

DT40 細胞培養

Fukagawa 020711

1. 培地

1.1 Medium の作成

*Medium 粉末は 4°C 保管、1 年

室温にて、粉末を 4hr 以上、DDW で溶かす。(ビタミンなど難溶)

*ろ過滅菌 0.2 μm

フィルターをいったんぬらすと空気が通らないはず。ろ過終了後、空気を押し込み空気が通らないこと(=穴があいていないこと)を確認。

* ~500ml ずつボトルに分注し、4°C 保存。

培養用のボトルは、他の試薬用のボトルから転用しては、ならない。medium を使い切ったら、すぐ、水洗いする。洗剤は使用しない。作成日付記載。

1.2 個人用 Medium の作成

*使用する medium に記名、日付を書く。medium が作成後、1カ月以上、経ているとき には、L-Glu.を添加。(L-Glu stock solution (100×)、分注-20°C 保存、1×L-G/u の濃度は、2mM=0.292mg/ml)

*500ml medium に下記のを添加

FCS (Fetal calf serum)、非働化したもの(1-3 参照) : 25ml (f: 5%v/v)

Chicken serum : 5ml (f: 1%v/v)、非働化不要

β-ME (×1000 stock, -20°C) : 0.5ml

抗生物質(ペニシリン+ストレプトマイシン): 5ml

1.3 FCS

*購入時にロットチェック: 5%FCS w/o chicken serum で、DT40 を 0.3、3、30 cells/well/96 well plate まき、細胞のクローニング効率を見る。もっとも良いものを大量購入。

*血清は、-20°C 保存→一本だけ、4°C 保存。急いで溶かそうとして-20°C からいきなり H₂O bath に入れるとびんが破損する可能性。血清および血清入り medium はよく混ぜてから使用する。

*非働化 55°C、30' 処理←30' は血清をよく混ぜ温度が 55°C に達してから。

<非働化の目的> ・補体(complement: 細菌、カビ、異種細胞の膜にチャンネル様の構造物を作ることにより、穴をあけるタンパク)の不活化。・ウイルスの滅菌。

5%ぐらいだと必ずしも必須ではない。逆に細胞増殖に必要なタンパクを不活性化する可能性もある。

*血清がないと DT40 は、3hr で死ぬ。medium を混ぜ、泡が残るか否かで、medium へ血清添加を確認、Chicken serum がないと著しく cloning efficiency が低下する。

*細胞を抗体(蛍光)で染色する時に PBS に 1~5% の血清を添加する。細胞の生存を上げるのと同時に、チューブなどの壁への、細胞の付着を抑制する。

1.4 β-ME(還元剤)

*リンパ球系の細胞培養に良い結果、機構不明。必ずしも DT40 には必要ない。

市販: 14.3M、stock solution(×1000).

-20°C 保存、4°C に移した時に日付記載、1M で使い切る。

final conc: 5×10^{-5} M, 1M 毎に medium に添加する。

1.5 培地の PH

*medium の PH 暖衡能を増加させるため、炭酸 Buffer が medium に含まれ、それが Incubator 中×CO₂ と平衡状態にある。

*medium 中の CO₂ を逃がさないようにふたを固く閉める。ボンベの CO₂ 圧力を確認。恒温槽の CO₂ メーターは、H₂O で saturate された状態でないと正しく機能しない。恒温槽の H₂O(滅菌 DDW)の有無を確認。

*medium 中に PH インジケーターが入っている。

PH ↓ (酸)黄、PH ↑ (アルカリ)紫

PH ↑ は、PH ↓ よりも細胞に対して toxic

停電前には細胞をフラスコに移し、CO₂ が平衡状態になった後ふたを固く閉める。

2. その他の培養用試薬

* PBS (-)・・・Ca²⁺と Mg²⁺(付着細胞をデッシュから剥がす時に使うトリプシンを阻害)を含まない Dulbecco 処方リン酸緩衝食塩液。

組成: NaCl 8.00 g/l
KCl 0.20 g/l
Na₂HPO₄ 1.15 g/l
KH₂PO₄ 0.02 g/l

上記量を再蒸留水に溶解し、120°C、20 分間高压蒸気滅菌する。

* PBS 等のリン酸 Buffer は、Bacteria 等が、はえやすい。Ab staining Buffer など、非無菌的に使用するものには、NaN₃ (ソディウムアザイド、10%wt/vol. stock at RT, f: 0.1~0.05%) を添加する。

* Trypan Blue (f: 0.2~0.3%、市販)。細胞をカウントする時、Cell:トリパンブルー=1:1<=で混ぜる。3 分以内にカウント。死細胞は青染。分注し、4°C 保存。短期間の保存の時には室温保存でなるべく無菌的に使う。

