

ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm Technical Manual

はじめに

胚性幹細胞または多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、三胚葉 (内胚葉、中胚葉、外胚葉) を経由し様々な細胞へ分化する能力を有します。本キットを用いて培養上清中のマーカータンパク質を検出することで、ES/iPS 細胞から分化した内胚葉細胞の分化度を測定することができます。このマーカータンパク質は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 二重陽性細胞率と相関します。本キットでは培養上清中のマーカータンパク質を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法により検出するため、細胞を損なわず継続培養しながら分化の状態をモニターすることが可能です。また多検体の測定に用いることができるので、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用です。

本製品は熊本大学発生医学研究所との共同研究成果です。

キット内容

- Coated 96-well Strip Plate	x 1	- Washing Buffer	x 1
- Standard	x 1	- Storage Buffer	0.5 ml x 1
- Reagent A	x 1	- Substrate Solution	10 ml x 1
- Reagent B	x 1	- Plate Seal	x 3

保存条件

0-5°Cにて保存してください。

必要なもの (キット以外)

- プレートリーダー
- マイクロピペット、マルチチャンネルピペット
- ペーパータオル
- 1.5 ml チューブ
- 硫酸

使用上のご注意

内容物がチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がございます。遠心してからご使用ください。

溶液調製

- Washing Buffer
付属の Washing Buffer 粉末 1 袋を超純水に溶解し全量を 1000 ml とする。
- Stop Solution
0.2 mol/l 硫酸水溶液を調製する。※硫酸は本キットに含まれません。別途ご用意ください。
- Standard Stock Solution
Standard のチューブ (キャップ: 青) に Storage Buffer 20 μ l を加え、泡立たないようにゆっくりピペッティングする。※溶解後は -20°C にて保存し、1 ヶ月以内にご使用下さい。
- Reagent A Stock Solution
Reagent A のチューブ (キャップ: 赤) に Storage Buffer 150 μ l を加え、泡立たないようにゆっくりピペッティングする。※溶解後は -20°C にて保存し、1 ヶ月以内にご使用下さい。
- Reagent B Stock Solution
Reagent B のバイアル (キャップ: 緑) に Storage Buffer 150 μ l を加え、泡立たないようにゆっくりピペッティングする。※溶解後は -20°C にて保存し、1 ヶ月以内にご使用下さい。

操作

- 1) 袋からプレートを取り出し、裏返して全ての Strip を外す (写真 1)。
※プレートは室温に戻して開封してください。湿気による劣化の恐れがあります。
- 2) 必要数の Strip をシールから外し、フレームにセットする (写真 2、3)。残りの Strip はそのまま袋に入れ、袋のチャックを閉じ冷蔵で保存する (写真 4)。
※ストリップが外れた場合は再度シールに固定するか、付属のプレートシールで貼りなおしてください。
- 3) Standard Stock Solution を Washing Buffer で 100 倍に希釈し 1000ng/ml の Standard を作製する。次に Washing Buffer を用いて倍々希釈し Standard Solution を調製する (図 1)。
※ Standard Solutions: 500, 250, 125, 0 ng/ml
※ Washing Buffer で希釈後は保存できません。必要量の Standard Stock Solution を用いて用事調製してください。

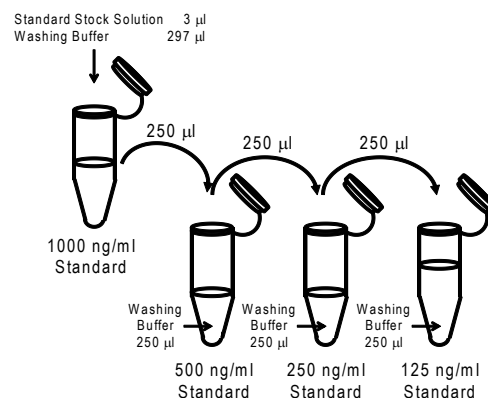
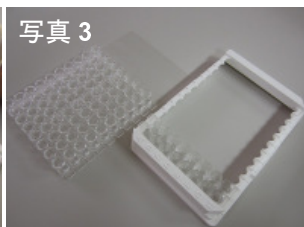
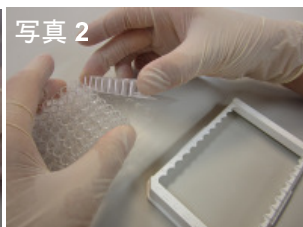


図 1. Standard Solution の調製例 (n=2)



