

DynaLux/c SOP

1 [目次](#)

2	培養スケジュール	2
3	必要試薬・器具	2
4	実験手順	3
4.1	iPS 細胞の培養	3
4.1.1	Geltrex コーティング	3
4.1.2	StemFlex Medium の調製	4
4.1.3	Y-27632 の調製	4
4.1.4	起株	4
4.1.5	継代	5
4.1.6	培地交換	6
4.1.7	細胞凍結	7
4.2	化学物質添加濃度の決定	8
4.2.1	化学物質のストック調整	8
4.2.2	溶解度試験	8
4.2.3	細胞毒性試験	8
4.3	DynaLux/c	10
4.3.1	bFGF の調製	10
4.3.2	DynaLux/c	10

作成：溝田 華柊、大久保 佑亮

2 培養スケジュール

曜日	月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日
維持	継代 3.0×10^5 cells/well	培地交換		継代 1.0×10^5 cells/well	培地交換 (double feed)		
試験①	播種 2.0×10^4 cells/well	培地交換		培地交換 (APEL2)	シグナル かく乱試験		
試験②	シグナル かく乱試験			播種 2.0×10^4 cells/well	培地交換		培地交換 (APEL2)

3 必要試薬・器具

【試薬】

- FGF-SRF シグナルレポーター細胞 (201B7 由来, 理研 BRC CiRA)
- Sterile Water, Endotoxin Free (11039-021, Thermo Fisher Scientific)
- DMEM/F-12, HEPES, no phenol red (196-15645, FUJIFILM Wako)
- Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (A1413202, Thermo Fisher Scientific)
- StemFlex™ Medium (A3349401, Thermo Fisher Scientific)
- CultureSure® Y-27632 (036-24023, FUJIFILM Wako)
- PBS (-) (166-23555, FUJIFILM Wako)
- Culture Sure DMSO (036-24023+D9, FUJIFILM Wako)
- TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red) (12563011, Thermo Fisher Scientific)
- STEMdiff™ APEL™2 Medium (ST-05275, STEMCELL Technologies)
- Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate (N2571, Promega)
- Human Heat Stable bFGF Recombinant Protein (PHG0367, Thermo Fisher Scientific)
- Cell Counting Kit-8: CCK-8 (CK04, Dojindo)
- STEM-CELLBANKER® GMP grade (CB045, ZNQ)

【装置・器具】

- #1 Tissue Culture Plate VTC-P6 : VIOLAMO (2-8588-01, AS One)
- 96 Well White/Clear Bottom Plate, TC Surface (165306, Thermo Fisher Scientific)
- Breathe-EASIER (BERM-2000, TOHO)
- #1 微量保存用 8 連チューブ 0.1mL アンバー 2D コード付き (PCR-8SAC-FC-1-X-BC, AGB)

- ・ #1 防水フリーズボックス 0.2ml×196 穴 (F-02-118-K, フリーエス)
- ・ #1 ラボピタ (65-1681-93, AS One)
- ・ #2 ClipTip 300, Filtered, Sterile, Rack (94420513, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 ClipTip 50, Filtered, Sterile, Rack (94420253, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 F1-ClipTip™ Multichannel Pipettes, 30 to 300 µL (4661180N, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #2 F1-ClipTip™ Multichannel Pipettes, 5 to 50 µL (4661160N, Thermo Fisher Scientific)
- ・ #1 リザーバー 1 レーン 25ml 滅菌済 (BM-0850-1, BMBio)
- ・ #3 多検体生細胞リアルタイム発光測定装置、WSL-1563 KronosHT (ATTO)
- ・ #1 自動セルカウンター、Countess 3 FL (Invitrogen)
- ・ #1 Countess™ Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen)
- ・ #1 低速遠心機、Centrifuge 5702 R (Eppendorf)
- ・ #1 マルチラベルリーダー、ARVO-X4 (PerkinElmer)
- ・ #1 アルミマット保温装置、HIENAI Mat 01R (COSMO BIO)
- ・ #1 アルミブロック保温装置、HIENAI Tube Warmer GX01 (COSMO BIO)

