

Code No. 299-78301 (96 tests)

Wako Human ES/iPS Cell Monitoring Kit

rBC2LCN is a recombinant protein of N-terminal domain of BC2L-C lectin derived from *Burkholderia cenocepacia*. rBC2LCN exhibits significant affinity to a mucin-type O-glycan sugar chain called H-type3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) displayed on the podocalyxin binds to the surface of human pluripotent stem cells (hPSCs), human ES cells and human iPS cells. Therefore rBC2LCN is reported as a marker of hPSCs.

The glycoprotein recognized by rBC2LCN is released from hPSCs into cell culture supernatant. This kit can quantitatively determine the released glycoprotein by rBC2LCN-antibody sandwich assay and estimate the number of hPSCs. Because, cell culture supernatants, but not cells itself, are used as sample targeted for assay, it is easily capable of monitoring the increase and decrease of hPSCs in a noninvasive manner during continuous cell culture. This kit is useful for researches, such as regenerative medicine, cell differentiation and iPS cell induction.

This product is for laboratory use only ; use in any such application is the responsibility of the user.

Kit Contents

	Code No.	Contents	Amount
(1)	296-78311	rBC2LCN-coated Plate	96 wells \times 1 plate (8 wells \times 12 strips)
(2)	293-78321	HRP-conjugated Antibody Solution	400 μ L \times 1 tube
(3)	290-78331	Negative Control	1 mL \times 1 tube
(4)	297-78341	Positive Control	100 μ L \times 1 tube
(5)	294-78351	Dilution Solution	15 mL \times 1 bottle
(6)	291-78361	Wash Solution (10 \times)	100 mL \times 1 bottle
(7)	298-78371	TMB Solution	10 mL \times 1 bottle
(8)	295-78381	Stop Solution	10 mL \times 1 bottle
(9)	292-78391	Plate Seal	4 sheets

Storage

Store at 2-10 $^{\circ}$ C

Package

Code No.	Packaging
299-78301	96 tests

Additional required apparatus

- Centrifuge (possible at 1,700 \times g (about 3,000 rpm))
- Vortex mixer
- Plate mixer (desirable)
- Automated 96 well-plate washer (desirable)
- 96 well-plate reader (absorbance 450 nm, reference wavelength 600-650 nm)

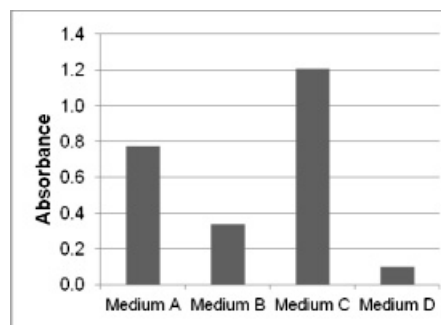
Precautions

< About assay >

- Harvest the cell culture supernatants on the next day after the replacement of the culture medium and, at the same time, count the number of the cells in the dish. When the medium in the dish is 5 mL and it is found to be 5×10^6 cells/dish, for example, the number of cells in the cell culture supernatant is regarded to be 1×10^6 cells/mL.
- Generate a standard curve by cell culture supernatants under the undifferentiated culture of hPSCs, and calculate the number of hPSCs in the sample based on the standard curve. However, the calculated number of hPSCs is not always equal to the actual cell number of hPSCs. Please use as one of indicators to monitor the undifferentiated state of cells and the progress of cell differentiation.
- The relation between signal intensity and cell number (cells/mL) is greatly affected by culture conditions such as cell strains and culture medium*. Prepare standard curves for each cell strain and undifferentiated maintenance culture condition, respectively.

※ *The comparison of different culture medium is indicated below.*

After culturing human iPS cells in the Medium A, B, C and D under undifferentiated condition, the culture supernatants were harvested on the day following the date of medium replacement. The cell number of each condition was counted, and the culture supernatant was diluted with individual culture medium to 2,000 cells/mL. The signal intensity of different culture supernatant was measured with this kit.



