

[TS 細胞培養プロトコル]

➤ 試薬

- DMEM/F12 (Wako #048-29785)
- 30% BSA (Wako #017-22231)
- ITS-X (Wako #094-06761)
- L-Ascorbic acid (Wako #013-12061) : 0.03 g/ml Stock (in H₂O)
- VPA (Wako #227-01071)
- 55mM 2-Me (GIBCO #21985-023)
- FBS (GIBCO #16141-079) : 非動化 (56°C30分)
- Penicillin-Streptomycin (GIBCO #15140122)
- PBS (Wako #166-23555)
- TrypLE (GIBCO #12604-021)
- Col IV (Corning #354233)
- EGF (Wako #053-07871) : 100 µg/ml Stock (in 0.2% BSA/PBS)
- A83-01 (Wako #035-24113) : 5 mM Stock (in DMSO)
- CHIR99021 (Wako #038-23101) : 3 mM Stock (in DMSO)
- Y27632 (Wako #036-24023) : 10 mM Stock (in H₂O)
- SB431542 (Wako #031-24291) : 10 mM Stock (in DMSO)
- Cell Banker 1 (Nippon Zenyaku Kogyo #CB011)

➤ 培地の作製

- Inhibitor Cocktail: 1200 µl

3 mM CHIR99021	800 µl
5 mM A83-01	120 µl
10 mM SB431542	120 µl
DMSO	160 µl

Store at -20°C

▫ 基礎培地: 500 ml

DMEM/F12	486 ml
BSA	5 ml
ITS-X	5 ml
Penicillin-Streptomycin	2.5 ml
55mM 2-Me	900 μ l
100 μ g/ml EGF	250 μ l
FBS	1000 μ l
L-Ascorbic acid	25 μ l

Store at 4°C

▫ TS 培地: 10 ml

基礎培地	10 ml
10 mM Y27632	5 μ l
VPA	1.25 μ l
Inhibitor Cocktail	10 μ l

Store at 4°C, Use within one week

➤ 凍結細胞の融解 (10 cm プレートの場合)

1. プレートに 5 ml PBS を加えた後、最終濃度 10 μ g/ml となるように Col IV を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内に 1.5 時間以上置く
2. Col IV 溶液をプレートから吸引し、10 ml PBS で一回洗う
3. プレートに TS 培地を 10 ml 加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 10 分以上平衡化する
4. CELLBANKER にて保存した細胞を 37°C のウォーターバスで融解し、遠心チューブに移す
5. CELLBANKER の 2 倍量程度の基礎培地を加えた後、遠心する
6. 1×10^6 細胞をステップ 3 の TS 培地に懸濁して培養を開始する

➤ 継代方法 (10 cm プレートの場合)

1. 細胞が 70~90% コンフルエントに達したら (培養開始後 2~3 日)、以下の手順で継代を行う
2. プレートを Col IV でコートし、TS 培地を平衡化しておく (細胞培養ステップ 1-3 を参照)
3. 細胞培養中のプレートから培地を除去し、TrypLE を 5 ml 加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内に 15 分程度置く

4. 基礎培地 5 ml を加え、細胞をチューブに回収して遠心する
5. 1×10^6 細胞をステップ 2 の TS 培地に懸濁して培養する (Split ratio は 1:4 程度)