#1 代替品で対応可能。

#2 代替品でも対応可能だが、Clip Tip を使用すると安定する。

#3 代替品の WSL-1565 Kronos HT でも可能。今後の多色化を見据えるとマルチカラー測定のできる WSL-1563 KronosHT が好ましい。

4 実験手順

4.1 iPS 細胞の培養

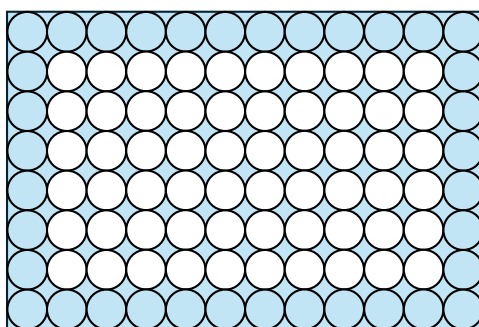
4.1.1 Geltrex コーティング

- 1) Geltrex を冷凍庫から取り出し、氷上で解凍する。
- 2) Geltrex コーティングを行わない well と、96 well プレーットの外周にあたる 36 well、well 間の溝に湿度維持のために Sterile Water を以下の容量で入れる。
6 well プレート: 1.5 mL
96 well プレート外周と well 間の溝: 100 µL/well
96 well プレート well 間の四隅の溝: 60 µL/well
- 3) 冷蔵庫から取り出した DMEM/F-12 と氷上で解凍した Geltrex を 100 : 1 で混合し、以下の容量で Geltrex 溶液を加える。Geltrex は 15℃以上でゲル化が始まってしまうため、DMEM/F-12 と Geltrex の混合溶液は温まらないように氷上に置いて操作を行う。
35 mm ディッシュおよび 6 well プレート: 1.5 mL/well
12 well プレート: 600 µL/well
24 well プレート: 300 µL/well
48 well プレート: 150 µL/well

96 well プレート: 60 μ L/well

- 4) 培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで1時間以上静置する。
- 5) 培養プレートの外周にパラフィルム（テープ状のものだとやりやすい）を巻いて、使用するまで4°C冷蔵庫に移す。このとき、冷蔵庫に移したプレートは2週間以内に使い切る。
- 6) 使用する前に CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで20分以上静置する。

図1 Geltrex と Sterile Water の充填場所



白色に Geltrex、水色 Sterile Water を充填する

4.1.2 StemFlex Medium の調製

- 1) StemFlex Basal Medium 450 mL と StemFlex Supplement 50 mL とを混合する。
- 2) 使用前の再融解していないものは分注して-20°Cに保存可能。再融解したものは4°Cで保存し、2週間以内に使い切る。

4.1.3 Y-27632 の調製

- 1) Y-27632 5 mg を純水 1.477 mL に溶かし、10 mM の Y-27632 を調製する。
- 2) (分注し)-20°Cで保存する。

4.1.4 起株

- 1) Geltrex コート済みの培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°Cで20分以上静置し温める。
- 2) あらかじめ StemFlex Medium を 37°Cに加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。また、Y-27632 を冷凍庫から出し溶かしておく。以降の操作は培養プレートを HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 3) ストックチューブを液体窒素タンクから取り出し、StemFlex 1 mL を入れ、軽くピペッティングをして解凍する。
- 4) あらかじめ StemFlex Medium を 3 mL を入れた 15 mL チューブに細胞懸濁液を回収し、200×gで4分間遠心する。
- 5) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、StemFlex

Medium (+10 μ M Y-27632) 2 mL で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピペッティングは 5 回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。

- 6) Geltrex 溶液をアスピレーターで吸い、6 well プレートに細胞を全量播種する。
- 7) 翌日、継代から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium に培地交換する。

