

## 細胞の継代（トリプシン処理）

- 1) PBS(TC)+EDTA とトリプシン、メディウムを用意する。  
(PBS(TC)+EDTA は室温または 37°C に、メディウムは 37°C にしておく)  
(50ml チューブを用意し、ラベルに細胞の名前を書く。)  
HOT PLATE をあらかじめ温めておく。
- 2) アスピレーターで、細胞のメディウムをすべて吸う。
- 3) PBS(TC) +EDTA 10ml で細胞を洗う。  
※PBS(TC)+EDTA をフラスコへ入れるとき、ピペットは中まで入れて、  
取り出すときは触れないように。
- 4) PBS(TC)+EDTA をフラスコを横にしてまんべんなくいきわたらせてからアスピレーターで吸う。
- 5) トリプシンを 2ml/中フラスコに入れ、まんべんなく広げる。  
3ml/大フラスコ
- 6) 37°C の HOT PLATE に 3～5 分おく。(タイマーでカウントアップする)  
(この間にトリプシンをしまう。)
- 7) フラスコを動かしてみ、細胞がはがれたかどうかチェックする。  
(白いぐにやぐにやとしたものがあるかどうか) 顕微鏡で確認。
- 8) 10ml ピペットでフラスコの中の細胞を懸濁して、50ml チューブに移す。
- 9) フラスコの中に 3ml のメディウムを加えて懸濁し、50ml チューブに移す。  
※フラスコの壁側に細胞が残っていればそれをメディウム 3ml で洗い流す。
- 10) 遠心 (1500rpm 2分)
- 11) 上清をアスピレーターで吸う。  
※全部吸わないで、1ml 程度残す。
- 12) タッピングで懸濁する。

- 13) PBS(TC)+EDTA 500  $\mu$  L をチューブに加える。  
5~10 回、ピペッティング。  
うねうねとしたものが無くなれば良い。
- 14) メディウム 500  $\mu$  L をチューブに加える。  
5~10 回ピペッティング。  
うねうねとしたものが無くなるまで。
- 15) フラスコに必要量のメディウムを入れる。(中フラスコ 8ml、大フラスコ 15ml)
- 16) 細胞液を適量 (1/3、1/10 等) 入れる。
- 17) まんべんなくいきわたらせる。
- 18) 37°C インキュベーターへ。
- 19) 不要な細胞液 (50ml チューブに残っている) はアスピレーターで吸う。