< About use of kit >

- Wear gloves and laboratory coats, and use laboratory glassware when handling this kit. In particular, carefully handle Stop Solution which is strong acid. If the reagents of the kit touch skin directly, wash with water. When getting them in your eye, don't rub, and please wash with running water and seek treatment immediately.
- Don't use kit past expiration date.
- Don't mix the reagents from other lot or sources.
- Store at 20-25 °C before use.
- The plate seal is sticky. When peeling off the plate seal, please be careful for the solution in the well not to jump up and spill.
- After washed with an automated washer and so on, invert the plate and blot it against clean paper towels to remove residual washing buffer in the wells.
- Store TMB solution in the dark.
- Store kit contents except for the plate seal at 2-10 °C immediately after use.
- Dispose reagents in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.

< Preparation of "sample" (cell culture supernatant) >

- Harvest cell culture supernatants cultured for 18-24 hours after medium exchange.
 - ※ Because the culturing time affect the signal intensity, exchange whole culture medium. And harvest cell culture supernatants in constant time.
- Centrifuge the cell culture supernatants at 1,700 × g (about 3,000 rpm) at room temperature for 10 minutes. Transfer the supernatants to new tubes and regard them as measuring "samples".
- When not measuring the "samples" immediately, store at -20 °C.

< Preparation of standard curve >

- Prepare a standard curve for each cell strain and undifferentiated maintenance culture condition.
- Culture hPSCs for 18-24 hours after changing the whole culture medium with the fresh medium and then harvest the cell culture supernatant. Then, detach the hPSCs from the dish and count the cell number of hPSCs. Prepare the "samples" for standard curve from cell culture supernatants according to Preparation of "sample".
- Store the "samples" at -20 °C prior to use (several times of freezing-thawing cycle are possible).
- Dilute "sample" for standard curve with the same new medium with the sample targeted for assay, and make a standard curve. Prepare by three-fold serial dilutions from 30,000 cells/mL to about 41 cells/mL and make sure of the tendency. After that, produce a dilution series by two-fold serial dilutions from the appropriate cell number to make standard curve. Measure only culture medium because culture medium show high background.

- In each assay, use one strip for standard curve, and calculate the cell number of hPSCs in "sample" targeted for assay from the standard curve.
- When it's difficult to use one of strips for making a standard curve because of multiple "samples", decrease the number of wells used for the standard curve (2-4 wells). But, select the number of cells with good linearity of the standard curve.

Procedures

< Preparation of assay >

- Use rBC2LCN-coated plate, Negative Control, Positive Control, Dilution Solution, Wash Solution (10 ×), Stop Solution and Plate Seal after returning to room temperature (except for HRP-conjugated Antibody Solution and TMB Solution).
- Dilute the Wash Solution (10 ×) 10 times with purified water (or deionized water) of room temperature. Wash Solution (1 ×) need at least 40 mL per 1-strip. Prepare the required amount of Wash Solution (1 ×) according to the number of "sample". When using an automated plate washer, prepare an amount of Wash Solution (1 ×) sufficient for washer setting.
- Just prior to use, dilute the Positive Control 40 times with the Dilution Solution. Positive Control is used to make sure of success of the reaction. (Add 5 μL of Positive Control to 195 μL of Dilution Solution, mix by vortex mixer and add 50 μL/well to blank wells.)
- Add the Negative Control to a well without diluting.
- Just prior to use, dilute the HRP-conjugated Antibody Solution 20 times with the Dilute Solution. Diluted HRP-conjugated Antibody Solution need 50 μL/well. After transferring the requirement to a tube. Store the rest of HRP-conjugated Antibody Solution at 2-10 °C immediately.
- Before 20-30 minutes of coloring reaction, transfer the required amount of TMB Solution to a sterilized tube, and avoid light exposure, store at room temperature before use. Store the rest of TMB Solution at 2-10 °C immediately.

< Assay >

- (1) After rBC2LCN-coated Plate was returned to the room temperature, take the plate from the bag. Remove unused strips from the plate frame, return them to the bag, and store at 2-10 °C.
- (2) Close the holder of the plate frame and fix the strips. Add 350 μL/well of Wash Solution (1 ×) to each well and aspirate. Repeat the wash process 3 times, then invert the plate and blot it against clean paper towels to remove residual washing buffer in wells.
- (3) Add 50 μL/well of "sample" for standard curve, "sample" targeted for assay, Negative Control and diluted Positive Control to each well. After mixing lightly by a plate mixer, seal the plate with a Plate Seal and incubate for 1 hour at room temperature.
- (4) Remove the Plate Seal, add with 350 μL/well of Wash Solution (1 ×) to each well and aspirate. Repeat the wash process 3 times, and then invert plate and blot it against clean paper towels to remove residual washing buffers in wells.

