

## ！ 培養開始にあたっての注意 ！

培養の開始にあたりましては、以下の点にご留意ください。

### RCB3683 : HL-60

- ・凍結・融解のダメージを受けやすく、回復が遅い細胞です。
- ・融解は必ず1本ずつ行ってください。
- ・融解時間が生存率に大きく影響します。湯浴（37℃）による融解操作の目安は1-2分です。  
操作中、細胞が凍結保存液（含DMSO）に曝される時間をできるだけ最小限に抑え、遠心操作（次項）の後、速やかに新鮮な\*培地に置き換え、（穏やかなピペティングで再懸濁してください）、直ちにインキュベータに移して培養を開始してください。  
\*培地は事前に準備し、室温に戻しておきます。
- ・培養開始前の遠心（DMSOの洗浄）は1000rpm（200 xg 前後）で1回に留め、穏やかなピペティングで再懸濁してください。
- ・遠心機は冷却せずに室温で使用してください。
- ・播種密度が立ち上がりに大きく影響します。裏面のA（写真1、2）を参照  
特に初期は、視野を覆うくらい密度を高くすることも有効です。
- ・融解翌日は生存率が6割程度まで低下します。\*数日程度で回復してきますので、その間は 回収、遠心、培地交換、継代 等、細胞への物理的ダメージや培養環境を変えるような操作（培養細胞の代謝によって生じた馴化培地が除去される あるいは 希釈される 等）は行わず、少量の培地を足す程度に留め、裏面のC（写真5、6）位まで増殖するのを待ってから、最初は 1:2 ~ 1:4 位を目安に希釈して継代 を行って下さい。  
\*回復までに必要な日数は融解操作の影響によって変動します。（目安 3~7日）
- ・増殖が安定してくれば 1:4 ~ 1:8 の希釈で継代が可能です。  
その後の維持培養ではオーバーグロス（密度過剰）にもご注意ください。

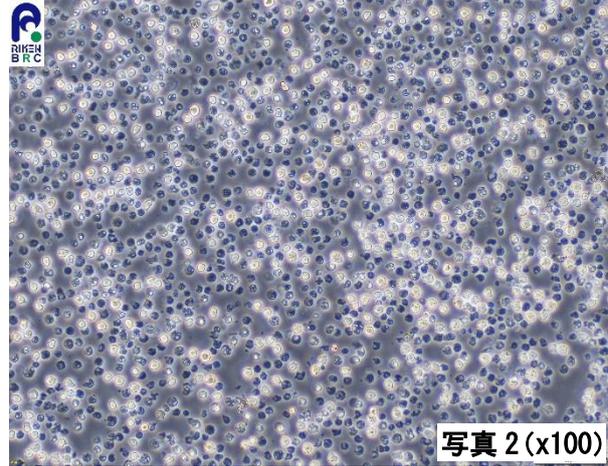
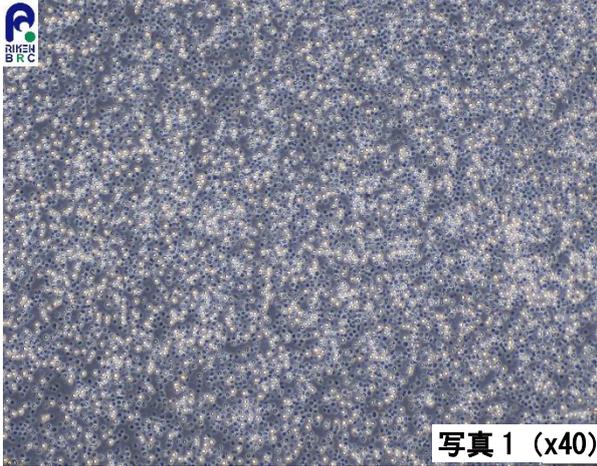
[→ 裏面に融解~継代のタイミングまでの写真があります]

【お問い合わせ】 [cellqa.brc@riken.jp](mailto:cellqa.brc@riken.jp)

