

初代細胞/方法

解凍－単核細胞および造血前駆細胞

- 10% FBSまたは1% BSAを含む培地を温めます。単核細胞および造血前駆細胞には、DNase I (20 U/ml) も添加してください。*
 - 37°Cの水槽で凍結細胞のバイアルを速やかに解凍します。70%のエタノールでバイアルの外側を清拭します。
 - 最大2 mlの細胞懸濁液を50 ml円錐チューブに無菌的に移します。100万個以下の細胞に対しては、15 ml円錐チューブ使用します。
 - バイアルを1 mlの培地ですすぎます。円錐チューブをゆっくりと回しながら、細胞にすすいだ培地を加えます(約1分)。
 - 培地を数滴追加する度に、総量が5 mlになるまで、チューブゆっくり回しながら十分な量の滴を細胞に徐々に追加します(約3分)。
 - 培地を数滴追加する度に優しくチューブを回しながら、1~2 ml量の培地滴を追加して、ゆっくりとチューブを満たします(約5~10分)。
 - 細胞懸濁液を室温で200 x gで15分間遠心分離機にかけます。
 - ピペットで上清の大部分を慎重に除去し(2本目のチューブに保存して)、細胞塊がくずれないように少量だけ残します。残りの培地にある細胞塊を再度ゆっくりと懸濁します。50 mlチューブを使用している場合は、細胞を15 ml円錐チューブに移して、50 mlチューブを5 mlの培地ですすぎます。チューブをゆっくりと回しながら、洗浄液として使用した5 mlの培地を、細胞懸濁液に追加します。
 - 1~2 mlの量の培地を追加して、その度そっとチューブを回しながら、ゆっくりとチューブを満たします。
 - 細胞懸濁液を室温、200 x gで15分間遠心分離機にかけます。
 - 洗浄液として使用した培地2 mlのみを残して、ピペットですべての中身を慎重に除去します。残りの培地2 ml内の細胞塊をゆっくりと再懸濁させ、細胞数をカウントします。細胞数が予想よりも少ない場合は、手順8で保存された洗浄用培地をより高速で遠心分離機にかけ、細胞数をカウントし、必要に応じて上記の細胞群に追加します。
 - 細胞を37°Cおよび5% CO₂条件下で1時間静置します。2度目の細胞数カウントを行います。これで細胞を培養する準備が整いました。
- * DNaseを追加する場合は、10%FBSおよび20 U/mlのDNase I (Sigma D 4513) を含む20 mlの培地を調製してください。DNaseを含む培地を使用して、上記のように細胞を希釈します。細胞を遠心分離機にかけ、手順8を繰り返します。