4.1.5 継代

- 1) Geltrex コート済みの培養プレートを CO₂ インキュベーター内に入れ、37°C で 20 分以上静置し温める。
- 2) あらかじめ StemFlex Medium を 37°C に加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。また、Y-27632 を冷凍庫から出し溶かしておく。以降の操作は培養プレートを HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 3) 培養プレートの培地を捨て、PBS (-) 2 mL で well を 1 回洗浄する。
- 4) TrypLE Select 1 mL を加えウェル全体になじませ、HIENAI Tube Warmer GX01 上で約 5 分間静置する。この間に 15 mL チューブに 4 mL の StemFlex Medium を準備しておく。
- 5) あらかじめ準備した 15 mL チューブに細胞懸濁液をピペッティングせずに回収した後、再度 15 mL チューブ内の培地 1 mL を培養プレートに入れ、残りの細胞を回収する。200 $\times g$ で 4 分間遠心する。
- 6) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、StemFlex Medium 2 mL で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピペッティングは 5 回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。
- 7) 細胞懸濁液の一部を採取し、トリパンブルーと 1:1 で混合して生細胞数を計測する。このときの細胞数の目安は 1 well あたり $0.9 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^6$ cells/mL。この範囲外のときは細胞の調子が万全でない可能性があるので試験を行うことを避ける。
- 8) Geltrex 溶液をアスピレーターで吸い、細胞懸濁液と StemFlex Medium (+10 μ M Y-27632) で培養プレートに以下の容量と細胞数で細胞を播種する。このとき 96 well プレートの播種にはマルチピペッターを用いる。(以下の細胞数で継代までに既定の細胞数まで増殖しない場合は 6 well プレートへの播種細胞数を倍にするなどして対応する。)

6 well プレート 2 mL

月曜日: 3.0×10^5 cells/well

木曜日: 1.0×10^5 cells/well

96 well プレート 200 μ L/well

月曜日: 2.0×10^4 cells/well

木曜日: 2.0×10^4 cells/well

- 9) 96 well プレートには湿度維持のため Breathe-EASIER を貼る。このとき、プレートからはみ出る部分はナイフでトリミングする。また、プレート側面や縁、蓋が濡れている場合はキムワ

イプなどでふき取ってから Breathe-EASIER を貼る

- 10) 翌日、継代から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium に培地交換する。

図2 継代直前の細胞密度

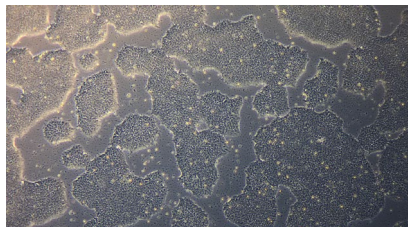
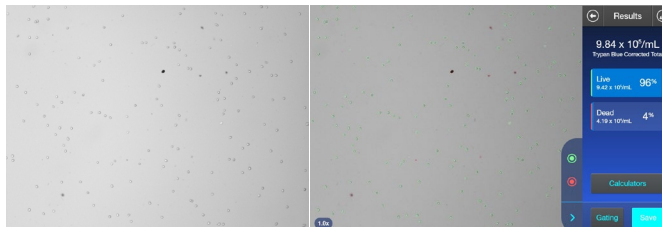


図3 TrypLE Select による細胞剥離時の状態



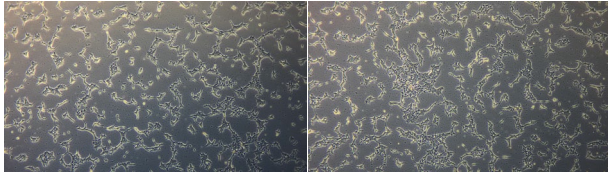
4.1.6 培地交換

- 1) あらかじめ StemFlex Medium (APEL2 Medium)を 37°Cに加温し、HIENAI Mat 01R、HIENAI Tube Warmer GX01 の電源を入れ温めておく。以降の操作は培養プレート を HIENAI Mat 01R 上に、StemFlex Medium などは HIENAI Tube Warmer GX01 上において温めながら行う。
- 2) プレート内の培地をアスピレーターで吸い、6 well プレートには StemFlex Medium を 2 mL、96 well プレートには StemFlex Medium を 200 μL /well 入れる。播種後 day3 の 96 well プレートには APEL2 Medium を 100 μL /well 入れる。このとき、APEL2 Medium に培地交換以降はあまり細胞が増殖しないため、この時点で 96 well プレートの細胞数が極端に少ない場合は試験を避ける。
- 3) 96 well プレートには湿度維持のため Breathe-EASIER を貼る。

