

## アジア人/白人由来 正常ヒト表皮角化細胞(KJB-100・KJB-101)培養法

### ■適応培地 ■

正常ヒト表皮角化細胞用無血清培地(注文Cat-No.KJB-200)

### ■試薬■

1. リン酸緩衝液(-):PBS(-)
2. EDTA-トリプシン液(0.02%EDTA、0.1%トリプシン)(注文Cat-No.KJB-220)
3. トリプシンインヒビター液(0.1%大豆由来)(注文Cat-No.KJB-230)

### ■培地キット使用方法■

#### 培地の調製方法

- ① 基礎培地と増殖因子(培地と同封)を使用します。
- ② 基礎培地と増殖因子を融解し、37°Cの浴槽中で温める。
- ③ 基礎培地に増殖因子を全量添加し、培地を調製する。
- ④ 調製した培地は冷蔵保存し、3週間以内に使用する。

### ■細胞の受入■

入荷したら直ぐに箱からバイアルを取り出し、液体窒素にて保管する。

### ■細胞の融解■

- ① 凍結アンプルを37°Cの温水中で攪拌しながら、すばやく溶かす。
- ② 融解後、アルコール綿でキャップの周りをよく拭く。
- ③ バイアルを開封し、内容物(細胞懸濁液)を、培地10mLを入れた遠心管に移す。
- ④ 軽くピペティングした後、1000rpmで5分間遠心する。
- ⑤ 上清を除き、ペレットを1mLの培地で懸濁し、25cm<sup>2</sup>フラスコあるいは、60mmシャーレに播種する。

### ■細胞の継代■

- ① あらかじめ培地・試薬類を室温に戻し、容器のまわり特にキャップ付近を70%アルコールでよく消毒する。
  - ② フラスコ内の培地を抜き取る。この際細胞層を傷つけないよう注意する。
  - ③ PBS(-)溶液(EDTA溶液でも代用可能)を加え、細胞層をリンスし、溶液を捨てる。
  - ④ EDTA-トリプシン液(0.02%EDTA、0.1%トリプシン)を2mL 加え、顕微鏡にて細胞を観察する。
  - ⑤ 細胞が丸くなりつつあれば、トリプシンインヒビター液を約2mL加える。
- ※トリプシン処理時間が長いと細胞の状態が悪くなります。通常、1分ほどで処理できます。
- ⑥ パスツールピペットでピペティングして、細胞を剥がし、遠心管へ移す。
- ※遠心管は10~15mL の容量で、先のとがったものをご使用ください。
- ⑦ フラスコに培地を約5mL 加え、残った細胞を懸濁、回収し⑥の遠心管へ移す。
  - ⑧ 100G(約800rpm)で1分間遠心する。
  - ⑨ 上清を捨て、細胞沈査に既知量の培地を加える。(例えば、1mL)
  - ⑩ 細胞をピペティングで再浮遊させ、細胞数を測定する。
  - ⑪ 新しいフラスコに培地5mL(25cm<sup>2</sup>フラスコの場合)を加え、細胞を播種する。

※植え込む細胞数は、 $1 \times 10^5$  cells/mL、または、Split Ratio=1:3

培地量: 25cm<sup>2</sup>フラスコ      5mL  
96wellプレート      100~150  $\mu$ L/well  
24wellプレート      1.0~1.5mL/well

- ⑬ 新しく植え込んだフラスコのキャップをゆるめて、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で培養する。
- ⑭ 翌日、顕微鏡で観察し、培地中に浮遊物が多い場合は、培地を交換する。(以降2日おきに培地交換を行う。)
- ⑮ 細胞がセミコンフルエントな状態になったら、継代する。

#### ■細胞の凍結保存■

当社取り扱い製品の「TCプロテクター(注文Cat.No.TCP-001)」の使用が便利です。

- ① 細胞が80%シート時に培地を交換し、翌日に凍結保存を行う。
- ② 細胞を継代時と同様の方法で、回収し、遠心する。
- ③ TCプロテクターで $1 \times 10^6$  cells/mL となるように懸濁し、凍結バイアルに1-2mLずつ分注する。
- ④ -80°Cのディープフリーザーで凍結する。なお、液体窒素で保管する場合には翌日移す。

CEL-1/0807D

#### 【お問い合わせ先】

大日本住友製薬グループ

**DSファーマバイオメディカル株式会社**

(受注・発注/学術のお問い合わせ先)

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33-94

TEL 06-6386-2164 FAX 06-6337-1606

URL: <http://www.dspbio.co.jp>

E-メール: [labopro@bio.ds-pharma.co.jp](mailto:labopro@bio.ds-pharma.co.jp)