操作

- 4) 調製した Standard Solution および測定サンプル（培養上清）を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートする。
¹ ※ n=2 で測定する場合、2 ストリップを用いることで 4 検体測定することが可能です。
 ストリップを増やすことで同時に測定する検体を増やすことができます（図 2）。
² ※発色が強い場合は Washing Buffer でサンプルを任意の濃度に希釈してください。
- 5) Reagent A Stock Solution を Washing Buffer で 100 倍に希釈し Reagent A working solution を作製する。
- 6) ウェル中の溶液を除去し、1 ウェルあたり 250 μ l の Washing Buffer で洗浄する。再びウェル中の溶液を除去し、ペーパータオルの上でプレートを叩いてウェル中の残存溶液を完全に除く。この操作を 3 回繰り返す。調製した Reagent A working solution を 1 ウェルあたり 100 μ l 加え室温で 1 時間インキュベートする。
- 7) Reagent B Stock Solution を Washing Buffer で 100 倍に希釈し Reagent B working solution を作製する。
- 8) 6) と同様に、Washing Buffer で 3 回洗浄する。調製した Reagent B working solution を 1 ウェルあたり 100 μ l 加え室温で 30 分インキュベートする。
- 9) 6) と同様に、Washing Buffer で 5 回洗浄する。1 ウェルあたり 100 μ l の Substrate Solution を加え、室温で 10-15 分インキュベートする。
- 10) 1 ウェルあたり 100 μ l の Stop Solution を加え反応停止後、マイクロプレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定する。測定サンプル中のマーカータンパク質量を検量線より算出する。

ストリップ数
1 2 3 4

A	0 ng/ml Standard	Sample E
B	125 ng/ml Standard	Sample F
C	250 ng/ml Standard	Sample G
D	500 ng/ml Standard	Sample H
E	Sample A	Sample I
F	Sample B	Sample J
G	Sample C	Sample K
H	Sample D	Sample L

図 2. Standard Solution と Sample のレイアウト例 (n=2)

使用例

ヒト iPS 細胞の内胚葉への分化モニター

ヒト iPS 細胞 (253G1 株) を 96-well プレートに 1.0×10^5 cells/well 播種し、100 ng/ml Activin A を含む分化培地にて培養した。24 時間毎に培地交換を行い、交換時に廃棄する培養上清 100 μ l を測定サンプルとして本キットにより培養上清中のマーカータンパク質量を測定した（図 3A）。一方、分化した細胞の内胚葉の割合を免疫染色により算出し（図 3B）、マーカータンパク質との関係を比較した。培養上清中のマーカータンパク質量は内胚葉の割合と相関した。

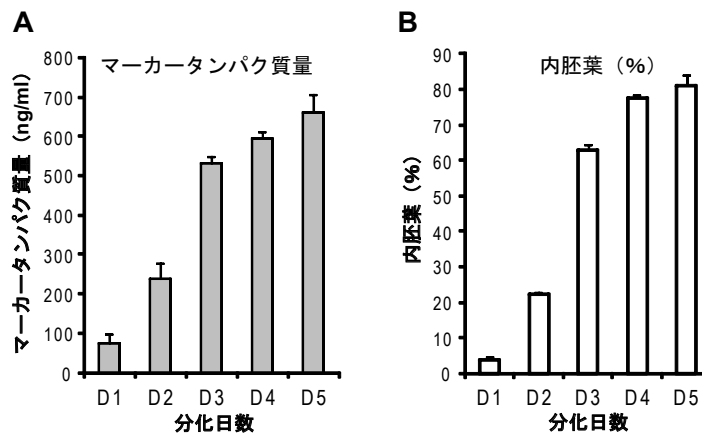


図 3. 分化日数毎の内胚葉の割合と培養上清中のマーカータンパク質量の関係

(A) 分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (ng/ml)

(B) 分化日数毎の内胚葉細胞の割合 (%)

※内胚葉細胞 : Sox17、Foxa2 二重陽性細胞

注意点

分化誘導法、細胞密度により分泌タンパク質量は異なる場合がございます。上記のように免疫染色やフローサイトメーターにより内胚葉の割合と培養上清中のマーカータンパク質量との関係をご確認頂き、内胚葉細胞の分化モニタリングとしてお使い下さい。

参考文献

H. Iwashita, N. Shiraki, D. Sakano, T. Ikegami, M. Shiga, K. Kume, S. Kume., *PLoS ONE.*, 2013, 8(5): e64291.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル : 0120-489548
 フリーファックス : 0120-021557