

培養上清で ES/iPS 細胞由来内胚葉を検出したい

使用製品

ES/iPS Differentiation
Monitoring Kit Human Endoderm [ES01]

解析装置



I 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持つ。ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm (Code: ES01) 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できる。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する。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ある。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ある。

II 培養上清を用いた iPS 細胞由来内胚葉の検出

1. キットの内容

- Coated 96-well Strip Plate
- Standard
- Reagent A
- Reagent B
- Washing Buffer
- Storage Buffer
- Substrate Solution
- Plate Seal

2. キット以外に必要なもの

- 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

3. 保存条件

0 ~ 5°Cにて保存する。Standard、Reagent A、Reagent B を Storage Buffer で溶解後は -20°Cにて保存し、1 ヶ月以内に使用すること。

4. 溶液の調製

- Washing Buffer
Washing Buffer1 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。別途ご用意下さい。
- Standard Stock Solution
Standard のチューブ (キャップ: 青) に Storage Buffer 20 µl を加え、泡立たないようにゆっくりピペティングする。
※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

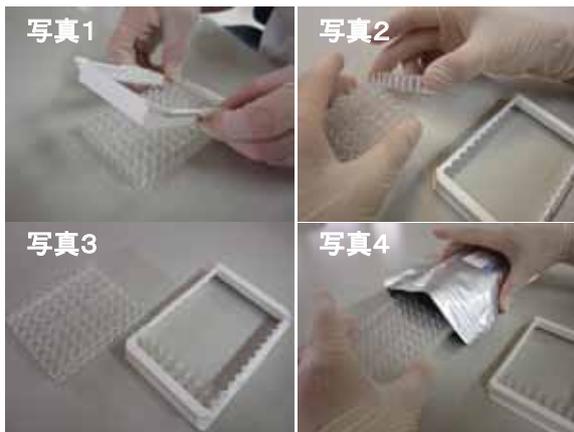
Reagent A のチューブ (キャップ: 赤) に Storage Buffer 150 µl を加え、泡立たないようにゆっくりピペティングする。
※溶解後は -20°Cにて保存し、1 ヶ月以内にご使用下さい。

• Reagent B Stock Solution

Reagent B のバイアル (キャップ: 緑) に Storage Buffer 150 µl を加え、泡立たないようにゆっくりピペティングする。
※溶解後は -20°Cにて保存し、1 ヶ月以内にご使用下さい。

5. 操作

- 1) 袋からプレートを取出し、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 1000 ng/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 を用いて用時調製してください。

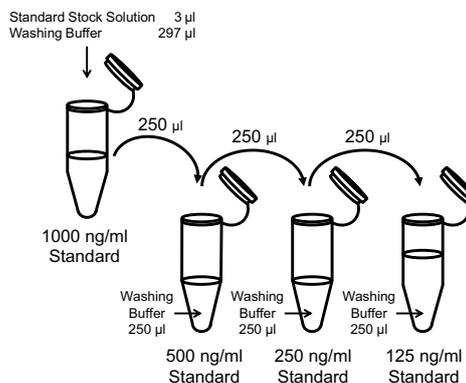


図 1 Standard solution の調製例 (n=2)

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

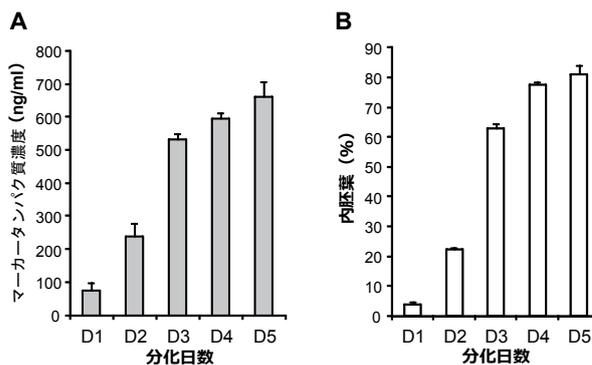
- 4) 調製した Standard Solution および測定サンプル (培養上清) を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートする。
 ※ n=2 で測定する場合、2 ストリップを用いることで 4 検体測定することが可能です。ストリップを増やすことで同時に測定する検体を増やすことができます (図 2)。
 ※ 発色が強い場合は Washing Buffer でサンプルを任意の濃度に希釈してください。
- 5) Reagent A Stock Solution を Washing Buffer で 100 倍に希釈し Reagent A working solution を調製する。
- 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 を調製する。
- 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濃度を検量線より算出する。

	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)

III 使用例: ヒト iPS 細胞を用いた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濃度を測定した (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濃度は内胚葉の割合と相関した。



(A) 分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質濃度 (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

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濃度の関係

IV 注意事項

分化誘導法、細胞密度により分泌タンパク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濃度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

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

FAQ

- Q: 培養上清サンプルを数日分まとめて測定したいと思います。サンプルの保存は可能ですか？
- A: 冷凍での保存は可能です。培養上清をそのまま -20 $^{\circ}$ C 保存した際、1 ヶ月間は測定値に変化がなかったという実績がございます。
- Q: Stop Solution を添加し反応停止後、すぐに測定しないといけませんか？
- A: Stop Solution を添加後、1 時間以内に吸光度を測定してください。時間がたつと発色が弱くなっていきます。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

iPS 同仁 検索