

FUJIFILM

Wako

Code No. 197-17571 (100 mL)
193-17573 (100 mL × 4)

StemSure[®] hPSC Medium Δ

StemSure[®] hPSC Medium Δ is appropriate for maintaining human pluripotent stem cells (hPSCs), human ES cells and human iPSC cells, in a feeder-free, serum-free and animal-free environment. This medium is low in protein, and does not contain albumin.

This product is for laboratory research use only.

Procedures :

<Preparation of complete StemSure[®] hPSC Medium >

1. Thaw StemSure[®] hPSC Medium Δ at 2-10 °C for several hours or overnight.

NOTE : Do not thaw the frozen medium at 37 °C. After thawing, store this medium at 2-10 °C in the dark and use within a week. Avoid repeating freeze-thaw.

2. Add 35-100 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (Code No. 064-05381, 068-05384) (final concentration) to the thawed StemSure[®] hPSC Medium Δ, and gently mix well to prepare the complete StemSure[®] hPSC Medium (sshPSC medium).

NOTE : The concentration of 35 ng/mL is recommended as a final concentration of bFGF. When you transfer hPSCs cultured in other feeder-free medium to the sshPSC medium, the same concentration of bFGF used might be suitable for the sshPSC medium also.

3. Before use, warm the sshPSC medium to room temperature.
NOTE : Do not warm the sshPSC medium in a water bath.

<Transferring of hPSCs from the culture on feeder layers to the feeder-free culture >

NOTE : When hPSCs cannot be directly transferred from feeder-dependent culture with mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to feeder-free culture which uses the sshPSC medium, a preculture in MEF-conditioned medium [Xu, C., et al.: Nat. Biotechnol., 19, 971, (2001)], prior to using the sshPSC medium might be effective to transfer smoothly.

Preparation of Matrigel[®]-coated plates

1. Thaw Matrigel[®] at 4 °C. To avoid gelation, do not store at room temperature.
2. Dilute Matrigel[®] in cold DMEM/Ham's F-12 and gently mix well by pipetting (300 μL of Matrigel[®] in 25 mL of D-MEM/Ham's F-12).
3. Coat 6 well-plate with 1.4 mL of the diluted Matrigel[®] per well (9.5 cm²).
4. Incubate at room temperature for at least 1 hour before use.

Passaging

1. Aspirate the culture medium of a feeder-dependent cultured well.
2. Add 0.4 mL of CTK solution [Suemori, H., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 345, 926, (2006).] per well of 6-well plate.
3. Incubate at 37 °C with 5% CO₂ for 5 minutes.
4. Aspirate the CTK solution, and add 2 mL per well of the sshPSC medium and suspend the colonies in small clumps of about 100 cells by pipetting with a P1000 micropipette.
5. Transfer the cell suspension to a 15mL tube, and add 6 mL of the sshPSC medium and gently mix by inverting the tube several times.
6. Spin at 1,000 rpm (about 170 × g) at room temperature for 3 minutes.
7. Remove the supernatant, and add 2 mL per well of ROCKi + medium[※] and resuspend the pellet.
NOTE : Do not break up the clumps to a smaller number of cells, especially single cells.
※ROCKi + medium : sshPSC medium with 10 μmol/L Y-27632, which is an inhibitor of p160-Rho-associated coiled kinase (ROCK).
8. Aspirate the coating solution from the Matrigel[®]-coated wells.
9. Transfer 2 mL of the cell suspension to the well.
NOTE : Do not plate the cells at low-density. This will lead to the decrease in the viability of the cells and the increase in the differentiation of the plated cells.
NOTE : After the transfer to the feeder-free condition, MEFs will remain present for the first 1-3 passages. To eliminate MEFs from the culture, the cell suspension is plated to a non-coated or a gelatin-coated well, and incubate at 37 °C with 5% CO₂ for about 1 hour. Residual MEFs, not hPSC clumps, adhere to the well. The suspension containing hPSC clumps is harvested from the well, and then plated to a Matrigel[®] coated-well.
10. Incubate at 37 °C with 5% CO₂.
11. Replace the medium daily with 2 mL of sshPSC medium per well.
12. Passage the cells at 5 to 7 days.

