

マウスES細胞培養法

■ 培養容器のゼラチンコート法 ■

ES細胞の培養には、ゼラチンコートした培養容器が必要です。

- ①ゼラチン溶液(メルク社Cat.No. ES006B)を培養溶液に応じた液量添加し、培養容器に良くなじませた後、室温で4時間静置する。
- ②4時間後、ゼラチン溶液を吸い取り、D-PBS(注文Cat.No. CMBSS1006B)で洗浄する。
- ③十分風乾させ、冷蔵庫(4℃)で保存する。なお、コート済みフラスコは3ヶ月間使用可能である。

培養容器	ゼラチン溶液添加量(mL)	PBS 添加量(mL)
75cm ² Flask	4mL	4mL
25cm ² Flask	2mL	2mL
100mm Dish	4mL	4mL
60mm Dish	2mL	2mL
6well Plate	1mL	1mL
12well Plate	1mL	1mL
24well Plate	1mL	1mL
96well Plate	0.5mL	0.5mL

■ 培養液の調製 ■

次の組成になるように培地を調製する。なお、調製した培地は、4℃で1ヶ月保存可能。長期保存は-20℃(半年)。

A:フィーダー細胞用培地

D-MEM(メルク社Cat.No. SLM021B)

+10%FBS(メルク社注文Cat.No. ES009B)

+1%Pen-Strep. (メルク社Cat.No. TMSAB2C)

+1%Glutamine(メルク社Cat.No. TMS002C)

B:ES細胞用培地(下記成分調製済み培地:メルク社Cat.No. ES101)

D-MEM(メルク社Cat.No. SLM220B)

+15%FBS(メルク社Cat.No. ES009B)

+1%NEAA(メルク社Cat.No. TMS001C)

+1%Nucleosides(メルク社Cat.No. ES008D)

+110 μM 2-Mercaptoethanol(メルク社Cat.No. ES007E)

+1%Pen-Strep. (メルク社Cat.No. TMSAB2C)

+1%Glutamine(メルク社Cat.No. TMS002C)

+500U/mL LIF(随時添加でも可能:ES101は添加済み メルク社Cat.No. ESG1106)

なお、ES細胞用培地でフィーダー細胞を培養することが可能です。

2種類の培地を準備することが煩雑な場合には、ES細胞用培地のみをご準備いただいても特に問題ありません。

**■ フィーダー細胞の作製 ■**

ES細胞の培養には、予めフィーダー細胞を準備しておく必要があります。ES細胞の融解、継代の1日前には、必ずフィーダー細胞を準備します。

- ② 9mLの培地を15mLの遠心管に入れる。
- ②フィーダー細胞(メルク社Cat.No. PMEFNまたはPMEFNL、PMEFHまたはPMEFHL、PMEFCFまたはPMEFCFL)を液体窒素から取り出し、37°Cの湯浴中で迅速に融解する。
- ③操作①の遠沈管に融解したフィーダー細胞を移し、ピペッティングで混和する。
- ④100×gで1分間遠心する。
- ⑤上清を除き、沈査に1mLの培地を添加する。
- ⑥ゼラチンコートした培養容器に適切な細胞数を播種する。(下記表参照)
- ⑦37°C、5%CO₂下で培養する。
- ⑧翌日、細胞の生着を確認し、培地交換を行う。

注意: 上記のように作製したフィーダー細胞は、培地を3日おきに交換することにより1週間は維持できます。作製から1週間以上経過したフィーダー細胞は、使用しないでください。マイトマイシン未処理のフィーダーをご使用の際には、マイトマイシン10 µg/mLで3時間処理してください。

培養容器	培養面積(cm ²)	播種する細胞数	培養液
75cm ² Flask	75	3.75 × 10 ⁶	15mL
25cm ² Flask	25	1.25 × 10 ⁶	5mL
100mm Dish	56	2.8 × 10 ⁶	10mL
60mm Dish	21	1.0 × 10 ⁶	6mL
6well Plate	9.5	4.75 × 10 ⁵	3mL
12well Plate	4	2.0 × 10 ⁵	2mL
24well Plate	2	1.0 × 10 ⁵	1mL
96well Plate	0.32	1.5 × 10 ⁴	0.5mL

■ ES細胞の融解 ■

- ①ES細胞を液体窒素から取り出し、37°Cの温湯中で迅速に融解し、15mLの遠心管に移す。
- ②操作①の遠心管に1mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ③操作②の遠心管に2mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ④操作③の遠心管に4mLのES細胞用培地を添加し、1分間静置する。
- ⑤100×gで1分間遠心する。
- ⑥上清を除き、沈査に1mLのES細胞用培地を添加し、細胞数を測定する。
※細胞数を測定している間の細胞浮遊液(遠沈管)は、氷冷しておくこと。
- ⑦1 × 10⁶ cells/Flaskになるように細胞数を調整し、フィーダー細胞上に播種する。
- ⑧LIFを500IU/mL添加する。(培地に添加済みの場合は不要)

■ ES細胞の継代 ■

- ①毎日培地交換を行い、LIFを500IU/mL添加する。(培地に添加済みの場合は不要)



- ②3日培養後に培養液を除き、PBS(メルク社Cat.No. BSS1006B)を5mL添加して細胞層を洗浄する。
- ③トリプシン/EDTA溶液を0.5mL添加して、30秒静置した後、トリプシン/EDTA溶液を除く。この操作で、フィーダー細胞が剥離し、ES細胞のみがフラスコに残る。
- ④2分間静置してES細胞の剥離を顕微鏡で観察後、培地を5mL添加する。
- ⑤遠心管に移し、ピペティングを20回程行い、シングルセルにする。
※この操作を怠ると、細胞が凝集して細胞数の測定が困難になり、細胞の接着率も下がる。
- ⑥100×gで1分間遠心して、細胞数を下記表のように調製しフィーダー細胞上に播種する。
- ⑦培地交換を毎日行い、3日おきに継代を繰り返す。

※ES細胞は代謝が活発なため毎日培地交換すること。また、3日以上維持すると分化能が低下する。

培養容器	培養面積 (cm ²)	播種する細胞数	培養液
75cm ² Flask	75	3.0 × 10 ⁶	15mL
25cm ² Flask	25	1.0 × 10 ⁶	5mL
100mm Dish	56	2.5 × 10 ⁶	10mL
60mm Dish	21	1.0 × 10 ⁶	6mL
6well Plate	9.5	4.0 × 10 ⁵	3mL
12well Plate	4	2.0 × 10 ⁵	2mL
24well Plate	2	1.0 × 10 ⁵	1mL
96well Plate	0.32	1.5 × 10 ⁴	0.5mL

■ ES細胞の凍結保存 ■

- ①培養2日目に培養液を交換する。
- ②培養3日目の対数増殖期にあるES細胞を継代操作と同様の方法で剥離する。
- ③100×gで1分間遠心して、細胞凍結保護液(注文Cat.No. KBTCP001【100mL×1包装】または KBTCP002【10mL×10包装】)で 5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁷ cells/mL になるように希釈する。
- ④-80℃のディープフリーザーで凍結します。なお、液体窒素で保管する場合は翌日に移してください。

※本品は、-80℃のみならず液体窒素下でも保存が可能です。

株式会社 ケー・イー・シー

試薬事業部

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20

(お問い合わせ窓口)

TEL: 06-6435-9747 FAX: 06-6435-9748

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

E-mail: cs-info@kacnet.co.jp