

接着細胞型 – 継代

継代培養試薬の保存方法

1. 継代培養試薬は滅菌フィルターをかけた後、発送されるまで-20℃で保管されます。
2. 継代培養試薬は輸送中に解凍する可能性があります。一度であれば再凍結が可能です。
3. 一旦解凍して再凍結した継代培養試薬は-20℃で有効期限まで保管できます。
4. 解凍後、トリプシン/EDTAの鮮度と活性を保つために、滅菌遠心分離用チューブに小分けして-20℃で再凍結できます。トリプシン/EDTAは有効期限まで凍結状態で保存できます。
5. 一旦4℃まで解凍されたHEPES-BSSおよびトリプシン中和液は、1ヶ月以内に使用するようお勧めします。

準備

以下は25 cm²フラスコを使用する場合の手順です。その他のサイズのフラスコでは、適宜全体量を調節してください。

最初のフラスコを継代培養する準備

6. 60~90%コンフルエントで、全体に多くの分裂核を含む場合、細胞を継代培養します。
7. 継代培養される25 cm²の細胞
 - a. 2 mlのトリプシン/EDTAを解凍し、室温に戻します。
 - b. 7~10 mlのHEPES緩衝生理食塩溶液 (HEPES-BSS) を室温に戻します。
 - c. 4 mlのトリプシン中和液 (TNS) を室温に戻します。
8. 4℃から増殖培地を取り出し、そのまま室温になるまで置きます。
9. 新しい培養容器を用意します。
 - 9.1. 1~3本のT-75フラスコを準備します。必要なフラスコ数は、細胞のコンフルエンスと総収量によって異なります。その後の継代培養に使用されるプラスチック容器と時間を節約するために、大きめのフラスコを使用できます。小さなフラスコを使用すれば、培養の多くを失うリスクを軽減できます。
 - 9.2. 前回と同様、各フラスコには継代数、ロット番号、細胞型、日付を明記したラベルを貼ります。
 - 9.3. 無菌環境で、注意深くボトルを開封し、フラスコの表面5 cm²毎に1 mlの増殖培地を追加し、新しい培養容器に増殖培地を移します。

例：75 cm²のフラスコ 15 mlの増殖培地

 - 9.4. 通気口付きキャップを使用していない場合は、フラスコのキャップを緩めてください。新しい培養容器を、5% CO₂、37℃の加湿培養器に入れ、少なくとも30分間平衡化します。一度に継代培養するのは1つのフラスコのみにしてください。最初のフラスコの後のすべてのフラスコは、本プロトコルのうちの最適なもの（本手順の後半で説明されます）に従って継代培養します。これは計算された細胞数、生細胞率、播種密度に基づいています。

注記： Clonetics™トリプシン/EDTAのみを使用してください。他の販売業者のトリプシン/EDTA濃度は、ロンザ製品の10倍に達する場合があります。これはClonetics®の細胞に悪影響を与えます。

無菌環境において：

（例としてT-25フラスコを使用。他のフラスコではその容量に比例して使用量を増やします）。

10. 培養容器から培地を吸引します。
11. 細胞を5 mlの室温のHEPES緩衝生理食塩溶液 (HEPES-BSS)ですすぎます。この手順は必ず行ってください。培地にはトリプシンを中和する様々なタンパク質が含まれています。
12. フラスコからHEPES-BSSを吸引します。
13. 2 mlのトリプシン/EDTA溶液で細胞を覆います。
14. キャップを締めて顕微鏡下でフラスコのモニターを始めます。
15. 顕微鏡で細胞層を継続的に確認します。
 - 15.1. 約90%の細胞がラウンドアップするまでトリプシン処理が継続するようにします。

注記： ラウンドアップされた細胞は球状で、滑らかな境界面をもち、屈折性があるか光沢を帯びています。細胞にフラスコに接着する突出した結節が存在する場合、トリプシン処理をさらに必要としています。このプロセス全体にかかる時間は細胞型によって異なりますが、概ね2~6分です。

15.2. この時点で、手のひらでフラスコを軽く叩き、細胞の大部分が培養表面から剥がれ落ちるようにします。剥離した細胞がわずかしかない場合は、トリプシン処理の時間が足りなかった可能性があります。30秒待って、再度フラスコを軽く叩きます。細胞がまだ剥離しない場合、30秒待って軽く叩く動作を繰り返します。