<Passaging in sshPSC medium >

1. Aspirate the culture medium, and rinse the cells once with D-PBS(-).
2. Remove D-PBS(-), and add 1 mL of StemPro[®] Accutase, TrypLE[™] Select or TrypLE[™] Express per well.
NOTE : Do not use trypsin, Dispase[®] and CTK solution.
3. Incubate at 37 °C with 5% CO₂ for 5 minutes.
4. Add 2 mL of the ROCKi + medium, and suspend the colonies to single cells by using a P1000 micropipette.
5. Transfer the cell suspension to a 15 mL tube.
6. Spin at 1,000 rpm (about 170 × g) at room temperature for 3 minutes.
7. Aspirate the supernatant and suspend the pellet with 2 mL of the ROCKi + medium.
8. Count the viable cell numbers.
9. Aspirate the coating solution from the Matrigel[®]-coated wells (see Preparation of Matrigel[®]-coated plates).

10. Add 2 mL of the ROCKi + medium per well, and plate 1×10^5 cells per well.

NOTE : Do not plate the cells at low-density. This will lead to the decrease in the viability of the cells and the increase in the differentiation of the plated cells.

NOTE : In early passages, when the cells do not adapt to the feeder-free culture, $2-3 \times 10^5$ cells per well should be plated. The optimal split ratio is different in hPSC clones. The optimal plating cell number should be adjusted carefully for reproducible culture. In general, the cells should reach 80-90% confluent of the well at 4 or 5 days after plating.

11. Incubate at 37 °C with 5% CO₂.
12. The next day (at day 1), replace the medium with 2 mL of the sshPSC medium per well, not the ROCKi + Medium.
13. Replace the medium daily with 2 mL of the sshPSC medium per well. The replacement of medium is unnecessary on day 2.
14. Passage the cells when cells grow to cover approximately 80-90% of the well, usually every 4-6 days.

Storage : Store at -20 °C in the dark.
Avoid repeating freeze-thaw. After thawing, store at 2-10 °C in the dark and use within a week.

Package :

Code No.	Packaging
197-17571	100 mL
193-17573	100 mL × 4

Related Reagents

- D-MEM/Ham's F-12 with L-Glutamine, Phenol Red, HEPES and Sodium Pyruvate (Code No.042-30555)
- Fibroblast Growth Factor (basic), Human, recombinant, Animal-derived-free (Code No. 064-05381, 068-05384)
- Y-27632 (Code No. 257-00511, 253-00513, 251-00514)
- D-PBS(-) (Code No. 045-29795)
- Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Code No. 643-55461, Corning No. 354277)
- 6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates (Code No. 649-01111, Corning No. 3516)

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 197-17571 (100 mL)

193-17573 (100 mL × 4)

StemSure® hPSC培地 Δ

StemSure® hPSC培地 Δは、無フィーダー培養条件下でヒト多能性幹細胞（ヒトiPS細胞およびヒトES細胞）の維持培養に使用できる無血清、動物由来成分不含の液体培地です。本品は、低タンパク質培地であり、アルブミンを含んでいません。

本品は研究用試薬です。

[操 作]

<完全培地の準備>

1. 本品を2~10 °Cで数時間から一晩かけてゆっくり融解する。
注：37 °Cで融解しないでください。融解後、2~10 °Cの暗所で保存し、1週間以内にご使用ください。凍結融解は繰り返さないでください。
2. 融解後の本品に塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）（Code No. 064-05381, 068-05384）を終濃度35~100 ng/mLとなるよう添加しゆっくりとよく混ぜ、完全培地を調製する（以下、sshPSC培地という）。
注：bFGFの濃度は、35 ng/mLで添加することを推奨しますが、既に無フィーダー培養に馴化した細胞を本品で培養する場合は、ご使用培地と同じ濃度のbFGFを添加する方が、適している場合があります。
3. sshPSC培地を使用前に室温に戻す。
注：温浴槽は使用しないでください。

<オンフィーダー培養から無フィーダー培養への移行>

注：マウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いたオンフィーダー培養中の細胞を、sshPSC培地へ直接移行できない場合は、MEF馴化培地 [Xu, C., et al. : Nat. Biotechnol, **19**(10), 971, (2001).] で培養後、sshPSC培地に移行してください。

Matrigel® コートプレートの準備

1. Matrigel® を4 °Cで融解する。ゲル化を避けるため室温で融解しないでください。
2. Matrigel® を冷却したD-MEM/Ham's F-12で希釈し、ピペティングでよく混ぜる（Matrigel® 300 μLをD-MEM/Ham's F-12 25 mLで希釈する）。
3. 希釈したMatrigel® 溶液を6ウェルプレートに1.4 mL/well（9.5 cm²）添加する。
4. 室温で1時間以上インキュベートする。

継 代

1. オンフィーダー培養中のウェルから培地を除去する。
2. CTK溶液 [Suemori, H., et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **345**, 926, (2006).] を6ウェルプレートに0.4 mL/wellで添加する。

