

96 well plate を用いた凍結細胞培養法

群馬大学大学院 医学系研究科 神経薬理学

96 well plate を用いた凍結神経細胞培養手順

◆ Culture medium

Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049)	500 ml
B-27 Serum-Free Supplement (50X) (Gibco, 17504-044)	10 ml
GlutaMAX I (Gibco, 35050-061)	1.25 ml
Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15140-122)	5.0 ml

◆ 1 mg/ml poly-L-lysine / 0.1M ホウ酸バッファー

Poly-L-Lysine (Sigma, P2636-1G) を 1,000 mL の 0.1 M ホウ酸バッファーに溶解し、冷蔵庫 (−20℃) でストックしておく。

*0.1 M ホウ酸バッファー (1000 ml)

Boric acid (WAKO, 021-02195)	3.1 g
Borax (SIGMA, B-9876)	4.75 g

1. 96 well plate の poly-L-lysine (PLYS) coating

- ① 1 mg/ml PLYS / 0.1 M ホウ酸バッファーを解凍し 96 well plate (greiner, µCLEAR, BLACK, ADVANCED TC, Cat # 655986)に 100 µl/well 添加し 37℃, 5% CO₂ で incubation する (2 時間から一晩置く)。
- ② D.D.W 250µl/well で洗い×2 回
- ③ Neurobasal medium (B-27、GlutaMax-I、Penicillin-Streptomycin 不含) 250ul/well で洗い×1 回
- ④ 蓋を開けて乾燥させる (20min)。
- ⑤ 乾燥後アルミで覆って冷蔵庫で保存する。

2. 凍結細胞の解凍・培養開始

- ① 96 well plate に前もって Culture medium を 50 µl 加えて 37℃ incubator に入れておく。
- ② 凍結細胞を液体窒素から取り出し恒温槽 37℃で解凍する (3 min)。
- ③ 凍結細胞 (1 ml) を 50 ml チューブに壁をつたわせてゆっくり移す。
- ④ 1ml の Culture medium で細胞の入っていたチューブをリンスし、③のチューブにゆっくり入れる (1 秒に 1 滴)。
- ⑤ ④に Culture medium を 9 ml 加え (1 秒に 1 滴) total 11 ml にする。
- ⑥ 1.0×10^4 cells/well になるよう播種したら、37℃, 5% CO₂ で incubation する (1~2 時間置く)。
- ⑦ 培地交換 (100 µl/well) 後、37℃, 5% CO₂ で incubation する。
- ⑧ 培養 4 日目に AraC を最終濃度 0.2 µM になるように添加する。