

培養開始にあたっての注意

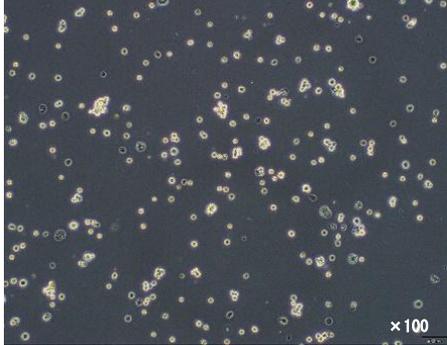
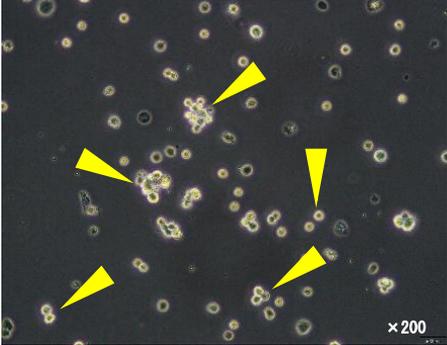
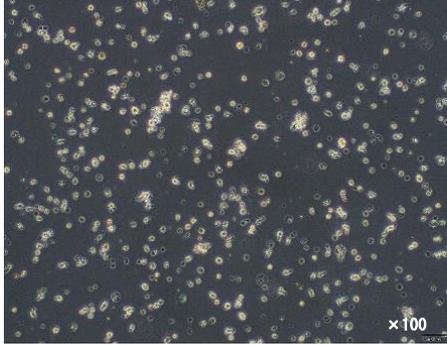
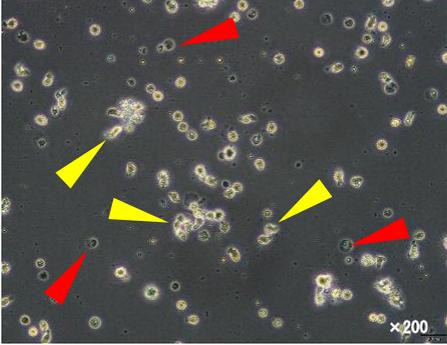
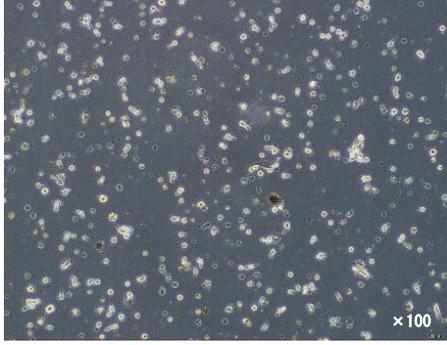
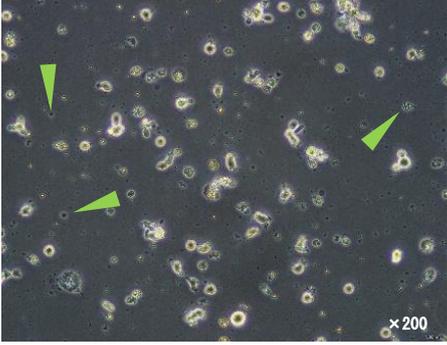
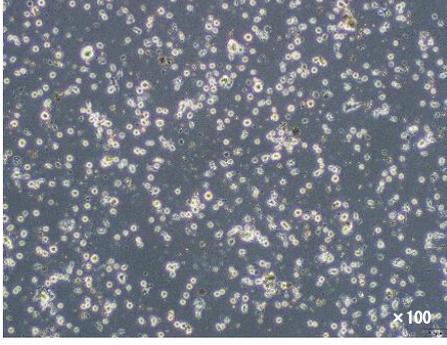
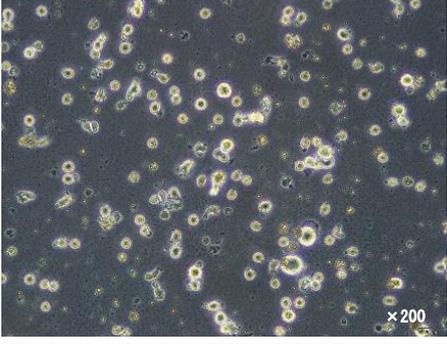
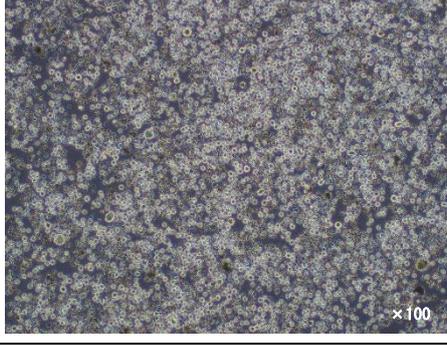
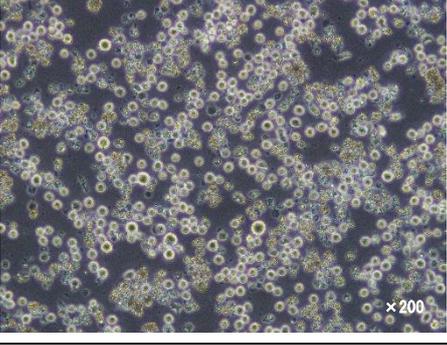
RCB5684 : MDS92 は、通常の多くの細胞とは異なります。