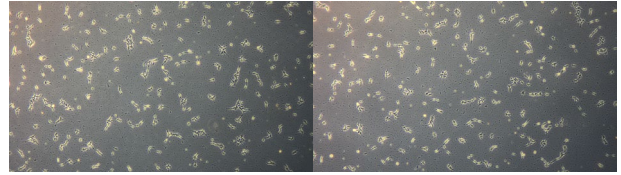
図4 それぞれのタイミングにおける細胞の様子

【6 well プレート】

火曜日



金曜日

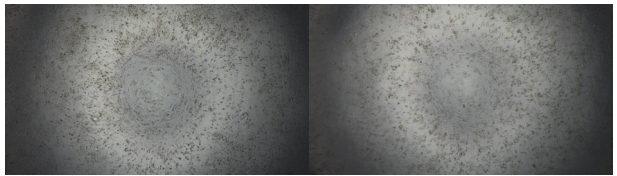


【96 well プレート】

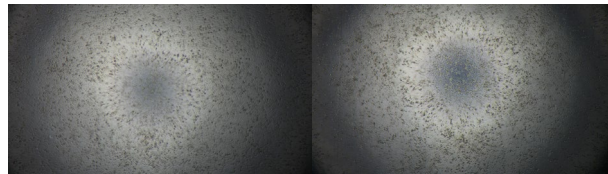
火曜日



木曜日

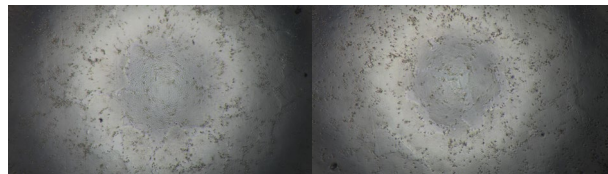


金曜日



【96 well プレート NG 例】

木曜日



4.1.7 細胞凍結

- 1) 生細胞数の測定まで、**4.1.5 継代**と同様の手順で行う。
- 2) ストックチューブ1本につき 1.0×10^5 cells となるように、ピペットエラーを考慮してストックする量+ α の細胞懸濁液を 15 mL チューブに入れ、 $200 \times g$ で4分間遠心する。
- 3) 上清をアスピレーターで吸い、タッピングして細胞ペレットを崩したのち、ストックチューブ1本につき 200 μ L となるように STEM-CELLBANKER で細胞を再懸濁する。このとき、タッピングで細胞ペレットを崩すことでピペッティングは5回程度にとどめて細胞へのダメージを減らす。
- 4) ストックチューブに細胞を懸濁した STEM-CELLBANKER を 200 μ L いれ、バイセルに入れた後、 -80°C フリーザーに入れる。

- 5) 24h 経過後、1~2 週間くらいまでを目安に液体窒素タンクへ移す。

4.2 化学物質添加濃度の決定

4.2.1 化学物質のストック調整

- 1) メーカーのデータシートを参考に PBS か DMSO の適切な溶媒を選択し、溶解可能な濃度でストックを調製する。
- 2) 凍結融解の繰り返しを防ぐために微量保存用 8 連チューブにそれぞれの化学物質を 50 μ L で分注して、防水フリーズボックスに入れ、-30°C で保存する。

4.2.2 溶解度試験

- 1) 溶媒に DMSO を使用している化学物質は水溶性が低いため、培地に溶解可能な濃度を確認する。各化学物質のストックを StemFlex Medium に 100 倍希釈し、析出するか目視にて確認する。溶解せず析出する場合はさらに薄い濃度に希釈する。
- 2) 一晩静置し、翌日に析出がないか確認する。

