

細胞を 35mm dish の Coverslip 上にまく

【35 mm dish に Coverslip を敷く】

- 1) パスツールをアスピレーターにセットし、Coverslip を 1 枚ずつ吸引して 35 mm dish に入れる。
※各 dish に 4 枚ずつ入れて、パスツールで重ならないように並べる。
- 2) 培地を各 dish に 2ml ずつ加えて、Coverslip が浮かないようにパスツールで押す。
- 3) アスピレーターで培地を吸引し、Coverslip を dish に張り付かせる。
※この時、Coverslip が重ならないようにパスツールで微調整する。

【細胞液の作製】

- 1) EDTA PBS と MEM を 37°C のウォーターバスで保温する。
- 2) アスピレーターで、細胞の MEM をすべて吸い、EDTA PBS 10 ml で洗う。
※ フラスコを横にして馴染ませるように洗う。
- 3) アスピレーターで液を全て吸い、トリプシンを 2ml/中フラスコに入れ、
フラスコを横にしてよく馴染ませる。
※ 3ml/大フラスコ
- 6) 37°C のホットプレートに置き 2 分おく。
※目視および顕微鏡で観察して、細胞が剥がれていれば OK
剥がれていない場合は更に 2 分おく。

(この間にトリプシン、EDTA PBS をしまう。)
- 7) 10ml ピペットでフラスコ内の細胞を 5 回程、懸濁して 50ml チューブに移す。
- 9) フラスコに 3ml の MEM を加え、フラスコを横にして共洗いし、
50ml チューブに移す。
- 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。
- 14) PBS 500 μ 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。
- 15) MEM 500 μ 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。
- 16) MEM (中フラスコ 7ml、大フラスコ 14ml) を入れて懸濁する。
- 17) 細胞数をカウントする。
15 μ L をセルカウンターに。
- 18) MEM と細胞の量を算出する。
- 19) 新しい 50ml チューブに必要な MEM を加えた後、必要な細胞液を加える。
- 22) ピペッティングする。

【細胞を撒く】

- 1) Coverslip を敷いた 35ml dish から MEM をアスピレーターで抜き、
細胞液を 2ml ずつ入れる。
- 2) dish をトレーに乗せて、トレーを回すように動かした後、上下左右に動かす。
- 3) 37°C インキュベーターへ。