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。

- ・ 増殖が非常に遅く、安定培養が困難な細胞です。
緩徐に増殖しながらも、多くの細胞は分化が進行し死滅しますので、フラスコの中の細胞の半分は死細胞です。
このため、細胞の破片等が多くみられ、コンタミネーションのように見えることがあります。
- ・ 凍結、融解時にダメージを受けやすい細胞です。
融解は必ず1本ずつ行い、できるだけ短時間で操作を完了して、速やかにインキュベータに移してください。
- ・ 凍結融解により多くの細胞が死んでしまいますので、
培地 4mL に懸濁し、2mL ずつ T12.5cm²flask 2 本に播種してください。
増殖が遅く、培養中に培地が蒸発してしまいますので、
必ずフラスコ(ベントキャップタイプ、またはフタを緩めたプラグシールタイプ)を**ご使用**ください。
(Dish や plate は、培養中に培地が蒸発しやすくなるため、不向きです)
- ・ 3～4 日ごとに、IL-3 を新たに 50ng/mL となるように添加してください。
(培地中の IL-3 残存分は考慮しません)
- ・ 融解 1～2 週間後に、T12.5 フラスコ 1 本あたり 0.2～0.5mL の培地と 50ng/mL 分の IL-3 を添加してください。
- ・ 細胞が確実に増殖するようになるまでに、3～4 週間かかります。
それまでは、培養操作はサイトカインのみの添加、または 1～2 週間に一度少量の培地を添加する程度にとどめ、極力細胞に刺激は与えないようにしてください。
- ・ 増殖が安定してきても、1～2 週間に一度継代できるくらいの増殖速度です。(継代密度 1:1.5～2 split 程度)
細胞数が 2×10^5 cells/mL 程度になりましたら、 $1 \sim 1.5 \times 10^5$ cells/mL となるように希釈してください。
- ・ 可能でしたら、定期的にギムザ染色を行い、細胞の様子(種々の成熟段階細胞やアポトーシス細胞の混在、少数ではあるが分裂像の有無)をご確認ください。
継続的に培養しているうちに、増殖細胞がほとんどなくなったり、あるいは逆に細胞の増殖が速くなった場合、幼若細胞が主体となって、本来の MDS 細胞株の特徴を失っている可能性がございます。
(詳細は当室のウェブカタログの掲載写真をご参照ください)

[→ 裏面に融解～継代までの写真があります]

【お問い合わせ】 cellqa.brc@riken.jp

 <p>×100</p>	 <p>×200</p>	<p>融解直後 細胞密度は低いが、球状で光った細胞が見られる。(黄)</p>
 <p>×100</p>	 <p>×200</p>	<p>融解翌日 半数ほどの細胞が死に(赤)、生存している細胞もややいびつな形状になる(黄)。</p>
 <p>×100</p>	 <p>×200</p>	<p>融解 5 日後 融解翌日から増殖している様子は見られない。死んだ細胞の破片等で、小さな黒い点々が見られるが、コンタミネーションではない。(緑)</p>
 <p>×100</p>	 <p>×200</p>	<p>融解 18 日目 3~4 日ごとに IL-3 のみの添加、1 週間に 1 度、少量の培地と IL-3 の添加を行い、少しずつ増殖し始めたところ。 融解後、まだ 1 度も継代は行っていない。</p>
 <p>×100</p>	 <p>×200</p>	<p>継代のタイミング 2 × 10⁵ cells/mL 程度になったら、 1 ~ 1.5 × 10⁵ cells/mL になるように希釈する。 遠心で死細胞を取り除く必要はない。</p>

※HP では、写真を拡大して見るすることができます。

細胞の状態を確認するために、定期的にギムザ染色を行うことをお勧めいたします。

<MDS92 のサイトスピン・メイギムザ染色画像>

(寄託者提供)

A photo of cytospin preparation with May-Giemsa staining.

Most of the cells gradually and spontaneously differentiate into dysplastic neutrophil-like or macrophage-like or apoptotic cells but a small part of the cells retain immature blastic features.

