

Cortical Neuron Primary Culture (by Dr. K. Hayashi 改平井)

初心者用プロトコール

準備編

[カバーガラス (マツナミ 24*24 mm thickness No.1) の洗浄]

1. カバーガラス 30 - 300 枚を200 ml ビーカーにいれ、ミリQ水で数回すすいだ後、超音波洗浄器で 15 min。
2. ミリQ水ですすぐ。
カバーガラスの枚数によっては、ミリQ水を交換してさらに超音波で 15 min。
3. 99 % EtOH 200 ml で 1 回すすぐ。
4. 99 % EtOH 200 ml を入れ、超音波洗浄器で15 min - 30 min。
ビーカーはアルミはくでふたをする。
5. 99 % acetone に置換後、クリーンベンチ。
6. オートクレーブしたキムワイブをひろげ、火炎滅菌したピンセットで 1 枚ずつカバーガラスをキムワイブ上におき、風乾。
一部でも欠けたガラスは使用しない。

[前日] [コーティング処理] (翌日使用する分のみ (30 枚 / 胎仔 11 - 14 匹))

1. Polyethylenimine 1 % 溶液 3 ml を 0.15 M borate buffer (pH 8.4) 12 ml で 5 倍に希釈。
(オリジナル : 4 保存の 10 % PEI soln. を 50 倍に希釈。)
2. 3.5 cm シャーレ (ノンコート) に洗浄済みカバーガラスを1枚ずつ入れ、0.2 % PEI 溶液約 500 μ l をカバーガラスに表面張力で盛り上がるようにのせる。
500 μ l より少なくてもよいが、カバーガラスの4角にも試薬が渡るように、また、できるだけカバーガラスの裏に試薬がまわらないようにする。
4 で 1 晩静置。

[前日] [妊娠 20 日目ラットを今井動物に注文]

[前日] [レンズペーパー 2 枚をホルダーにセットしてオートクレーブ]

オートクレーブ終了後、湿っていても乾燥器には入れない。
乾燥器に入れると、フィルターがめくれてしまう。

Reagent

- 1% PEI : Polyethylenimine (Sigma#P-3143) を 0.15 M Borate Buffer (pH 8.4) で 50 倍に希釈。
0.22 μ m filtration, フィルターはすぐにつまるので、何回も交換。室温保存。
- CGBD : DLシス테인 (和光特級) 20 mg, BSA 20 mg, glucose 500 mg, DNaseI (BoehringerM 組織培養用 1284932) 1 mg, PBS 100 ml, 0.22 μ m filtration, 5 ml ずつ分注、-20 保存。
- MEM Medium : MEM (Gibco#61100-053) 1袋, glucose 5 g, pyruvic acid 110 mg, NaHCO₃ 2.20g, 1M HEPES (pH7.4) 10 ml, penicillin-streptomycin (Gibco#15140-122) 5 ml, 水を加え 1 l とし, 0.22 μ m filtration, クリーンベンチ内ペリスタポンプ。
- 血清 : 凍結標品はゆっくり解凍し、56 , 30 min、非働化処理。
40 ml ずつ分注後、-80 で保存。
- Ara-C stock soln : cytosine -D-arabino furanoside hydrochloride (Sigma#C-6645) 50 mM / dW
使用時 10⁴ 倍に希釈。
- パパイン : Worthington Biochemical #3126, 45 U ずつに分注して 4 保存。

当日編

[カバーガラスの洗浄] (クリーンベンチ)

1. coating reagent を火炎滅菌したパスツールピペットで吸引。
カバーガラスに触らないようにして、吸引。
2. dW 0.5 ml ずつをカバーガラスに盛り上がるように載せる。
3. シャーレを傾けながら、パスツールで dW を吸引。
4. dW 1 ml ずつをカバーガラスに載せ、シャーレを傾けながらパスツールで dW を吸引。
5. dW 2 ml ずつをシャーレ全体に入れ、シャーレを傾けながらパスツールで dW を吸引。
6. MEM medium 1.5 ml をカバーガラスに載せ、シャーレ全体に行き渡らせる。
7. 積み重ねて 37 °C、CO₂ incubator。

[顕微鏡周り]

1. Leica M10 および顕微鏡の周りを 70 % EtOH で消毒。
2. 70 % EtOH を入れた 50 ml ビーカーにはさみ(2)とピンセット(1) (白尾先生の缶の中) を漬け、顕微鏡脇に置く。
3. クリーンベンチ内で 3.5 cm dish x 2, 5 cm x 2 MEM medium を適量入れ、氷冷。

[妊娠ラットの帝王切開]

