

JCRB1564 TMNK-1 細胞の培養上の注意

細胞(0.5mL/vial) の解凍

加温した持立変法 MCDB131 完全合成培地(B) 5mL に解凍した細胞懸濁液 0.5mL を混ぜ、遠心は行わず、25cm² flask 1 本で培養を開始する。

翌日、細胞が十分接着・伸展していることを確認し、混合培地(A:B=1:1)で培地交換を行う。

細胞の継代

通常の培養（培地交換や継代）には混合培地(A:B=1:1)を用いる。

また、継代培養の際には Accutase(フナコシ、ICT、AT104)を用いて細胞を剥離する。

細胞の凍結

凍結保存溶液は、持立変法 MCDB131 完全合成培地(B) 90% + DMSO10%とする。

用時調製し、濾過滅菌(Millipore、Millex-GV)した後、細胞懸濁に使用する。

JCRB1564 TMNK-1 用培地の調製

A. 持立変法 MCDB131 基礎培地の調製

純水	984mL
持立変法 MCDB131 粉末培地 ¹	10.35g
HEPES	2.38g
炭酸水素ナトリウム (NaHCO ₃)	3.18g
Penicillin G ²	100,000units
Streptomycin ²	100mg

1M NaOH で pH を 7.2 になるよう調整し、全容量を 1000mL にした後ろ過滅菌する。

B. 持立変法 MCDB131 完全合成培地の調製

持立変法 MCDB131 基礎培地(A) 500mL に下記の 8 種類の試薬を添加する。

EGM-2 SingleQuots (Clonetics, Cat.No.CC-4176)のうち以下のもの

FBS	10mL
Hydrocortisone	0.2mL
rhFGF-b	2.0mL
VEGF	0.5mL
R3-IGF-1	0.5mL
rhEGF	0.5mL
Heparin	0.5mL
(Ascorbic acid、GA-1000 は使用しない)	

0.2M L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate³ 0.5mL
(WAKO cat.No. 013-12061)

細胞を解凍および凍結(10%DMSO)する場合

B の完全合成培地を使用する。

通常の継代培養(培地交換や継代)の場合

B の完全合成培地では、培養中に pH 低下が進み易いので、
A と B を 1:1 で混合した培地を使用する。

¹ JCRB バンクへお問い合わせください。

² 抗生物質(Penicillin、Streptomycin)は、必要に応じて添加する。

³ アスコルビン酸(Asc)は空気酸化を受け易く 37°C1 日後には殆ど無くなってしまう。
そこで安定型に代えた。細胞表面のエステラーゼにより、Asc に変換される。
温めた純水で溶解し、ろ過滅菌後、分注、冷凍保存しておく。