注記： 強く叩くことによってすべての細胞を一度に剥離しようとしないでください。細胞を損傷させるおそれがあります。

16. 細胞を剥離後、4 mlの室温のトリプシン中和液でフラスコ内のトリプシンを中和します。細胞の大部分が7分以内に剥離しない場合、トリプシンが十分温められていないか、または細胞を剥離させるほど十分な活性がありません。上記のように培養容器から細胞を回収し、新鮮で温かいトリプシン/EDTA溶液で再度トリプシン処理を行うか、またはトリプシン中和液ですすいでから新鮮で温かい培地を培養容器に追加後定温に戻し、新しいトリプシン処理試薬を利用できるようにします。
17. 剥離した細胞を滅菌 15 ml 遠心分離用チューブにすばやく移します。
18. 2 ml の HEPES-BSS でフラスコの最終的なすすぎを行い、残余細胞を回収します。その後、すすぎに使用したこの液体を遠心分離用チューブに追加します。
19. 細胞の回収が行われたフラスコを顕微鏡下で観察し、残った細胞数を確認して細胞率を確認します。細胞の残存量は5%未満となるようにしてください。

接着細胞型 – 継代

続き

20. 回収した細胞を220 X gで遠心分離します。5分間の遠心で細胞を沈殿させます。

20.1. 100 µl~200 µlを除き、上清の大部分を吸引します。

20.2. 指で遠心分離用チューブを軽く叩き、沈殿物を懸濁させます。

21. 4 ml~5 mlの増殖培地で細胞を希釈し、希釈した細胞懸濁液の総量を記録します。

注記：取り扱っている細胞から最良の結果を取得するには、トリパンブルーで細胞収率や生細胞率を評価してください。

22. 血球板または細胞カウンターで細胞数をカウントし、総細胞数を計算します（上記の手順を参照）。後で使用するために、細胞の収量を記録します。

注記：細胞懸濁液は、最高精度で250,000~1,000,000細胞/mlとなるはずですが。

23. 必要に応じて、浮遊液をHEPES緩衝生理食塩液（HEPES-BSS）で適切な「細胞/ml」に希釈し、細胞を再カウントしてください。

24. トリパンブルーを使用して生細胞率を評価します。

25. 以下の式を使用して、生細胞の総数を算出します。

細胞カウント総数×パーセント生存 = 総生細胞数

例：1,000,000細胞×60% = 600,000生細胞

26. 以下の式を使用して、細胞を播種するフラスコの総数を算出します。必要なフラスコ数は、細胞の収量や播種密度によって異なります。大きなフラスコを使用すれば、その後の継代培養で使用されるプラスチック容器や時間を節約できます。小さなフラスコを使用すれば、汚染が発生した場合に、培養の大部分を失うリスクを軽減できます。

推奨播種密度は、フラスコでは2,500細胞/cm²、3,500細胞/cm²または5,000細胞/cm²であり、ウェルプレートでは10,000細胞/cm²です。

$$\frac{\text{総生細胞数}}{\text{推奨接種密度} \times \text{フラスコサイズ}} = \text{総フラスコ数}$$

$$\frac{600,000 \text{ 生細胞}}{75 \text{ cm}^2 \times 2,500 \text{ 細胞/cm}^2} = \text{T-75 フラスコ 3つ (75 cm}^2 \times 2,500 \text{ 細胞/cm}^2 \text{ の端数が切り捨てられて最も近い整数になります)}$$

27. 以下の式を使用して細胞懸濁液量を計算し、フラスコに播種します。

$$\frac{\text{希釈細胞懸濁液の総量}}{\text{手順17で指定されたフラスコ数}} = \text{播種量}$$

$$\frac{4.3 \text{ mlの希釈細胞懸濁液}}{\text{T-75 フラスコ 3つ}} = 1.43 \text{ ml/T-75 フラスコ}$$

28. 各フラスコに継代数、ロット番号、細胞型、日付を明記したラベルを貼って準備します。

29. 培地ボトルを慎重に開封し、フラスコ表面5 cm²毎に1 mlの増殖培地（1 ml / 5 cm²）を追加することによって、増殖培地を新しい培養容器に移します。

30. 75 cm²フラスコに対して15 mlの増殖培地

31. 5 mlのピペットで希釈細胞を攪拌して懸濁液を均一化した後、上記で計算された液量を、用意した継代培養用フラスコに移します。

32. 細胞を入れたフラスコを軽く振って、細胞が容器内にまんべんなく行き渡るようにします。

33. 通気口付きのキャップを使用していない場合は、フラスコのキャップを緩めてください。新しい培養容器を5% CO₂、37°Cの加湿培養器に入れます。