特徴

本製品はヒト多能性幹細胞をオンフィーダー培養条件下で未分化性を維持した状態で増殖を抑える、新しいコンセプトの研究用基礎培養液です。ヒト多能性幹細胞用調製培養液(ヒト ES 培養液)の基礎培養液(DMEM/F12 等)と完全置換して使用できます。通常の培養環境(37°C、5% CO₂)で 3 日間程度の維持が可能です。本製品による増殖制御培養後にヒト ES 培養液へ変更することにより増殖を再開し実験に用いることができます。本製品はグルコースを含有しません。

2. 注意事項

本製品はヒト多能性幹細胞のオンフィーダー培養用基礎培養液です。フィーダーフリー条件下ではご使用になれません。また、本製品は研究用試薬です。ヒトや動物の治療・診断目的ではご使用になれません。

3. 調製方法

本製品 BOF-01 をオンフィーダー用ヒト ES 培養液の基礎培養液と完全置換をして使用してください。調製培養液の組成につきましては [4-1. 細胞及び試薬の組成例](#)及び [7. 参考文献](#)をご参照ください。

4. 使用方法

4-1. 細胞及び試薬

- ・オンフィーダー培養条件のヒト iPS 細胞(60mm dish)
- ・Mitomycin-C(MMC)処理済 MEF 細胞(60mm dish)
- ・Xyltech BOF-01
- ・DMEM/F12
- ・KnockOut Serum Replacement (KSR)
- ・Non-Essential Amino Acids solution (NEAA)
- ・L-Glutamine
- ・2-Mercaptoethanol
- ・Penicillin/Streptomycin
- ・D-PBS(-)
- ・霊長類 ES 細胞用剥離液(CTK 液)

※ヒト ES 培養液及び BOF-01 調製培養液の組成例

DMEM/F12 もしくは BOF-01, 20% KSR, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-Glutamine, 0.1 mM 2-Mercaptoethanol, 50 units/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 4 ng/ml bFGF.
--

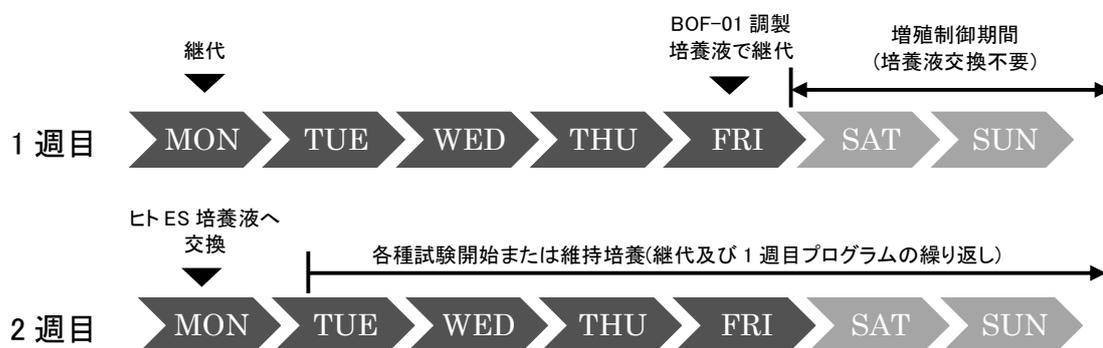
4-2. ヒト iPS 細胞コロニーの増殖制御

1. 組成例に従い BOF-01 調製培養液を調製し、37°Cのウォーターバスで温める。
2. 継代後 1~3 日目程度のコロニーサイズが小さいヒト iPS 細胞を選び、培養上清を除去し、BOF-01 調製培養液を 5 ml 加えて培地交換を行う。
3. 37°C、5% CO₂インキュベータへ戻し、最長 3 日間まで培地交換をせずに培養する。
4. BOF-01 調製培養液で培養後はヒト ES 培養液に戻し、一晩培養する。
5. 翌日、位相差顕微鏡で細胞コロニーの緻密な形態を観察する。
※細胞密度が高い場合、培地交換をせずに培養を継続すると浮遊細胞が増える場合があります。その場合、3 日未満であっても BOF-01 調製培養液で培地交換を行うことをお勧めします。

