

細胞の培養方法

【各細胞の培養方法について】

各細胞株の培地、酵素、希釈率等は Cell Line Catalog 中のデータシートをご参照ください。

【培地交換または継代について】

通常、細胞株は 3~4 日に 1 回培地交換または継代を行います。しかし、付着が不十分な場合や、光沢のない細胞が 90%以上である場合、細胞の状態が悪い場合などには培地交換や継代を行わずに培養を続け、1 週間程度細胞の状態を観察してください。この間、状態が良くなってきたら継代または培地交換を行い、状態が悪い場合でも 1 週間程度経過したら培地交換を行ってください。

【当センターで使用している培地・試薬のメーカー一覧】

DMEM	Gibco #11965-092
G418	Gibco #11811
GIT	和光純薬工業 #398-00515
Ham F12	富士フィルム和光純薬 #087-08335 or Sigma #N6658
HAT	Gibco #21060-017
IMDM	Sigma #I3390
EMEM	富士フィルム和光純薬 #051-07615 or Sigma #M4655
RPMI-1640	富士フィルム和光純薬 #189-02025 or Sigma #R8758

培地交換の方法

【付着細胞の場合】

古い培地を吸引して捨てる。

↓

新しい培地を加える。

【浮遊細胞の場合】

ピペッティングにより細胞浮遊液を懸濁し、遠心チューブに移す。

↓

1300 rpm、5 min 室温で遠心分離する。

↓

上清を吸引除去する。細胞ペレットを吸引しないように注意する。

↓

交換前と同量の培地を加え、細胞を懸濁し、培養容器に播種する。

継代の方法

【0.25%トリプシン/PBS の場合】

古い培地を吸引して捨てる。

↓

PBS(-)で細胞表面を洗い、吸引して捨てる。(×2)

↓

0.25%トリプシン/PBS を少量 (φ 50mm ディッシュ : 0.5ml、φ 35mm ディッシュ : 0.2ml 程度) 加え、37°Cで約 5 分間インキュベートする。

↓

ディッシュ底面を軽くたたき細胞をはがす。顕微鏡ではがれたことを確認する。

(トリプシン処理の時間が長過ぎると細胞の生存に影響する。)

↓

血清入り培地を加えトリプシンの活性を止める。ピペッティングで細胞をディッシュからはがし、同時に単離細胞にする。

↓

適当量の培地を加えて希釈し、細胞浮遊液を培養容器に播種する。

↓

細胞をインキュベーターに戻す。

*培地を抜いた際に培養面を乾かさないようにしてください。乾燥すると細胞が死んでしまいます。

*EDTA を用いた継代において、継代の希釈率が 1/10 よりも低い場合は EDTA が高濃度で残存しないように、細胞を遠心により 1 回洗浄してから播種するようにしてください。

*細胞が剥がれないときには…

1. 酵素処理の時間を延長する
2. 細胞表面を洗う回数を増やす
3. トリプシンの濃度を上げる

【浮遊細胞の場合】

ピペティングにより細胞浮遊液を懸濁し、遠心チューブに移す。

↓

1300 rpm、5 min 室温で遠心分離する。

↓

上清を吸引除去する。細胞ペレットを吸引しないように注意する。

↓

適当量の培地を加えて希釈し、細胞浮遊液を培養容器に播種する。

↓

細胞をインキュベーターに戻す。

*血球系の浮遊細胞の場合、細胞密度が低下しすぎると細胞の状態が悪化する場合があります。また、ハイブリドーマの場合は細胞が増殖しすぎるとすぐに細胞の状態が悪化する場合がありますためご注意ください。