**A**

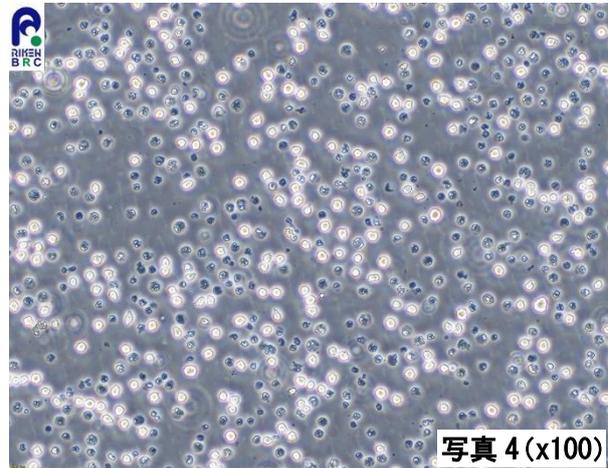
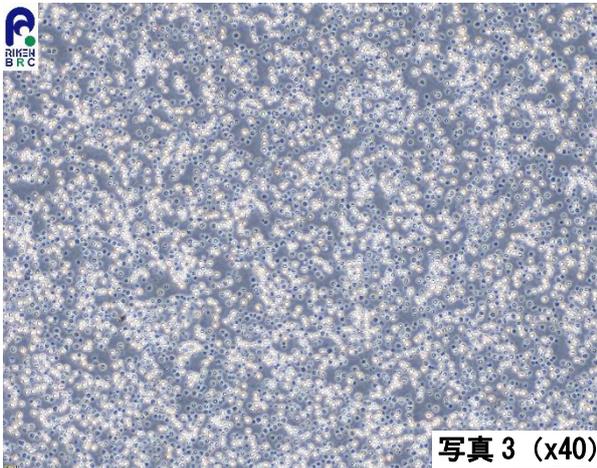
融解翌日  
生存率が6割程度まで低下する

※ 多くの死細胞が観察されます。融解から間もない段階では生き残った細胞の中に いびつな形 や 萎縮しているもの が含まれており、これらもまた変性して死んでいきます。

**B**

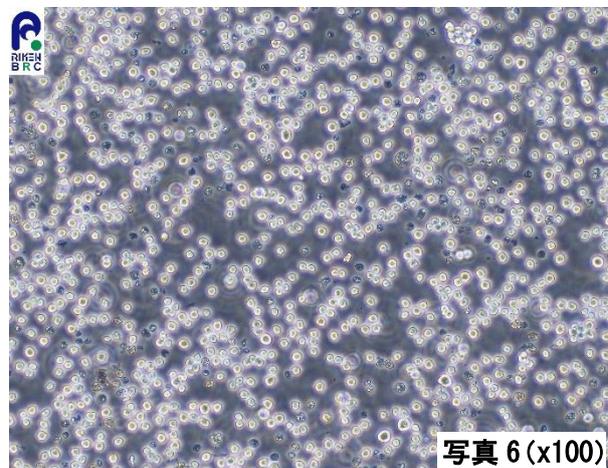
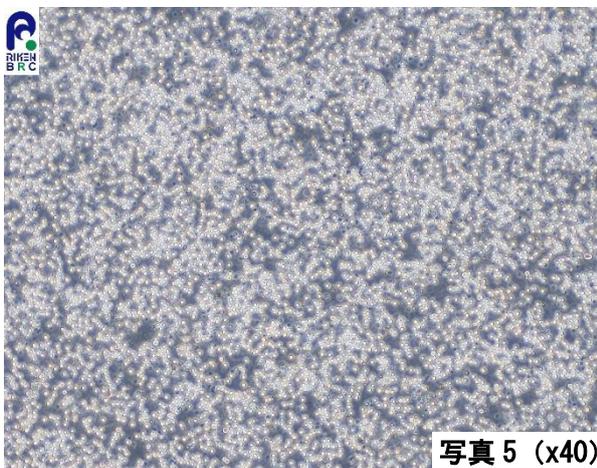
融解3日後  
ようやく増殖が感じられる程度に回復する

※ 死細胞は徐々に形態が崩れ、培地に溶けて分散していきます。生き残った細胞が回復し増殖を始めると、輪郭がはっきりとした球形に近い細胞の割合が徐々に増えていきます。

**C**

融解6日後  
活発な増殖像が観察され、細胞が回復する

※ 死細胞の割合は徐々に減少します。代わって光沢の強い増殖細胞が数を増し、視野を埋めていきます。下の写真位まで増殖すれば、最初の継代のタイミングです。



※重要 A~Cの期間は 回収、遠心、培地交換、継代 等、細胞への物理的ダメージや培養環境を変えるような操作（培養細胞の代謝によって生じた馴化培地が除去される あるいは 希釈される 等）は行わない。