

ラット唾液腺由来上皮細胞 RSMG-1, RSMG-2 の培養法

1. 準備するもの

細胞培養時 (古江美保、
2004.8.24)
テ-7.

培地の保存用瓶：培地を分注して保存する場合、ディスポーザブル・ポリプロピレンの容器に保存する。洗剤を一度でも使用したりリサイクル品ならびにガラス瓶**においては、細胞の状態は悪くなります。

**機械洗浄であれば、可能かもしれませんが、試したことはありません。

基礎培地：基本的な MCDB153 (培地機能性ペプチド研究所) に、L-イソロイシン最終濃度 100.36mg/L、ピルビン酸ナトリウム最終濃度 110mg/L、に調整する**。

**機能性ペプチド研究所にて、特別注文可能。組成表添付します。添付の組成表には、亜セレン酸ナトリウムも含まれていますので (線で消してありますが、) 亜セレン酸を含んだものを特別注文する場合は、以下の添加因子の亜セレン酸ナトリウムを除きます。

ですが、GIBCO の ITS-A (インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ピルビン酸のサプリメント) を使用されるとすれば、亜セレン酸ナトリウムが基礎培地に含まれてないほうが使用者には、簡便と思われます。ただし、当方においては、GIBCO のこれらのものを使用したことはありません。

添加因子：5F**

インシュリン 最終濃度	10 µg/ml
トランスフェリン最終濃度	5 µg/ml
2-メルカプトエタノール最終濃度	10 µM
2-アミノエタノール 最終濃度	10 µM
亜セレン酸ナトリウム最終濃度	10 nM

(ITS-A を使用する場合は、それ以外に、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノールを加えればよいこととなります。亜セレン酸ナトリウムの量が多少異なりますが、これぐらいの濃度差であれば、問題ありません)

EGF-1 (UBI) ** 最終濃度 1ng/ml

**上記の添加因子は、いずれも x100 のものをつくって、使用時調整しています。調整後は、1週間以内であれば、4℃保存で使用可能です。1週間以上は保証できません。

type IA コラーゲン(新田ゼラチン) にてディッシュをコートする。

室温あるいは冷却した PBS にて x100 に希釈したコラーゲンを 3 ml ディッシュに加え、15分以上室温にて静置。

(決して、乾燥させないこと。コラーゲンは自分でコートしたものをを用いるのが好ましい。Precoat されたものでは、細胞はあまりよい状態には保てません。)

2. 細胞を液体窒素から戻す

- (1) 凍結した細胞を 37℃の温浴にてすばやく溶解後、冷 MCDB153 培地 10ml 1に加える。
 - (2) 4℃にて 1300rpm, 3~5min 遠心。
 - (3) 上清を除去。
 - (4) 新しい冷 MCDB153 培地 10ml を加え、ピペッティング。
 - (5) 4℃にて 1300rpm, 3~5min 遠心。
 - (6) 遠心中に、上記のディッシュに入れたコラーゲンを吸引除去。PBS を加え、また、吸引除去（ディッシュは乾かさないようにする）
 - (7) 冷 MCDB153+5F+FGF-1+1mg/ml・fatty acid free BSA（凍結時、あるいは融解時のみ fatty acid free BSA を添加する）に細胞を浮遊させ、コラーゲンコートしたディッシュに播種。
 - (8) 37℃ CO2 インキュベーターにて培養。
 - (9) 2日ごとに MCDB153+5F+FGF-1（室温）**で培地交換する。
- **基礎培地は室温であれば、37℃に暖める必要はない。一般的に行われるボトルごと頻繁に培地を 37℃したものを使用すると、細胞へのダメージは大きい。

3. 継代

サブコンフルエントになったら、継代を行う。細胞密度が過剰になったものは継代できない。

- (1) 培地を吸引。
- (2) 室温 PBS を添加。
- (3) 冷 0.05% trypsin / 0.04% EDTA in PBS を添加。(60mm Dish の場合、0.7 ml を目安に入れる。)
- (4) 室温にて、10分から15分静置。
- (5) 顕微鏡にて、細胞が丸くなっていれば、培地あるいは PBS を少量 (60mm Dish の場合、1ml) 添加して、ピペッティングする。あるいは、セルスクレーパーで細胞を傷つけないようにゆっくりとはがす**。
- (6) 冷 0.1 % soya bean trypsin inhibitor (sigma) in MCDB を 1ml 添加し、すばやくピペッティングする。
**RSMG-2 は特に細胞分散しにくいので、セルスクレーパーで集めるほうがよい。37℃のインキュベーターに入れると、5分ぐらいで細胞は detach しますが、無血清培養の場合、トリプシンによるダメージが大きいので、当方はほとんどの場合、冷トリプシン/EDTA を入れた後は、室温で行っています。
- (7) すばやく冷 MCDB 培地を加え、計約 20ml にて、細胞を集める。
- (8) 4℃にて 1300rpm, 3~5min 遠心。
- (9) 上清を吸引。
- (10) 冷 MCDB 培地を 10ml 添加し、ピペッティングする。
- (11) 4℃にて 1300rpm, 3~5min 遠心。
- (12) 冷 MCDB153+5F+FGF-1 を添加。細胞数をカウントし、 $3 \sim 5 \times 10^5/5\text{ml}/60\text{mm dish}$ の割合で細胞を播種する。(だいたい 1:4 の割合で、細胞を播種する。)