4-3. ヒト iPS 細胞の継代及び増殖制御（ウィークエンドフリー培養法）

1. BOF-01 調製培養液、D-PBS(-)、霊長類 ES 細胞用剥離液を 37°Cのウォーターバスで温める。
2. コンフルエントに達したヒト iPS 細胞を選び、培養上清を除去する。
3. D-PBS(-) 2 ml を加えて洗浄し、D-PBS(-)を除去する。
4. 剥離液 0.5 ml を加えて 37°Cで 2~5 分間インキュベートする。
5. 剥離液を除去し、D-PBS(-) 2ml を加えて洗浄し、D-PBS(-)を除去する。
6. BOF-01 調製培養液を 2~4 ml 加え、数回ゆっくりとピペティングを行い、ディッシュからコロニーを剥がし、20-30 細胞程度の Clump にする。
7. MMC 処理済み MEF 細胞をインキュベーターから取り出し、培養上清を除去し、BOF-01 調製培養液に懸濁したヒト iPS 細胞を 5 ml (通常 1:4)を播種する。ディッシュを揺らして細胞が均一に播種されるようにする。
8. 37°C、5% CO₂インキュベーターで 3 日間培地交換せずに培養する。
9. 3 日後、増殖制御されたヒト iPS 細胞を取り出し、ヒト ES 培養液で培地交換を行う。
10. 翌日、位相差顕微鏡で観察を行い、分化傾向のあるコロニーについてはマーキングし、吸引除去を行う。ヒト ES 培養液へ交換後は、毎日培地交換を行い、通常は培養期間 4~5 日毎に 1:3~1:5 で継代する。

※実施例として以下にウィークエンドフリー培養法のスケジュールを示す。

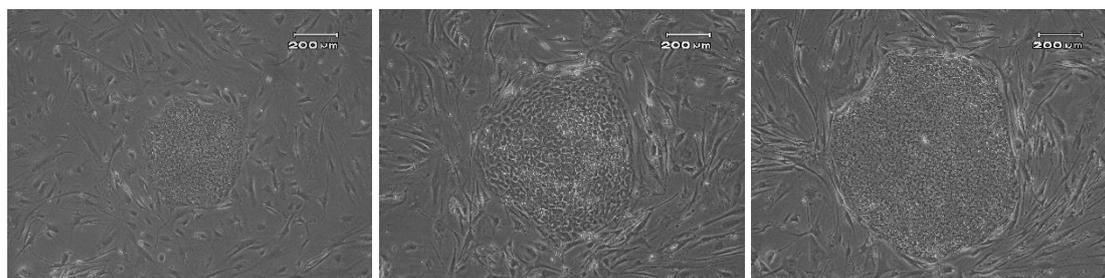


* 通常維持培養したヒト iPS 細胞を金曜日午後に BOF-01 調製培養液を用いて継代培養を行います。土・日曜日は培地交換せずにそのまま培養を継続し、月曜日午前ヒト ES 培養液へ培地交換を行います。

* 継代のタイミングは細胞の増殖状況等に応じて調製をしてください。

5. 参考情報

BOF-01 調製培養液で増殖制御したヒト iPS 細胞は、コロニー状態（緻密性等）が変化する場合がありますが、ヒト ES 培養液に変更後、元の状態に戻ります(写真/201B7 株)。



(通常培養時)

(増殖制御培養時)

(増殖制御培養後 24hr)

6. 参考文献

- 1) Curr Protoc Stem Cell Biol. 2009 Jun; Chapter 4: Unit 4A.2.
- 2) 京都大学 iPS 研究所(CiRA)HP 公開プロトコール; 改訂プロトコール Ver. 2
“Generation of Human induced Pluripotent Stem Cells”
https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/img/protocol/hipsprotocolv2_090304.pdf

7. 製品に関するお問い合わせ先

株式会社ブルボン再生医科学研究所
新潟県柏崎市駅前一丁目3番1号
TEL: 0257-23-2769 E-mail: support@bourbon-barl.co.jp

* プロトコールは実施例に基づいています。細胞株によって播種密度、継代タイミングなどを調整してください。このプロトコールは研究目的用です。