- (5) Add 50 μ L/well of diluted HRP-conjugated Antibody Solution to each well. After mixing lightly by a plate mixer, seal the plate with a Plate Seal and incubate for 1 hour at room temperature.
- (6) Remove the Plate Seal, add 350 μ L/well of Wash Solution (1 \times) to each well and aspirate. Repeat the wash process 6 times, and then invert the plate and blot it against clean paper towels to remove residual washing buffers in wells.
- (7) Add 50 μ L/well of TMB Solution to each well. After mixing lightly by a plate mixer and incubate for 30 minutes at room temperature (cover it with an aluminum foil in order to protect from light).
- (8) Add 50 μ L/well of Stop Solution to each well and mix lightly to stop the reaction. Read the absorbance of each well at 450 nm (reference wavelength 600-650 nm) by a plate reader. Ensure no bubbles are present in the wells prior to reading plate.
- (9) Calculate the cell number of hPSCs contained in "sample" targeted for assay based on the standard curve.
 ※ When using Positive Control and Negative Control, confirm that the absorbance of Positive Control is more than 0.5 and the absorbance of Negative Control is less than 0.15.

Flow chart

rBC2LCN-coated Plate

↓ Wash plate 3 times

Add 50 μ L of "samples" for standard curve, "sample" targeted for assay, Negative control and diluted Positive Control

↓ Mix and incubate at room temperature for 1 hour

↓ Wash plate 3 times

Add 50 μ L of HRP-conjugated Antibody Solution diluted 20 times

↓ Mix and incubate at room temperature for 1 hour

↓ Wash 6 times

Add 50 μ L of TMB Solution

↓ Mix and incubate at room temperature for 30 minutes (protect from light)

Add 50 μ L of Stop Solution

↓ Mix

Read the absorbance of 450 nm (reference wavelength 600-650 nm)

Reference

Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K., Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

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>

Wako Chemicals USA, Inc.

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

Wako Chemicals 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. 299-78301 (96 回用)

ヒト ES/iPS 細胞モニタリングキット

rBC2LCNは、*Burkholderia cenocepacia*由来のBC2L-CレクチンのN末端ドメインの組換えタンパク質です。rBC2LCNは、ヒト多能性幹細胞（ヒトES細胞およびヒトiPS細胞）表面に存在するボドカリキシン上のムチン様O型糖鎖であるH-type3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) に高い親和性をもつため、ヒト多能性幹細胞のマーカーとして報告されています。

rBC2LCNにより認識される糖タンパク質はヒト多能性幹細胞から培養上清に放出されます。本キットは、培養上清中に放出される糖タンパク質をrBC2LCN-抗体サンドイッチアッセイで定量的に測定し、ヒト多能性幹細胞数を推測します。培養上清を測定試料とするため、培養を継続しながら未分化細胞の増減を簡単にモニタリングすることができます。再生医療、細胞分化、iPS細胞誘導などの研究に有用なキットです。

[キット内容]

	コード No.	試薬名	容量×個数
(1)	296-78311	rBC2LCN 固相化プレート	96 ウェル×1 枚 (8 ウェル×12 strips)
(2)	293-78321	HRP 標識抗体溶液	400 μ L×1 本
(3)	290-78331	陰性コントロール	1 mL×1 本
(4)	297-78341	陽性コントロール	100 μ L×1 本
(5)	294-78351	希釈液	15 mL×1 本
(6)	291-78361	洗浄液 (10 \times)	100 mL×1 本
(7)	298-78371	TMB 溶液	10 mL×1 本
(8)	295-78381	発色停止液	10 mL×1 本
(9)	292-78391	プレートシール	4 枚

[保存条件]

2~10 $^{\circ}$ C

[包装]

Code No.	包装
299-78301	96 回用

[キット以外に必要な機器]

- 遠心機 (1,700 \times g (約 3,000 rpm) で遠心が可能な機器)
- ボルテックスミキサー
- プレートミキサー: あれば好ましい
- 96ウェルプレート洗浄機: あれば好ましい
- 96ウェルプレートリーダー (吸光度測定: 主波長 450 nm、副波長 600 nm~650 nm)

