

PuREC 株式会社

〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

TEL: 0853-25-3033



## REC 細胞培養プロトコル

培地 : MSC Expansion XFSM MDF1

※使用前に冷蔵暗所にて一晩かけて解凍してください。(急ぐ場合は、常温の水につけて解凍してください。)

洗浄液 : Dulbecco's PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$

剥離液 : TrypLE Select (1x) no Phenol Red (Thermo Fisher, Cat#12563-029)

培養器 : CellBIND 表面処理フラスコ、ディッシュ、プレート (CORNING)

※CellBIND 表面処理培養器を使用しない場合は、接着因子によるコーティングが必要です。

### 準備

凍結バイアルを解凍する前に 15ml チューブに 37°Cに温めた培地 10ml を入れておきます。

1. 凍結チューブを液体窒素タンクから取り出します。
2. ピンセットで凍結チューブのフタを保持して 37°Cのウォーターバスにつけて解凍します。フタのパッキン部分まで浸らないように注意してください。
3. 解凍されたら凍結チューブの表面をエタノールでよく拭いてからフタを開けてください。
4. 1ml の培地を加え、ピペッティングで穏やかに攪拌して、培地を入れておいた 15ml チューブに全量を移してください。

5. 200 x g で 5 分間遠心し、上清を吸引除去後、細胞ペレットを新しい培地に再懸濁しセルカウントを行い、 $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>を目安に播種し、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベータにて、インキュベートしてください。
6. 3 日ごとに培地交換してください。

#### 継代

1. 顕微鏡で観察し、70~80%コンフルエントになっていることを確認してください。
2. 培地を吸引除去し、10ml (100mm ディッシュの場合) の PBS を加えて細胞表面を洗浄してください。
3. PBS を吸引除去し、2ml (100mm ディッシュの場合) の TrypLE Select (1x) を加えて、CO<sub>2</sub> インキュベータで 5~10 分間インキュベートしてください。
4. 顕微鏡で細胞を観察し、細胞が浮き上がってきているのを確認し、必要に応じて、培養容器の側面をそっと指でたたき、貼り付いている細胞を浮き上がらせてください。
5. 5ml (100mm ディッシュの場合) の培地を加え、細胞接着面を洗い流すように懸濁し、全量を回収して 200 x g で 5 分間遠心してください。
6. 上清を吸引除去後、細胞ペレットを新しい培地に再懸濁しセルカウントを行い、新しい培養容器に播種してください。