4.2.3 細胞毒性試験

- 1) **4.1.5 継代**の手順に従い、96 well プレートに細胞を 2.0×10^4 cells/well で播種する。(0day)
- 2) 翌日、播種から 24h 以上経過後にシングルセルでなくなっていれば、**4.1.6 培地交換**の手順に従い StemFlex Medium 200 μ L/well に培地交換する。(1day)
- 3) 播種後 3 日後に **4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 μ L/well に培地交換する。(3day)
- 4) 実験を行う前に細胞がコンフルエントになっていることを確認する。細胞に隙間があり、コンフルエントになっていないときは試験を避ける。
- 5) 化学物質の添加直前に、**4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 μ L/ml に培地交換を行う。(4day)
- 6) 水溶性の高い化学物質に関しては 1000 μ g/mL を上限に溶解可能な最大濃度が、水溶性の低い物質に関しては培地へ溶解可能な上限濃度が、添加前の最大濃度になるように APEL2 Medium で各化学物質の 2 倍希釈系列を 9 濃度分作製し、下図のように duplicate で 11 μ L/well ずつ添加する。(希釈系列作製には 8 連チューブと 1.5 mL チューブを用いた。8 連チューブの右端に最大濃度の化学物質を調製し、その他の部分には培地を入れておく。その後、右端のチューブから、他の部分に入れた培地量と同量の調整済み化学物質をとり、一つ左のチューブに入れピペッティングをして 1/2 に希釈する。その後希釈したチューブから同量を隣のチューブに入れてピペッティングという操作を繰り返して希釈系列を作成した。最後に同量の培地を入れた 1.5 mL チューブに一番低い濃度のものを同量入れ、9 濃度とした。また、

化学物質の種類が増えると希釈系列の作製が大変なため、一番濃度の低い 1.5 mL チューブ以外はマルチピペッターを用いて一度に複数の物質の希釈系列を作成した。) また、いずれの化学物質においても、溶媒である PBS または DMSO の最終濃度がそれぞれ最大 1% と 0.1% となるようにする、各化学物質の溶媒に合わせて対照群として最終濃度 1% PBS 添加群または 0.1% DMSO 添加群を設定する。

この時間を基準点の 0h として設定する。(0h)

- 7) 化学物質添加 20h 後に CCK-8 を 10 μ L/well で添加する。(20h)
- 8) CCK-8 添加 4h 後に各 well の 400 nm の吸光度を測定する。(24h)
- 9) 以下の式から各ウェルの細胞生存率を算出する。

$$Cell\ viability = \frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{vehicle} - Abs_{blank}}$$

- 10) 50%生存抑制濃度 (IC50)を推定する。
- 11) 今後、CCK-8 の添加を化学物質添加 66h 後、吸光度の測定を 70h 後にする可能性もあり。

図5 細胞毒性試験における希釈系列作製法

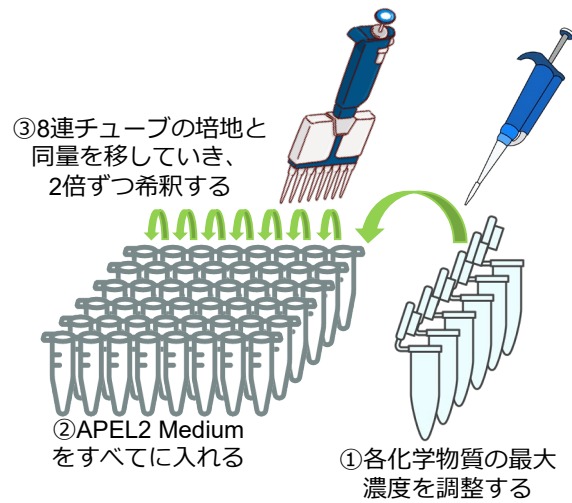


図6 細胞毒性試験プレートデザイン

	veh	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	veh	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
濃度 低 ————— 高											

4.3 DynaLux/c

4.3.1 bFGF の調製

- 1) bFGF を 0.1% BSA/PBS に溶解し、最終濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ とした。
- 2) 1.5 mL チューブに分注し、使用するまで冷凍庫に保存した。

4.3.2 DynaLux/c

Day0

- 1) 4.1.5 継代の手順に従い 96 well プレートに細胞を 2.0×10^4 cells/well で播種する。

Day1

- 2) 翌日、播種から 24h 以上経過後 にシングルセルでなくなっていれば、4.1.6 培地交換の手順に従い StemFlex Medium 200 $\mu\text{L/well}$ に培地交換する。(1day)