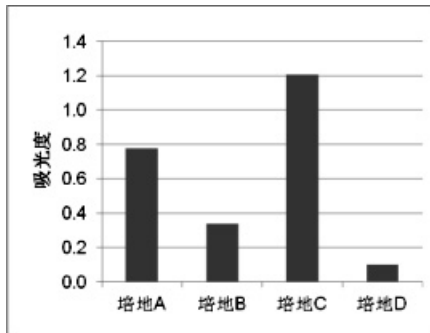
[使用上の注意]

<測定に関すること>

- 培地交換した翌日に培養上清をサンプリングし、その後に細胞を剥がしてヒト多能性幹細胞数を測定する。例えば、培地が 5 mL、細胞数が 5×10^6 cellsであった場合、サンプリングした培養上清の未分化細胞数を 1×10^6 cells/mLとします。
- 本キットでは、未分化維持培養条件下の培養上清の測定値に基づく標準曲線を作成していただき、それを一つの基準にして測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出します。算出される未分化細胞数と実際の値とは必ずしも一致するものではありません。未分化維持状態および細胞分化の進行をモニタリングする一つの指標としてお使いください。
- 細胞株、あるいは培地の種類などの培養条件により、シグナル強度と細胞数 (cells/mL) の関係は大きく異なります*。標準曲線は細胞株毎および未分化維持培養条件毎に作成してください。

※ 培地種による違いを下に示す。

ヒト iPS 細胞維持培地 A、B、C、D でヒト iPS 細胞を培養した後、培地交換した翌日にその培養上清を回収した。その細胞数をカウントし、細胞数が 2,000 cells/mL となるように、回収した培養上清をそれぞれの培地で希釈し、本キットを用いてそれぞれのシグナル強度を算出した。



<キットの使用に関すること>

- 本キットの操作中は手袋や眼鏡など保護具を着用してください。特に発色停止液は強酸性ですので、お取扱いは十分に注意を払ってください。万が一、本キットの試薬類が直接肌に触れた場合は水道水で洗い流してください。また、誤って目に入った場合はこすらず直ちに流水で15分以上洗い流し、医師の手当てを受けてください。
- 使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。
- ロット番号の違う試薬は混ぜて使わないでください。

- 使用前は 20~25℃ に保管して下さい。
- プレートシールは粘着力がありますので、剥がすときはプレートをしっかり押さえ、プレートが動いてウェル中の溶液が跳ねないように注意してください。
- プレート洗浄機などを使って洗浄を終えた後は、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている余分な洗浄液を取り除いてください。
- TMB 溶液は光を避けて保存してください。
- プレートシール以外のキット構成試薬は、使用後速やかに冷蔵に戻して保管してください。
- 使用済みの試薬や検体および未使用の試薬類は、所属施設の規定や各種法令に従って適切に廃棄処理してください。

<試料 (培養上清) の調製法>

- 測定対象試料および標準曲線作成用試料は、培地交換後 18 時間~24 時間培養した上清をサンプリングしてください。
※ 全培地交換を基本とし、その後の培養時間にも影響されますので、できるだけ培地交換後サンプリングまでの時間を統一してください。
- サンプリングした培養上清を $1,700 \times g$ (3,000 rpm)、10 min、室温で遠心してください。回収される遠心上清を「試料」とします。
- すぐに測定に供しない場合は、 -20°C 以下で凍結保存してください。

<標準曲線作成>

- 細胞株毎および未分化維持培養条件毎に標準曲線を作成してください。
- 全培地交換した 18 時間~24 時間後の培養上清をサンプリングした後、細胞を剥がして未分化細胞数を測定し、[試料 (培養上清) の調製法] に従って培養上清から試料を調製してください。測定に供するまで -20°C 以下で凍結保存してください (数回程度の凍結融解は可能です)。
- 測定対象となる試料と同じ新しい培地で希釈して標準曲線を作成してください。最初は 30,000 cells/mL から約 41 cells/mL まで 3 倍ずつ段階希釈して傾向を確かめ、その後に適切な細胞数から 2 倍ずつ段階希釈して検量線を作成することをお勧めします。また、培地によってはバックグラウンドが高いものもありますので、必ず培地ごとのウェルも作成してください。
- 測定毎に Strip の一つを標準曲線用とし、そこで得られる標準曲線から測定対象となる試料の未分化細胞数を算出することをお勧めします。
- 検体数が多く、測定毎に Strip の一つを標準曲線用に使うことが難しい場合は、標準曲線に使用するウェル数を減らしてください (2~4 ウェル)。ただし、直線関係が得られる細胞数を選んでください。

