

# 実験名

## 1 起眠

1. 凍結バイアルを保管容器から取り出し、37C° の恒温槽で溶解する。

**注意** 液体窒素から出してすぐ蓋を少し開け、ショックとなったらすぐ閉める。

**注意** 完全解凍してはいけない。米粒くらい残っている状態で高温層から出し、あとは常温解凍。

2. GM5mL を入れた 15mL 遠沈管にバイアルの中身を移す。

3. 1000rpm で 4 分遠心し、上清を除去する。

4. ペレット ( $1.0 \times 10^5$  cells) を 1mL の GM で懸濁する。

5. GM 4mL を入れた 60mmdish に 1mL を播種する。

**注意** 播きムラができないように、傾けて十分ピペッティングをしてから水平にする。

**注意** その後、縦横に dish を振る。

6. 37°C,5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。

## 2 繼代

1. 2 日間培養後、壁面から GM を除去する。

2. 壁面から PBS3mL で 2 度洗浄する。

3. 0.05% トリプシン/EDTA0.5mL を加える。

4. 37°C,5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 分静置する。

5. GM3mL を加え、dish を傾けながら細胞が剥がれるように 2 度洗い流す。

6. 15mL 遠沈管に全てを回収する。

7. 1000rpm で 4 分遠心し、上清を除去する。

8. 新しい GM2mL を加え、ペレットを懸濁する。

9. トリパンブルー色素排除染色法により、セルカウントを行う。

10. 100mmdish に、 $8.0 \times 10^5$  cells/dish になるように撒く。

11. 37°C,5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。

## 3 繼代

1. 3 日間培養後、壁面から GM を除去する。

2. 壁面から PBS5mL で 2 度洗浄する。

3. 0.05% トリプシン/EDTA1mL を加える。

4. 37°C,5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 分静置する。

5. GM5mL を加え、dish を傾けながら細胞が剥がれるように 2 度洗い流す。

6. 15mL 遠沈管に全てを回収する。

7. 1000rpm で 5 分遠心し、上清を除去する。

8. 新しいGM5mLを加え、ペレットを懸濁する。
9. トリパンブルー色素排除染色法により、セルカウントを行う。
10. 60mm dishに、 $1.2 \times 10^6$  cells/dishになるように撒く。
11. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。