- 37℃、5% CO₂ インキュベーターで5分間静置する。
- CTK溶液を除去する。sshPSC培地 2 mLを加え、P1000マイクロピペットでクランプが100個程度の細胞になるようにピペッティングする。
- 細胞懸濁液を 15 mL チューブに移す。sshPSC培地 6 mLを加え、数回転倒混和する。
- 1,000 rpm (約170×g) で3分間、室温で遠心する。
- 上清を除去し、ROCKi+培地*を 2 mL/wellで添加し、再懸濁する。

注：クランプを分散しすぎないように注意してください。
 *ROCKi+培地：sshPSC培地にY-27632 (p160-Rho結合キナーゼ阻害剤；ROCKi) を終濃度10 μmol/Lとなるように添加した培地。

- Matrigel[®] でコート済みのウェルからコーティング溶液を除去する。
- 細胞懸濁液を 2 mL/wellで播種する。
 注：細胞生着率が低下したり、分化細胞が増加するため、低濃度で細胞を播種しないでください。
 注：MEFは無フィーダー培養移行後、1~3継代は残存します。MEFを除去するためには、細胞懸濁液をコートしていないウェルまたはゼラチンコートしたウェルに播種し、37℃、5% CO₂ インキュベーターで約1時間静置してください。残存MEFはウェルに接着するため、上清を回収することにより、hPSCクランプを含む細胞懸濁液を回収できます。回収した細胞懸濁液をMatrigel[®] でコート済みのウェルに播種してください。
- 37℃、5% CO₂ インキュベーターで静置する。
- sshPSC培地を用いて 2 mL/wellで毎日培地交換する。
- 2.5~7日目で継代する。

<sshPSC培地による継代>

- 培地を除去し、細胞をD-PBS(-)で一度洗浄する。
- D-PBS(-)を除去し、StemPro[®] Accutase、TrypLE[™] SelectあるいはTrypLE[™] Expressを 1 mL/well添加する。
 注：トリプシン、Dispase[®]、CTK溶液は使用しないでください。
- 37℃、5% CO₂ インキュベーターで5分間静置する。
- ROCKi+培地 2 mL/wellを添加し、P1000マイクロピペットを用いて、コロニーをシングルセルへ分散する。
- 細胞分散液を 15 mL チューブに移す。
- 1,000 rpm (約170×g) で3分間、室温で遠心する。
- 上清を除去し、ROCKi+培地 2 mLで細胞ペレットを懸濁する。
- 生細胞数を計測する。
- Matrigel[®] でコート済みのウェルからコーティング溶液を除去する (Matrigel[®] コートプレートの準備を参照)。

- ROCKi+培地を 2 mL/wellで添加し、1×10⁵ cells/wellとなるように細胞を播種する。

注：細胞生着率が低下したり、分化細胞が増加するため、低濃度で細胞を播種しないでください。

注：無フィーダー継代培養初期の細胞は安定していないため、細胞数を2~3×10⁵ cells/wellで播種した方が好ましい場合があります。最適な細胞播種濃度は細胞クローンによって異なります。細胞播種濃度は培養4~5日目で80~90%のコンフルエントとなるように調節してください。

- 37℃、5% CO₂ インキュベーターで静置する。
- 翌日 (培養1日目)、sshPSC培地を用いて 2 mL/wellで培地交換する。sshPSC培地へのY-27632の添加は不要です。
- sshPSC培地を用いて 2 mL/wellで毎日培地交換する。培地交換は培養2日目のみ不要です。
- 80~90%のコンフルエント状態で継代する (培養4~6日目)。

[保管]

暗所-20℃保管。

凍結融解は繰り返さないでください。融解後は暗所で2~10℃で保管し、1週間以内にご使用ください。

[包装]

Code No.	包装
197-17571	100 mL
193-17573	100 mL×4

[関連製品]

- D-MEM/Ham's F-12 (L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES、ピルビン酸ナトリウム含有) (Code No. 042-30555)
- 線維芽細胞成長因子 (塩基性)、ヒト、組換え体、動物由来物フリー (bFGF) (Code No. 064-05381, 068-05384)
- Y-27632 (Code No. 257-00511, 253-00513, 251-00514)
- D-PBS(-) (Code No. 045-29795)
- Matrigel[®] hESC-Qualified Matrix (Code No. 643-55461, Corning No. 354277)
- マルチプルウェルプレート 6ウェル平底 (Code No. 649-01111, Corning No. 3516)

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 Tel : 06-6203-3741

1803KA1