

## 培養細胞（株化細胞）の継代 by Yamazaki and Shirao (8/26/08)

1. Working solution を恒温槽で 37 度に加温する。
2. 培養皿を斜めに傾け、パストゥールピペットで培養液を完全に吸い取る。  
(このときパストゥールピペットの先端で培養細胞を傷つけない用に注意すること)
3. 10ml のメスピペットを使い、培養細胞を 0.02%EDTA 入り PBS で静かにリンスする。(2cm 皿で約 2ml、6cm 皿で約 5ml、10cm 皿で約 10ml) この時コンフルエントになっている細胞は剥がれやすいので注意。(サブコンフルエントの細胞を植え次ぐのが原則である。)
4. 次に、0.25%トリプシン (in 0.02%EDTA 入り PBS) 又はトリプシン EDTA (インビトロジェン) を最小量加えて (6cm 皿で約 0.5ml)、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 度でインキュベートする (時間は細胞種による。HEK293 細胞の場合 4~5 分)。
5. 10ml のメスピペットを使い、完全培地(10%FBS)を 10 倍量加えて、血清によりトリプシンの作用を抑えた後、同じピペットを使い軽くピペッティングして(乾いたピペットでピペッティングすると細胞が壁に張り付いてしまう)、遠心管に細胞を移す。
6. 低速遠心機を用いて 800rpm、5 分で遠心分離する。バランスを取るための遠心チューブを入れることを忘れないように注意する)
7. 遠心後、上清の培地をパストゥールピペットで吸引する。
8. 10ml のメスピペットを使い、培地を適量加えてピペッティングにより細胞を解離させる。
9. 細胞浮游液の細胞密度を測定する (細胞密度測定法参照)。
10. 細胞浮游液を目的の細胞密度に合わせて希釈する。(9 番の細胞密度測定をせずに、1/4~1/20 くらいの範囲に薄めて継代を続ける簡便法も可能である)。
11. 細胞培養用ディッシュに均一にまく。

### 備考

- ・ HEK293 は剥がれやすく、COS7 は剥がれにくい。
- ・ コンフルエントになった細胞はその後死滅期に入る。この時無理して継代すると、細胞の性質が異なってしまうことがあるので使ってはいけない。(COS7 の場合、トランスフェクション効率が著しく落ちる細胞になったことがある)
- ・ 細胞液を培養皿に移す段階でなるべく均一に滴下する。培養皿に移してから均一にするためには、廻してはダメで前後左右に動かす。