Day3

- 3) 播種後 3 日後に **4.1.6 培地交換**の手順に従い APEL2 Medium 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に培地交換する。
(3day)

Day4

- 4) 実験を行う前に細胞がコンフルエントになっていることを確認する。細胞に隙間があり、コンフルエントになっていないときは試験を避ける。
- 5) 実験操作開始 30 分前に Kronos を起動する。このタイミングで使用する化学物質を常温に置き溶かしておく。(-30 min)
- 6) APEL2 Medium (+1% Endurazine) 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に培地交換し、Kronos で測定を開始する。
この時間を Kronos 測定基準点の 0h として設定する。(0 h)
- 7) 化学物質添加 20 分前程度に添加化学物質の調製を行う。細胞毒性試験にて IC50 が推定された物質は最終濃度の最大濃度を IC50 に設定し、それ以外の物質は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を上限に溶解可能な最大濃度が添加前の最大濃度になるように APEL2 Medium で各化学物質の 2 倍希釈系列を 8 濃度分作製する。(希釈系列作製には 8 連チューブを用いた。8 連チューブの右端に最大濃度の化学物質を調製し、その他の部分には培地を入れておく。その後、右端のチューブから、他の部分に入れた培地量と同量の調整済み化学物質を取り、一つ左のチューブに入れピペッティングをして 1/2 に希釈する。その後希釈したチューブから同量を隣のチューブに入れてピペッティングという操作を繰り返して希釈系列を作成した。また、化学物質の種類が増えると希釈系列の作製が大変なため、マルチピペッターを用いて一度に複数の物質の希釈系列を作成した。) また、いずれの化学物質においても、溶媒である PBS または DMSO の最終濃度がそれぞれ最大 1%と 0.1%となるようにするため、各化学物質の溶媒に合わせて対照群として最終濃度 1%と 0.1% になるように PBS と DMSO を調製しておく。
- 8) Kronos を一時停止して 96 well プレートを取り出し、下図のように duplicate で 11 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ化学物質を添加した後、測定を再開する。(2h)
- 9) Kronos の測定を終了させ、データを保存した後、bFGF の濃度が 2 ng/mL になるよう APEL2 Medium で希釈し、12 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する。この時、左端の列は FGF を添加しないコントロールとする。その後、再び測定を開始する。(3 h)
- 10) 再測定開始後 70h 経過後に Kronos を停止する

※Endurazine、化学物質、bFGF の添加については、時間をずらさずに同時に行うことができないか検討中。

図7 DynaLux/c における希釈系列作製方法

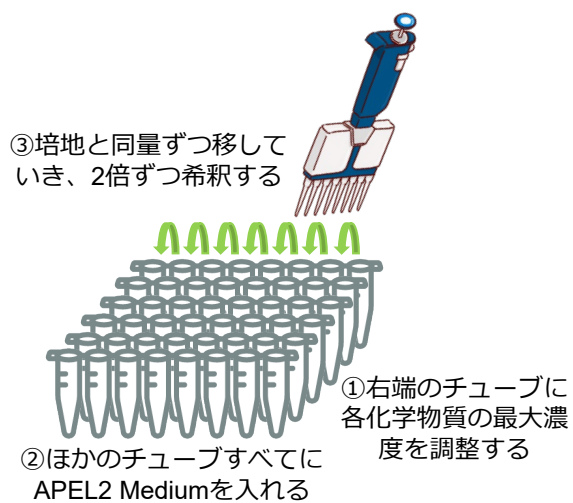


図8 DynaLux/c プレートデザイン

FGF+ →

	veh/FGF-	veh/FGF+	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh/FGF-	veh/FGF+	A	A	A	A	A	A	A	A	
	veh/FGF-	veh/FGF+	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh/FGF-	veh/FGF+	B	B	B	B	B	B	B	B	
	veh/FGF-	veh/FGF+	C	C	C	C	C	C	C	C	
	veh/FGF-	veh/FGF+	C	C	C	C	C	C	C	C	

濃度 低 ————— 高