

初代細胞培養・培地

培地準備

はじめに

培地や細胞の調製を開始する前に、以下の手順に従ってください。

1. 無菌環境を用意します。
 - 無菌環境は、アクセス用前面開口部とフィルター付き層流通気口をもつ、クラスIIの生物学的に安全なキャビネット、または同等の装置から構成されます。
2. 必要な培地量を決定します。
 - 使用する培地量を決定するには、表「プラスチック容器の増殖面積」を確認してください。
[377ページ参照]
3. 必要な滅菌器具と容器
 - 使い捨て滅菌血清用ピペット
 - マイクロピペットおよび滅菌ピペットチップ
 - マルチチャンネル容量可変ピペットまたはリピーティングピペット
 - マルチチャンネルピペットとセットで使用する滅菌容器
 - 15 ml遠心分離用滅菌チューブ
 - 細胞培養フラスコ、またはマルチウェル/平底組織培養プレート
 - 血球板または細胞計数器
4. その他に必要なもの
 - 70%アルコール（エタノールまたはイソプロパノール）
 - 増殖培地（細胞型特異的なもの）
 - 防護用手袋および衣類
 - トリパンプルー
5. 初期セットアップを計画して準備します。
 - 製品添付の「試験成績書」に記載された細胞数に基づいてセットアップを行います。
6. 加湿培養器の目盛りを確認します。培養器は加湿し、5% CO₂、95%空気存在下、37°Cに設定してください。

培地準備

続き

無菌環境で以下の手順を実行

必要な添加因子をすべて加えた培地で、以下を実行します。

1. 必要に応じて、ウシ脳抽出物 (BBE) またはウシ脳下垂体抽出物 (BPE) を500 ml ボトル入りの基本培地に添加します。
2. 培地ボトルからBBEまたはBPE添加因子を取り外します。
3. エタノールまたはイソプロパノールでバイアルおよび培地ボトルを消毒します。
4. バイアルの中身すべて (約2 ml) をピペットで培地に添加します。培地でバイアルをすすぎ、ピペットで中身を500 mlボトルに戻します。
5. キャップを交換し、培地ボトル数回軽く回転させて混合します。
6. 培地ボトルのラベルに、BBEまたはBPEが添加された日付を記入します。調製済みの「完全培地」は30日以内に使用してください。添加因子をすべて加えたこの培地は「増殖培地」と呼ばれます。

BulletKit™ 培地では以下の手順を実行してください。

1. SingleQuots™ 冷凍保存バイアルと基本培地ボトル外表面をエタノールまたはイソプロパノールで消毒します。
2. 各冷凍保存バイアルを無菌的に開封し、ピペットで全量を基本培地に添加します。
3. 培地で各冷凍保存バイアルをすすぎます。各冷凍保存バイアルの記載量を全量を回収できない可能性もありますが、最大10%を失った場合でも、添加因子を加えた培地の細胞増殖特性に影響することはありません。
4. 各キットに同梱されているラベルを添加因子入りの基本培地ボトルに貼ります。これを使用して、添加された各添加因子の分量と日付を記録します。混乱や重複した添加を避けるために、基本培地ラベルの上に記入したラベルを重ねて貼るよう推奨されます。
5. 製品の期限に基づいてラベルに新しい有効期限を記録します。完全に調製したBulletKit™は30日以内に使用してください。添加因子をすべて加えたこの培地は「増殖培地」と呼ばれます。

注記: 添加過程において無菌状態が損なわれたおそれがある場合は、完全に調製した増殖培地全体を再度フィルターにかけて、無菌性を確保できます。再度フィルターにかける場合は0.2ミクロンのフィルターを使用してください。各フィルター作業においてタンパク質の一部が失われる可能性があるため習慣的にフィルターすることは推奨されません。

プラスチック容器の増殖面積

フラスコ	効果的な増殖面積	培養に必要な培地量	2,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	3,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	5,000 cells/cm ² の時の使用細胞数
T-25	25 cm ²	5 ml	62,500	87,500	125,000
T-75	75 cm ²	15 ml	187,500	262,500	375,000
T-150	150 cm ²	30 ml	375,000	525,000	750,000

ディッシュ	効果的な増殖面積	培養に必要な培地量	2,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	3,500 cells/cm ² の時の使用細胞数	5,000 cells/cm ² の時の使用細胞数
35 mm	9.6 cm ²	2 ml	20,000	28,000	40,000
60 mm	21 cm ²	5 ml	52,500	73,500	105,000
100 mm	55 cm ²	11 ml	137,500	192,500	275,000
150 mm	148 cm ²	30 ml	370,000	518,000	740,000

マルチウェルプレート	ウェル当たりの効果的な増殖面積	培養に必要な培地量 (ウェル当たり/ 全量)	10,000 cells/cm ² にするために最初に必要な細胞数
6 ウェル	9.60 cm ²	2 ml / 12 ml	96,000
12 ウェル	3.80 cm ²	1 ml / 12 ml	38,000
24 ウェル	2.00 cm ²	0.5 ml / 12 ml	20,000
48 ウェル	0.75 cm ²	150 µl / 7 ml	7,500
96 ウェル	0.32 cm ²	100 µl / 10 ml	3,200