製品番号：IFP0010-02

特注培地

MCD B 1 5 3 培地

細胞培養用

Medium MCD B153

【包装】

1000ml×1本/箱

MCD B153培地¹⁾は、ヒト表皮角化細胞のコロニー様増殖や継代培養に適した基本培地 (MCD B152)²⁾の成分で、FeSO₄を5.0×10⁻⁶Mに、また、ZnSO₄を5.0×10⁻⁷Mに改良した改良された基本培地です。この培地は、ヒト表皮角化細胞を始めとして、種々の上皮系細胞の増殖に優れた基本培地です。

《組成》 mg/L

L-アラニン	8.91	塩酸チアミン	0.34
L-アルギニン塩酸塩	210.67	シアノコバラミン	0.41
L-アスパラギン(一水塩)	15	塩化コリン	13.96
L-アスパラギン酸	2.90	リボ酸	0.21
L-システイン塩酸塩	37.83	ナトレチン二塩酸塩	0.16
L-グルタミン酸	14.7	チミジン	0.73
L-グルタミン	876	硫酸アデニン	72.79
グリシン	7.51	塩化ナトリウム	7597.2
L-ヒスチジン	12.42	塩化カリウム	111.84
○L-イソロイシン	10.36	塩化カルシウム(無水)	3.33
L-ロイシン	65.6	塩化マグネシウム(六水塩)	122.0
L-リジン塩酸塩	18.27	リン酸水素ナトリウム(二水塩)	369.09
L-メチオニン	4.48	○ピルピン酸ナトリウム	110.95
L-フェニルアラニン	4.95	ブドウ糖(無水)	1080.96
L-プロリン	34.54	フェノールレッド	1.17
L-セリン	63.05	HEPES	6700
L-スレオニン	11.9	炭酸水素ナトリウム	1200
L-トリプトファン	3.06	硫酸銅(五水塩)	0.00275
L-チロシン	2.72	硫酸第一鉄(七水塩)	1.39
L-バリン	35.15	硫酸マンガン(一水塩)	0.00011
ピオチン	0.015	モリブデン酸アンモニウム(四水塩)	0.00124
葉酸	0.8	塩化ニッケル(六水塩)	0.00012
イノシトール	18.02	亜セチン酸ナトリウム	0.0050
ニコチン酸アミド	0.037	クイ酸ナトリウム(無水)	0.061
パントテン酸カルシウム	0.238	塩化第一スズ(二水塩)	0.000113
塩酸ピリドキシン	0.062	バナジン酸アンモニウム	0.00058
リボフラビン	0.038	硫酸亜鉛(七水塩)	0.144

《使用法》

本培地は滅菌完全調製済み液体培地です。各種細胞成長因子等を無菌的に添加して細胞増殖用培地としてご利用いただけます。

《保存》

本培地は、冷暗所(2-5℃)保存で有効期間内にご使用いただきますようお願いいたします。ただし、一度開封したり、室温や37℃に放置しますとその期間内でも活性が消失することがありますのでご注意ください。

《使用上の注意》

○本品は動物細胞用培地です。

○室温や37℃に長時間放置しますと有効期限内でも生物活性が失うことがありますのでご注意ください。

○本品は研究用試薬ですので、絶対に人体や臨床診断の目的では使用しないで下さい。

○微量の医薬用外毒物が含まれておりますので飲用しないで下さい。

《参考文献》

- 1) Boyce S. T., and Ham R. G., J. Invest Dermatol. 81: 33-40 (1983)
- 2) Tsao M. C., Walthall B. J. and Ham R. G.: J. Cell. Physiol. 110: 219-229 (1982)

製造販売元

株式会社 機能性ペプチド研究所

〒990-0823 山形県山形市下条町4丁目3-32

TEL 023(646)2525 FAX 023(646)2526

E-mail: service@func-p.co.jp