

(1)メンテナンス関係

(a) 器具等の洗浄

洗剤は培養細胞用の専用洗剤を使用 (Labware 7X Laboratory Detergents; ICN) 。  
泡が立たなくなるまで良くすすいだ後、MILLI-Qで3回すすぐ。

(b) 滅菌

培地の瓶、エッペンチューブなど: オートクレーブ (121°C, 15 min)  
ガラスピペット、パスツール: 乾熱滅菌 (160°C, 2 hr)  
培地、PBS、その他の溶液類: フィルター滅菌

(c) 培地

通常、1L用パウダーを使用 (DMEM ; Gibco 12800-017 , DMEM W/O phenol red ; Gibco 13000-021, PBS ; Gibco 21300-025)。  
調整方法はこれらの外箱に記載してあるが、使用頻度の高いDMEMとPBSの調整法を示す。

\*\*\*\* DMEMの調整法\*\*\*\*

培養細胞専用の1,000 mlメスシリンダーに、MILLI-Qを約950 ml 入れる。 DMEM  
のパウダーを1パック加え、パックの内部に残っているDMEMもMILLI-Qですすいで加える。  
攪拌して溶解する。

3.7 gのNaHCO<sub>3</sub> を添加しさらに攪拌する。

全て溶けたら、使用時のpHより0.2-0.3低いpHに、1N NaOH または1N HCLで調製する (フィルタ  
ー滅菌によりpHが上がるため。DMEMの場合通常約2 mlの1N HCLを添加しpH7.2に調製)  
pH調整後、容量を1Lにする。

速やかに、フィルター滅菌を行う(Steritop : Millipore SCGVS05RE)。

\*\*\*\* PBSの調製法 \*\*\*\*

培養細胞専用の1,000 mlメスシリンダーにMILLI-Qを約950 ml 入れる。  
PBSのパウダーを1パック加え、パックの内部に残っているPBSもMILLI-Qですすいで加える。  
攪拌して溶解し、pHを確認する(通常pH7.4くらいになる)。  
容量を1Lにし、速やかにフィルター滅菌を行う(Steritop : Millipore SCGVS05RE)。

(d) 血清

通常細胞培養を行う際は、培地に血清を添加して使用する。使用する血清と濃度は細胞によって異なる。

HeLa細胞には calf serumはGibco 16170-078 を、fetal calf serumにはGibco 16000-044を使用。

通常10 mlの滅菌チューブ (EIKEN)に分注し、- 30°Cで保存。

非働化が必要な場合は、56°Cで30分処理して使用する。

(e) 細胞をはがす

試薬: Trypsin-EDTA (Gibco)  
0.25% Trypsin (Gibco)  
10 mlずつ15 ml conical tube (IWAKI) に分注し - 30°Cで保存  
その他の道具: ラバーポリスマンなど

(f) 器具類

ディッシュ: 10 cm dish (IWAKI , Corning), 6cm dish (IWAKI , Corning),  
coating dish (IWAKI , Corning)  
ピペット: glass pipet (1ml , 5ml , 10ml , pasteur) 乾熱滅菌  
disposable sterile pipet (5 , 10, 20 ml etc.)  
チューブ: disposable conical tube (15ml , 50 ml ; IWAKI)

(g) 使用済み器具の処理

ピペット: 水をはったバケツに集め、ピペット塔に浸ける前に一度水道水ですすぐ。  
ビン: 水道水で軽くすすいだあと、洗剤を少し入れて水道水で満たす。

(2)細胞培養

接着細胞の培養について一例を示す。

通常の培養は10 cm dishで行う (medium volume 10 ml)。

細胞の継代は細胞ごとに異なり、また実験スケジュールにもよるので、異なる細胞密度で2種類ほど継代しておくのがよい。

またあまり継代を行わず長時間培養を行うと細胞のトランスフォームがおきることがある。

異常な細胞が認められたら、凍結ストックから新たに起こし直す。本研究室には、-152 °C deep freezerに様々な培養細胞の凍結ストックがある。

(a) 細胞のメンテナンス

全体の大まかな流れ

remove--wash--harvest --collect--centrifuge --spread

\*\*\*\*HeLa cellのメンテナンス方法\*\*\*\*

培地をアスピレートで除く。

3~5 ml PBS (37°C) で洗う。

1.5ml Trypsin-EDTA (37°C, Gibco)を加える

1~3 minインキュベートする(37 °C , CO2インキュベーターで)。

緩やかに攪拌。

5mlの培地を加え15ml conical tubeに細胞を回収。

遠心1500 r.p.m で3~5 min。

上清をアスピレーターで除き、1~2mlの培地でサスペンドする( 37°C)。

細胞浮遊液を新しいディッシュにまく (medium volume ; 10 ml medium)。

(例; 3 drops of cell suspension from a pasteur pipet are about 0.2ml volume)

ディッシュを緩やかに攪拌し、細胞をまんべんなく広げる。

(3) 凍結ストックの作製

(a)必要なもの

DMSO

1.5 ml cryovial

stock box ( 発泡スチロールボックス -80°C, プラスチックボックス -152°C)

(b)凍結ストックの作製方法

80~90 % confluentの細胞、5~ 20 デッシュ ( 10 cm dish ) 分を回収し沈澱させた細胞にストック溶液 (培養培地 + 7.5~10 % DMSO)を加えサスペンドした後に、1.5 ml cryovial に0.5~1mlずつ分注する (cell density :  $0.5\sim 1.5 \times 10^6 / \text{tube}$ )。

チューブを発砲スチロールのボックスに入れ、-80°Cで1~7日保存する。

ストックチューブをプラスチックボックスに移し、-152°C deep freezerで保存する。

リストを作製しておく。

ストックの作製本数は、必要に応じて決めるが、通常10本以上作製するのがよい。ただし作業は手早く行うこと。

(c)凍結細胞の起眠

37°Cに温めた水を100 mlビーカーに用意する。

-152°Cのフリーザーからストックチューブを取り出し、直ちにビーカーに入れ解凍する。

37°Cに温めた培地を5ml、15 ml conical tube( tube 1 )に入れる。

溶解した細胞の浮遊溶液をtube 1 にパストゥールで入れる。

ピペッティングで混ぜ、1500 rpm. で5分遠心する。

アスピレーターで上清を除き、新しい培地 (37°C)を添加する。  
ピペッティングで混ぜ、1500 rpm. で5分遠心する。  
1~2 mlの培地 (37°C)を添加しピペッティングでゆっくり混ぜる。  
10 cm dish (10 ml 培地)にまく。  
CO2インキュベータへ。

参考文献

組織培養の技術 基礎編(朝倉書店)  
応用編