1. エーテル麻酔。(逃げないように入れ物の上を断頭台で押さえておく)
2. 麻酔がきいたら、断頭台の周りに水を流しながら頭を落とす。
3. 体を台所用洗剤で洗い、解剖台の上に置く。
4. 体全体、特にお腹のあたりに入念に 70 % EtOH をかける。
5. ピンセット、はさみもアルコールをかけて、ピンセットでお腹の皮を摘みながら皮を切り、子宮ごと胎仔を取り出し、9 cm シャーレに入れて培養室へ。
6. 頭、体はビニル袋、ピンセット、はさみ、解剖台は軽く水洗して元の場所に。

[大脳皮質の取り出し]

1. 子宮の外から直接頭部を切り取り、シャーレのふたにのせる。
2. 目の辺りをピンセットで押さえながら、小脳の後ろあたりで切る。
3. 頭頂を押して、脳を出し、MEM / 5 cm dish へ。
4. 顕微鏡下、大脳皮質を取り出す。
小脳を左手にして、右から 1/4 位のところではさみを入れると、大脳皮質の下に自然にはさみを入れることができ、これを剥がすと、大脳皮質が得られる。
5. 全部の脳から大脳皮質を切り出したら、余分な組織がついていないか確認して、これを MEM / 3.5 cm dish へ移す。
6. 大脳皮質にかぶっている膜をはぎ取り、もう 1 つの MEM / 3.5 cm dish へ移す。

[細胞の調製]

1. CGBD 溶液 5 ml (-20 °C 冷凍庫) を 37 °C 恒温槽で解凍する。
2. パパイン 45 U を CGBD 溶液に加え、よく懸濁して、37 °C 恒温槽に置く。
3. ウエッセルで大脳皮質を細断し、綿栓付きパスツールピペット (スポイト) で吸引。
できるだけ大脳皮質のみを CGBD 溶液に加え、37 °C 恒温槽で 15 min。
(40 °C 以上にならないように注意)
4. 組織の残りを死体とまとめて組織の部屋の冷凍庫に入れる。
(冷凍庫が一杯になっていたら、動物実験施設 2 階の冷凍庫に捨てに行く)
5. はさみ、ピンセット等を水洗し、水分を紙でよくふき取ってから元の入れ物に戻す。
(洗剤は使わない)

6. パパイン処理が済んだら、上清をブルーチップで吸い取り捨てる。
(アスピレートしないほうがよい)(クリーンベンチ内 100 ml ビーカー 1 コ必要)
7. MEM Medium (no serum) 5 ml で洗い、上清をピペットで吸い取り捨てる。
8. MEM Medium 3 ml とHorse serum donor herd(Gibco#16050-130) 2 ml を加え、
ブルーチップでピペッティング 30 回。
9. レンズペーパーを 2 重にしたフィルターを 50 ml ブルーチューブにのせ、
細胞溶液を濾過。
10. 800 rpm, 5 min.
11. カバーガラスを出し、MEM Medium を全て吸い取る。
12. 上清を捨て、5 % FBS, 5 % HS を含む MEM Medium で 30 ml (胎仔数 11 - 14 のとき)
とし、ガラスピペットでよく攪拌する。
13. Olympus CX2 で細胞数算定。血球計算盤にカバーガラスを密着させる。
細胞溶液をカバーガラスのわきにたらし、毛管現象で吸い取らせる。
3 箇所数え、平均をとる。
14. 1.0×10^6 / ml (100 コ / 16 方眼) となるよう
5 % FBS, 5 % HS を含む MEM Medium を追加。
15. 2 ml / 3.5 cm dish でまき、37 °C CO₂ インキュベーターへ。

[作業終了時]

チップラックはクリーンベンチの外に出す。
アスピレーターに 70 % EtOH を通し、廃液だめを空にする。
クリーンベンチ内を 70 % EtOH でふく。
ガス栓をしめる。

[翌日]

細胞の状態(数)を顕微鏡で確認する。

[5 日目以降]

週に 2 回、0.8 ml 吸い取って、コンディションメEDIUM(アストロ 1 晩)(AraC, 5 μ M 入り)を 0.9 ml 加える。

(オリジナル: 5 日目のみ、メEDIUMの 0.8 ml を吸い取り、AraC 10 μ M の入ったメEDIUMを 0.9 ml 加える。それ以降はメEDIUMの 0.8 ml を吸い取り、AraC 5 μ M の入ったメEDIUMを 0.9 ml 加える。

2 週間以上飼うときは、コンディションメEDIUM(アストロ 1 晩)を使う。)

血球計算盤の数え方(Bürker-Türk型)