

第 回 Reaggregation culture 97.6.18

【目的】

ice box を用意 .

DNase 2本 , Dispase 1本を溶解し , on ice .

テーブルにゴミ袋を固定 .

ビーカーに70% エタノールを入れ , ハサミ , ピンセットを浸しておく .

() 日令 Rat 3匹なら60ml シャーレを2枚 , 6匹なら3枚を用意 .

1枚だけはHanksを 9 ml ずつ入れる .

J Kワイパーを数枚サランラップの上に重ねてしき , 70% エタノールでびしょびしょにする .

Rat をビニール手袋をつけた左手にのせ , 70%エタノールを使ってバケツ上で洗う .

両側頸動脈をハサミで切断し (できれば胸部も切開し , 心臓も切る) 1分以上J Kワイパーに押しつけ脱血する .

ハサミで頭皮を鼻先から切り開け , 大脳の下にハサミを進入させ , 脊髄を切断し , 小脳を大脳ごと取り出し , 10ml 入り dish (on ice) 中に入れる .

実体顕微鏡下で , ピンセット2本で髄膜を出来るだけ丁寧にはがし , 小脳だけをHanks dish の中に入れる .

クリーンベンチ内で小ハサミを使って数片にミンチ .

10×Dispase が入っている遠心管内に入れ , 軽く pipetting .

15分間 , 室温静置 .

上清を aspiration off . そして tapping .

10ml DNase を加え , よく pipetting .

on ice 5分 . (正確に)

上清 10ml を静かに吸い , 遠心管に入れる .

1200 rpm 8分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

10ml DNase を加え pipetting .

1200 rpm 5分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

1 回目 Hanks 10mlを加え , pipetting .

1200 rpm 5分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

2 回目 Hanks 10mlを加え , pipetting .

1200 rpm 5分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

3 回目 Hanks 10mlを加え , pipetting .

1200 rpm 5分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

4 回目 Hanks 10mlを加え , pipetting .

1200 rpm 5分 .

上清を aspiration off . そして tapping .

4 回目の時 , cell count . (× 1 0 コ)

1 0⁶コにまるように 1 0 % F B S + D M E M を () ml 加え , pipetting .

tube の口をゆるめてガラスビーカーに立て , incubator へ . (1 2 時間)

cell suspension をのせる 2 時間以上前にラミネンを 80 ul ずつ , PLL カバースリップ上
にのせる .

37 ° C incubate .

incubate した tube を 1200 rpm 8 分 .

aspiration off . そして tapping .

SFCM 10 ml

 insulin.t.s.s. 50 ul

 putrescine 10 ul

 progesterone 1 ul × n を用意しておき , 適量加え , pipetting .

1200 rpm 8 分 .

aspiration off .

さらに 3 ~ 4 ml 加え , ごく軽く pipetting . (cell suspension)

ラミネンをのせたカバースリップを DMEM で洗う . 余分な水分は滅菌濾紙でとる .

35 mm dish に 1 枚ずつ置く .

cell suspension を 150 ul ずつ先端カット yellow chip でのせる .

37 ° C 約 30 分 .

35 mm dish に SFCM 2 ml 加える .

37 ° C incubate . 12 時間後まで観察 .

固定 .