[操作]

<準備>

- 使用する前に、rBC2LCN固相化プレート、陰性コントロール、陽性コントロール、希釈液、洗浄液(10×)、発色停止液、プレートシールを室温にしてください(HRP標識抗体溶液およびTMB溶液以外の試薬)。
- 洗浄液(10×)を室温の精製水(蒸留水)で10倍希釈してください。洗浄液(1×)は1-Stripあたり少なくとも40 mL必要です(350 μL/ウェル×洗浄12回×8ウェル)。測定数(使用するStrip数)にあわせて調製してください。ただし、プレート洗浄機を使う場合は、機械のセッティングに要する液量を考慮し多めに調製してください。
- 反応の成否を確かめるための陽性コントロールは、使用直前に希釈液で40倍希釈してください(希釈液195 μLに陽性コントロール5 μLを添加してボルテックスで混合して、50 μL/ウェルで空いているウェルに添加してください)。
- 陰性コントロールは、希釈せずそのままウェルに添加してください。
- HRP標識抗体溶液は、使用直前に希釈液で20倍希釈して必要量(50 μL/ウェル×ウェル数)を調製してください。必要量を取り出した後のHRP標識抗体溶液は速やかに冷蔵に戻してください。
- TMB溶液は、発色反応の20分前～30分前に、必要量(50 μL/ウェル×ウェル数)を滅菌された新しいチューブに分けて、使用するまで光を避けて室温で保管してください。必要量を取り出した後のTMB溶液は速やかに冷蔵に戻してください。

<測定手順>

- (1) rBC2LCN固相化プレートが室温になったことを確認した後、袋からプレートを取り出し測定に使用しないStripをプレート枠から外して袋に戻しチャックを閉じて冷蔵に保管してください。
- (2) プレート枠のホルダーを閉じてStripを固定し、洗浄液(1×)、350 μL/ウェルで3回洗浄します。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除きます。
- (3) 標準曲線用試料、測定対象試料、必要ならば陰性コントロールおよび希釈済み陽性コントロールを、各々50 μL/ウェル添加しプレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させます。
- (4) プレートシールを剥がし、洗浄液(1×)、350 μL/ウェルで3回洗浄します。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除きます。

- (5) 20倍希釈したHRP標識抗体溶液を、50 μL/ウェル添加しプレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させます。
- (6) プレートシールを剥がし、洗浄液(1×)、350 μL/ウェルで6回洗浄します。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除きます。
- (7) TMB溶液を、50 μL/ウェル添加しプレートミキサーなどで軽く攪拌した後、室温で30分間静置反応させます(アルミホイルなどで上からカバーして光を避けてください)。
- (8) 発色停止液を、50 μL/ウェル添加し軽く攪拌して反応を停止させ、プレートリーダーで吸光度[主波長450 nm、副波長620 nm～650 nm]を測定します。泡などが生じている場合は、チップの先などで消してから測定してください。
- (9) 標準曲線に基づいて、測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出します。
※ 陽性コントロールをお使いになった場合はその吸光度が0.5以上であること、陰性コントロールをお使いになった場合はその吸光度が0.15未満であることをご確認ください。

操作手順(フローチャート)

rBC2LCN 固相化プレート

↓ 洗浄 3回

標準曲線用試料、測定対象試料、場合により陰性および陽性コントロールを50 μL/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、1時間反応(静置)

↓ 洗浄 3回

HRP 標識抗体溶液(20倍希釈)を50 μL/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、1時間反応(静置)

↓ 洗浄 6回

TMB 溶液を50 μL/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、30分間反応(静置、遮光)

発色停止液を50 μL/ウェル添加

↓ 攪拌

吸光度測定(主波長450 nm、副波長600～650 nm)

参考文献

Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K., Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).

製造発売元

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町3-1-2
電話(06)6203-3741(代表)

1602K01