* 一般に凍結保存する試薬は、分注しておく。

* BrdU (細胞周期解析) は 4 度で遮光保存。

* 細胞カウント用のビーズは、よく混ぜてからチューブより取る。

* ストック溶液をコンタミさせない。いったん取った溶液はストックに戻さない。

3. 滅菌

* 乾熱滅菌 160°C x ≥ 90 min, 180°C x ≥ 60 min

ガラス器具表面の RNase を死活化するのにも使用。

* オートクレーブ(水蒸気滅菌) 121°C、≥ 20 min、2 気圧

個々の試薬は、オートクレーブできても、混ぜた状態では、高温高压下で化学反応を誘発するので、オートクレーブできないことがある。オートクレーブ前に蓋を緩める。

* 金属、白熱するまで焼く。

* 70% ETOH につけた後、乾くまで燃焼。引火しないように注意。

* Filtration

0.20 μm filter (ただし、マイコプラズマでは、完全には除けない。)

0.45 μm filter でも通常 OK、血清など高分子の多いもののフィルトレーションは、目の粗いプレフィルターをまずかける。DNA などはフィルターでトラップされる可能性。

* Filtration をかけられない極く少量の液の滅菌

数滴の Ether 添加後、vortex → Ether 除去のためクリーンベンチ内でふたを開けたまま 2~3 時間、放置する。

4. 細胞培養

* DT40 は、10³~10⁶/ml の範囲で培養する。>3X10⁶/ml だと急に死滅する。

* 維持培養の時には、FCS 節約のために、なるべく 5% (chicken serum 1%) で培養する。

* クリーンベンチ

UV を使用前に必ず消す。火をつける時には、必ず Blow On、そうしないと高温で天井の Air filter を傷める。

風が、ベンチ内で上から吹いていることを考慮して、手を、開けた dish などの上にかざさない。

培地をこぼしたら、よく拭きとり、70% エタノールを吹きかけ、さらに拭いておく

* ピペット

ピペットは実験後、すぐにピペット洗浄器に移す。

5. 無菌操作

* 清潔と不潔の間に距離をおく。

6. frozen stock

* log. phage の生きのいい細胞を frozen cell preparation に使う。冷蔵庫に入れるまでは、できるだけ手早く

操作する。

* -80 度では半年ぐらいいしか frozen stock が生存しない。不要な細胞ストックは、-80 度から、できるだけ除く。

* liquid N2 に stock する時には

(1) 細胞株別と(2)タンク別の両方のノートに必要事項を記載する。特に、凍結細胞を起した時には、ノートから、そのストックの記載を削除するか、新たに凍結細胞を同じ場所にストックし直す。

* 細胞の凍結の時には徐々に行い、凍結細胞を起す時には速やかに溶かす。(T cell など frozen しにくい細胞は、1. DMSO の濃度を凍結-融解の際にそれぞれ徐々に上げ、下げする。2. DMSO は酸化されやすいので、分注し、-80°C 保存する、などの対策がある)

* 凍結保存時の cell 密度は、($10^5 \sim 10^6$ /ml)

* cell は、継代中に性質が変わりやすい。したがって clone を樹立した時、あるいは、他の研究室よりもらった時に、多量の frozen cell を用意し、継代している細胞は、2-3 ヶ月毎に捨て、新しい frozen cell を起こして実験に使っていったほうが良い。

例: Atm 欠損細胞は染色体が不安定であるので継代中に細胞の性質が変化しうる。

* 液体 N2 量確認

* 停電の時には -80°C にドライアイスを入れる。

* 生きのいい状態で凍結する。

6. CO₂ incubator と培養室を清潔に保つ

* medium をこぼしたら、完全にふきとる。→アルコール(70%)でふく。

DDW を代える。Detergent (SDS 等)を入れておく。

* もしコンタミが特定の incubator で続くようであれば、壁と天井の金属板をはずす。

→乾熱滅菌、室内をアルコールでふく、業者に頼んで滅菌。

* コンタミを起こした dish/flask は、すみやかに除去。

ふたを CO₂ incubator 内で開けない。(孢子などが飛散)、流しで全部、洗い流してしまう。

* Aspirator

消毒液か Detergent を予めボトル(トラップ)に入れておく。

実験が終わったらアルコールをチューブに流す。

* ゴミ

medium 等がこぼれないようにする。

* マイコプラズマで感染(すぐに増殖しないので感染に気が付かない)

つば、汗等に含まれる常在菌、0.2 μm filter を透過。

抗生物質があるとなかなか増えない。抗生物質を除いて1週間ほど培養後に PCR, Hybridization などで Check、陽性→抗マイコプラズマで薬剤を入れる。