

glia-conditioned medium の調製 (初心者用) (by R.Kawai-Hirai)

(グリアの取り方; cortical neuron primary culture と同様にして DMEM で培養した。AraC を加えずに培養していくと、グリア細胞のみになる。詳しくは、細胞構造林先生に)

グリア細胞：液体窒素タンク No.1 - コンテナ No.2 に「アストロ」と表示してある。

1. グリア細胞を取り出し、ぬるま湯 (ca. 37 °C) で完全にとけるまで、解凍。
通常は培養容器 1 に対して、アストロ 1 本 (1 ml)。
(confluent になるのに 1 週間位かかる。急いでいるときは、2、3本使う。)
2. MEM (5% FBS + 5% HS) 20 ml ずつを TissueCultureFlask (Corning#25110-75) 2 つに入れる。
3. 解凍したアストロの全量を綿栓付きパスツールで 8 - 10 ml MEM (5% FBS + 5% HS) / 15 ml チューブに移す。
4. 1,200 rpm, 2 min. (細胞ストックに入っている DMSO 等を取り除くため)
5. 上清をショートパスツールで吸引。
6. スポイト付き綿栓付きパスツールで MEM + serum 1 ml 位をとり、沈殿した細胞を懸濁。2 つのコンテナにだいたい等分に入れる。
細胞を入れたら、フラスコを水平方向に軽く揺する。
7. Olympus CK2 で細胞の数を確認し、37 °C CO₂ インキュベーターに、ふたをゆるめて入れる。
8. グリア細胞をまいて後、confluent になるまでは、2 回 / week 培地交換。
培地交換はフラスコをたてて、ガラスピペットを奥まで入れ、全量(20 ml)を吸い出す。
9. confluent になったら、毎日培地交換して、コンディションメEDIUMとして回収する。
回収するメEDIUMは、培地交換後、24 ± 4 hr のもののみとする。
これはずれた場合は、コンディションメEDIUMとしての回収はしない。
confluent になってから、1 か月回収を続ける。
回収したコンディションメEDIUMは - 80 °C で保存。

細胞：凍結するときはゆっくりだが、解凍はすばやく行う。

MEM (5% FBS + 5% HS) : 滅菌した MEM 培地をガラスメスピペットで所定量測り取り、非働化処理した血清を加える。