

SeV による iPS 細胞の樹立プロトコル

ver.1.0

PBMC への SeV 感染

1. SRV iPSC-4 Vector を流水で溶かし、氷上へ置いておく。
2. 顆粒球系細胞培地 3mL を調製しておく。
3. 1.5mL 顆粒球系細胞培地に iMatrix-511 を $9.6\mu\text{L}$ 加え、6well plate 1well へ素早く加えて 37°C で静置。
4. 前培養を行った PBMC (研究用 iPS 細胞樹立プロトコル ver.1.2 参照) を回収し、セルカウント。
5. 5×10^4 cells を新しい 1.5 mL チューブに移し、そこへ顆粒球系細胞培地と SRV iPSC-4 Vector (MOI=3) を加えて全部で $200\mu\text{L}$ となるよう調整する。
6. 37°C で 2 時間静置する (その間、2,3 回タッピングで攪拌する)。
7. StemSpan を $500\mu\text{L}$ 加え、 $400 \times g$ で 5 分間遠心する。
8. 上清を除去し、細胞をタッピングしてほぐす。
9. StemSpan を $500\mu\text{L}$ 加え、 $400 \times g$ で 5 分間遠心する。
10. 上清を除去し、細胞をタッピングしてほぐす。
11. ステップ 3 で用意した 6well plate に全量播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ にて培養開始。
12. 遺伝子導入後 1 週間はおよそ 2 日に 1 回 1.5mL StemFit を各 well に添加。
13. 遺伝子導入後 8 日目以降はおよそ 2 日に 1 回、iPS 細胞のコロニーが 1mm 程度になるまで 1.5mL StemFit にて培地交換。

試薬調整

◆ 顆粒球系細胞培地：要時調整

StemSpan-AOF に下記サイトカインを添加。

SCF （最終濃度 50ng /mL）

TPO （最終濃度 10 ng/mL）

Flt3L （最終濃度 20 ng/mL）

IL-6 （最終濃度 50 ng/mL）

IL-3 （最終濃度 20 ng/mL）

G-CSF （最終濃度 10 ng/mL）

原材料一覧

SRV iPSC-4 Vector (ときわバイオ、S1011696A)

StemSpan-AOF (STEMCELL Techno、ST-100-0130)

Recombinant human SCF (富士フイルム和光純薬、197-15511)

Recombinant human TPO (富士フイルム和光純薬、207-17581)

Recombinant human Flt3L (富士フイルム和光純薬、061-05391)

Recombinant human IL-6 (富士フイルム和光純薬、098-06041)

Recombinant human IL-3 (富士フイルム和光純薬、090-05761)

StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ株式会社)

PBS (-) (ナカライテスク、14249-24)

参考資料

本プロトコルは、ときわバイオ社提供の iPS 細胞樹立プロトコルを参考に作成しました。

ときわバイオ社ホームページ : <https://tokiwa-bio.com/>