

マウスES細胞培養法

■ 培養容器のゼラチンコート法 ■

ES細胞の培養には、ゼラチンコートした培養容器が必要です。

- ①ゼラチン溶液(注文Cat.No. R-ES-006B)を培養溶液に応じた液量添加し、培養容器に良くなじませた後、室温で4時間静置する。
- ②4時間後、ゼラチン溶液を吸い取り、D-PBS(注文Cat.No. R-BSS-1006B)で洗浄する。
- ③十分風乾させ、冷蔵庫(4℃)で保存する。なお、コート済みフラスコは3ヶ月間使用可能である。

培養容器	ゼラチン溶液添加量(mL)	PBS 添加量(mL)
75cm ² Flask	4mL	4mL
25cm ² Flask	2mL	2mL
100mm Dish	4mL	4mL
60mm Dish	2mL	2mL
6well Plate	1mL	1mL
12well Plate	1mL	1mL
24well Plate	1mL	1mL
96well Plate	0.5mL	0.5mL

■ 培養液の調製 ■

次の組成になるように培地を調製する。なお、調製した培地は、4℃で1ヶ月保存可能。長期保存は-20℃(半年)。

A:フィーダー細胞用培地

D-MEM(注文Cat.No. R-SLM-021B)
 +10%FBS(注文Cat.No. R-ES-009B)
 +1%Pen-Strep. (注文Cat.No. R-TMS-AB2-C)
 +1%Glutamine(注文Cat.No. R-TMS-002C)

B:ES細胞用培地(下記成分調製済み培地:注文Cat.No.R-ES-101)

D-MEM(注文Cat.No.R-SLM-220B)
 +15%FBS(注文Cat.No. R-ES-009B)
 +1%NEAA(注文Cat.No. R-TMS-001-C)
 +1%Nucleosides(注文Cat.No. R-ES-008-D)
 +110 μM 2-Mercaptoethanol(注文Cat.No. R-ES-007-E)
 +1%Pen-Strep. (注文Cat.No. R-TMS-AB2-C)
 +1%Glutamine(注文Cat.No. R-TMS-002C)
 +500U/mL LIF(随時添加でも可能:R-ES-101は添加済み 注文Cat.No. R-ESG1106)

なお、ES細胞用培地でフィーダー細胞を培養することが可能です。

2種類の培地を準備することが煩雑な場合には、ES細胞用培地のみをご準備いただいても特に問題ありません。

■ フィーダー細胞の作製 ■

ES細胞の培養には、予めフィーダー細胞を準備しておく必要があります。ES細胞の融解、継代の1日前には、必ずフィーダー細胞を準備します。

- ①9mLの培地を15mLの遠心管に入れる。
- ②フィーダー細胞(注文Cat.No. R-PMEF-NまたはNL、R-PMEF-HまたはHL、R-PMEF-CFまたはCFL)を液体窒素から取り出し、37°Cの湯浴中で迅速に融解する。
- ③操作①の遠沈管に融解したフィーダー細胞を移し、ピペッティングで混和する。
- ④100×gで1分間遠心する。
- ⑤上清を除き、沈査に1mLの培地を添加する。
- ⑥ゼラチンコートした培養容器に適切な細胞数を播種する。(下記表参照)
- ⑦37°C、5%CO₂下で培養する。
- ⑧翌日、細胞の生着を確認し、培地交換を行う。

注意: 上記のように作製したフィーダー細胞は、培地を3日おきに交換することにより1週間は維持できます。作製から1週間以上経過したフィーダー細胞は、使用しないでください。マイトマイシン未処理のフィーダーをご使用の際には、マイトマイシン10 μg/mLで3時間処理してください。

培養容器	培養面積(cm ²)	播種する細胞数	培養液
75cm ² Flask	75	3.75 × 10 ⁶	15mL
25cm ² Flask	25	1.25 × 10 ⁶	5mL
100mm Dish	56	2.8 × 10 ⁶	10mL
60mm Dish	21	1.0 × 10 ⁶	6mL
6well Plate	9.5	4.75 × 10 ⁵	3mL
12well Plate	4	2.0 × 10 ⁵	2mL
24well Plate	2	1.0 × 10 ⁵	1mL
96well Plate	0.32	1.5 × 10 ⁴	0.5mL

■ ES細胞の融解 ■

- ①ES細胞を液体窒素から取り出し、37°Cの温湯中で迅速に融解し、15mLの遠心管に移す。
- ②操作①の遠心管に1mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ③操作②の遠心管に2mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ④操作③の遠心管に4mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ⑤100×gで1分間遠心する。
- ⑥上清を除き、沈査に1mLのES細胞用培地を添加し、細胞数を測定する。
※細胞数を測定している間の細胞浮遊液(遠沈管)は、氷冷しておくこと。

- ⑦ 1×10^6 cells/Flaskになるように細胞数を調整し、フィーダー細胞上に播種する。
- ⑧ LIFを500IU/mL添加する。(培地に添加済みの場合は不要)

■ ES細胞の継代 ■

- ① 毎日培地交換を行い、LIFを500IU/mL添加する。(培地に添加済みの場合は不要)
- ② 3日培養後に培養液を除き、PBS(注文Cat.No. R-BSS-1006-B)を5mL添加して細胞層を洗浄する。
- ③ トリプシン/EDTA溶液を0.5mL添加して、30秒静置した後、トリプシン/EDTA溶液を除く。この操作で、フィーダー細胞が剥離し、ES細胞のみがフラスコに残る。
- ④ 2分間静置してES細胞の剥離を顕微鏡で観察後、培地を5mL添加する。
- ⑤ 遠心管に移し、ピペティングを20回程行い、シングルセルにする。

※この操作を怠ると、細胞が凝集して細胞数の測定が困難になり、細胞の接着率も下がる。

- ① $100 \times g$ 1分間遠心して、細胞数を下記表のように調製しフィーダー細胞上に播種する。
- ② 培地交換を毎日行い、3日おきに継代を繰り返す。

※ES細胞は代謝が活発なため毎日培地交換すること。また、3日以上維持すると分化能が低下する。

培養容器	培養面積 (cm ²)	播種する細胞数	培養液
75cm ² Flask	75	3.0×10^6	15mL
25cm ² Flask	25	1.0×10^6	5mL
100mm Dish	56	2.5×10^6	10mL
60mm Dish	21	1.0×10^6	6mL
6well Plate	9.5	4.0×10^5	3mL
12well Plate	4	2.0×10^5	2mL
24well Plate	2	1.0×10^5	1mL
96well Plate	0.32	1.5×10^4	0.5mL

■ ES細胞の凍結 ■

- ① 培養2日目に培養液を交換する。
- ② 培養3日目の対数増殖期にあるES細胞を継代操作と同様の方法で剥離する。
- ③ $100 \times g$ で1分間遠心して、凍結保存培地(注文Cat.No. R-S-002-Dまたは注文R-ES-002-D)で 5×10^6 cells/mLになるように希釈する。
- ④ 氷中5分、-20°Cで30分、-80°Cで1昼夜それぞれ静置したのち、液体窒素で保存する。

CEL-1/0807D

【お問い合わせ先】

大日本住友製薬グループ

DSファーマバイオメディカル株式会社

(受注・発注/学術的お問い合わせ先)

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33-94

TEL 06-6386-2164 FAX 06-6337-1606

URL: <http://www.dspbio.co.jp>

E-メール: labopro@bio.ds-pharma.co.jp