

霊長類 ES/iPS 細胞を安全に効率よく保存・ジメチルスルホキシド・血清不含のガラス化凍結保存液

StemCell Keep (ステムセルキープ)

霊長類 ES や iPS 細胞は通常の凍結法では非常に低い解凍後の生存率しか得られず、ガラス化法が推奨されています。ガラス化凍結法とは、液体窒素に直接浸漬するなどして水の結晶化を防ぎ、ガラス状態で凍結する方法で、水の体積膨張がないため、細胞へのダメージが少ない方法です。しかし、ガラス化には高い溶質濃度が必要なため、毒性が高いという問題があります。そこで、StemCell Keep は、ガラス化能を高く維持したまま細胞毒性を低く抑えるよう最適化された組成を持っています。しかもタンパク成分や分化に影響を与えないとされる DMSO を含みません。安全性の高い新規凍結保護物質(特許出願中)の高い細胞保護作用およびガラス状態維持作用により、さらに効率よく ES/iPS のコロニーを凍結保存できるようになりました。

【特長】

- DMSO および血清などの動物性タンパク質を全く含まないので安全。
- 冷蔵庫で保存可能な安定性(有効期間2年)
- ガラス化保存によりコロニーのまま凍結が可能
- 幹細胞の分化能を維持したまま凍結保存可能

【使用方法】

注意：高い生存率を得るためには細胞を保存液に懸濁後すぐに液体窒素にバイアルを浸漬することが必要となります。十分に準備してから操作を開始してください。また、解凍時もバイアルにあらかじめ暖めた培地を添加してすぐに溶解させた方が生存率は高まります。

凍結時

1. 液体窒素をベンチ内に準備。
2. 霊長類 ES/iPS 細胞をはく離液(0.25%トリプシン/1mg/mL コラーゲンナーゼ IV/PBS 溶液)にてコロニーの状態ではく離。このとき 60mm ディッシュでコンフルエントの細胞を1~5 バイアル程度へ凍結可能です。
3. 2 で回収した細胞を遠心し培地を除去する。ここで、複数本凍結する場合は氷冷しておき、一本ずつ以下の操作を行う。
4. StemCell Keep を 200μL 加え、良くピペティングし、ふたをしてなるべく早く(1分以内が目安)バイアルごと液体窒素に浸漬します。(液が透明なままならガラス化がうまくいっています。)
5. 液体窒素タンクもしくは-130℃フリーザーで保存します。

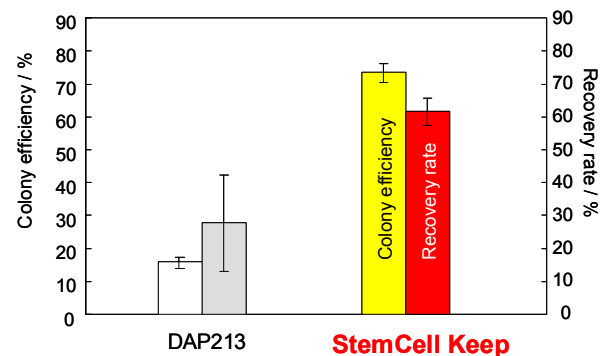
解凍時

1. 37℃で暖めた培地を準備します。9mL の培地を入れた本数分の遠心管を用意します。解凍は一本ずつ行ってください。
2. StemCell Keep で凍結しておいた細胞のバイアルをデューワー瓶などに入れた液体窒素中でクリーンベンチまで運びます。
3. 取り出したバイアルのふたをあげ、素早く 1mL の暖めておいた培地を添加し、ピペティングして溶解します。
4. 9mL の培地の入った遠心管に全量を移し、遠心して洗浄します。
5. フィーダー細胞上に播種し、培養します。



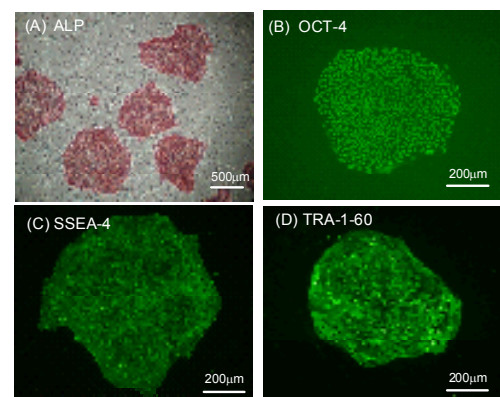
【実験例】

ヒト iPS 細胞の凍結保存



上図はヒト iPS 細胞を既存のガラス化液(DAP213)および StemCell Kee で凍結保存し、解凍後 4 日後のコロニー数と細胞数の未保存系との比を表した図です。StemCellKeep で凍結した系では未保存系に比較して 8 割のコロニーが接着増殖し、細胞数も未保存系と比較して 6 割と明らかに高い保護効果が見られます。

ヒト iPS 細胞の凍結解凍後の未分化能維持



上図は、StemCell Keep で凍結したヒト iPS 細胞の解凍後の未分化マーカーの発現を示しています。(A)アルカリホスファターゼ、(B)Oct-4、(C) SSEA-4、(D)TRA1-60 ともに陽性で未分化能が維持されています。

注意

- 1) 試験研究用以外には用いないでください。
- 2) 目的の細胞で事前に予備試験を実施してください。
- 3) 当社は、本製品の使用に起因する事故や損害に関しての責任を負いかねますのでご了承下さい。