



# 改訂 細胞培養 入門ノート

- 改訂版 序 ..... 井出利憲, 田原栄俊
- 初版 序 ..... 井出利憲

## 事前講義

### 細胞培養の基礎知識を学ぼう！

14

講義 1 ● 細胞培養とは .....	14
講義 2 ● 培養細胞の種類と特徴 .....	15
1 細胞の一般的な性質 .....	15
2 代表的な培養細胞 .....	17
講義 3 ● 細胞培養でよく使う 試薬や器具 .....	19

講義 4 ● 培養室の見学 .....	22
1 培養室の意義 .....	23
2 培養室へ入る前の注意 .....	24
3 まず前室へ入る .....	25
4 無菌室へ入る .....	28

## 解説

■ 継代とPDL .....	16	■ 線維芽細胞と細胞増殖因子 .....	19
■ 癌細胞とトランスフォーム細胞 .....	18	■ 空気(ホコリ)以外のコンタミのルート .....	23
■ 初代培養と株細胞 .....	19	■ クレゾール石けん液の廃液について .....	26

## 第 1 日

### 無菌操作の基本を身につけよう！

34

実習 1 ● 培地替え .....	34
Step 1 前室での準備 .....	37
Step 2 無菌室へ入る .....	38
Step 3 クリーンベンチの用意 .....	40
Step 4 必要なものをクリーンベンチへ 入れる .....	41
Step 5 インキュベーターから細胞を出す .....	43

Step 6 ディッシュの観察 .....	45
Step 7 培地替えのために培地を吸い取る .....	49
Step 8 新しい培地を加える .....	53
Step 9 ディッシュをインキュベーターに しまう .....	57
Step 10 あとしまつ .....	58

解説

■ ピペッター使用の必要性	35	■ コンタミを見つける	48
■ はじめから自分で工夫することの利点と欠点	36	■ ピペット捨てについて	52
■ 殺菌灯についてのQ&A	41	■ クリーンベンチ内での操作について	52
■ ビンのあぶり方	43	■ 一度使用したピペットは再び培地ビンに戻さないこと！	57
■ トレイでディッシュを運ぶときの注意	44	■ 培地をこぼしたら	57
■ 培地の色は重要 (pH 指示薬としてのフェノールレッド)	47	■ ゴミの始末	59
■ 色のついていない培地もある	48		

第 2 日

継代の方法と細胞数の計測法を身につけよう！

62

実習 1 ● 細胞の継代

■ 継代を行う前に知っておくべきこと	62
■ 無菌室へ入る前に準備しておくこと	63
Step1 前準備	64
Step2 無菌室へ入る	66
Step3 細胞の確認と培地の準備	67
Step4 細胞を剥がす	68
Step5 培地を加え、トリプシンの作用を止める	72
Step6 細胞の観察とあとしまつ	75

実習 2 ● 細胞を数える

実習 2-1 裸核にして細胞を数える	77
Step1 核浮遊液の調製	79
Step2 細胞の数え方	81
実習 2-2 裸核にしないで数える	84
■ 生きた浮遊細胞をそのまま数える (細胞を染色しない)	84
■ 生細胞のみを数える (トリパンブルー液を用いた計測法)	85
実習 2-3 ディッシュに付着したままの細胞を数える	87

解説

■ トリプシン/EDTA の溶かし方	65	■ トリプシン/EDTA の持ち込みについて	75
■ 研究室でまとめて作って管理する！	65	■ 継代は最低 2 枚のディッシュにまく	76
■ なぜロット番号まで記録しておくのか	66	■ ラバーポリスマンの使い方	80
■ 新しいディッシュの取り出し方	66	■ アスピレートのやり方	80
■ 前もって観察しておいてから実験を開始すべきである	68	■ クリスタルバイオレット液による核浮遊液の調製について	81
■ 細胞の剥がれ方を観察してみよう	70	■ 細胞の数え方	82
■ 剥がれたところと剥がれていないところの見分け方	73	■ 酔う人が少ない	83
■ ピペティングによる細胞の損傷	73	■ 混ぜた後どのくらい時間をおけば染色されるか、どのくらいの時間保てるか	87
■ 希釈について	74	■ 生細胞、死細胞の見分け方	87
■ ディッシュに均一に分散させるには	74		

## 第3日

# 正確な細胞数をまく技術を身につけよう！

90

### 実習1 ● 細胞浮遊液の正確な分注 …… 90

- 1 実験前に考えておくべきこと …… 90
- 2 正確な分注のしかた …… 91
- Step1 細胞浮遊液をつくり、分注する …… 93
- Step2 細胞を数える …… 94

### 実習2 ● 少数細胞のまき込みによるコロニー形成 …… 95

### 実習3 ● コロニーのギムザ染色 …… 99

- Step1 細胞を固定する …… 100
- Step2 染色する …… 101
- Step3 観察/コロニーを数える …… 102

### 解説

- 1 一般的な懸濁のやり方 …… 94
- 1 コロニーを数える …… 102
- 1 顕微鏡での観察について …… 103

## 第4日

# マルチウェルプレートの扱いとクローニングの方法を学ぼう！

107

### 実習1 ● マルチウェルプレートにまく …… 107

- Step1 カバーグラスをマルチウェルプレートに入れる …… 110
- Step2 細胞をまき込む …… 110

### 実習2 ● 細胞のクローニング …… 112

- Step1 コロニーを選択する …… 115
- Step2 コロニーを回収する …… 117

### 解説

- 1 カバーグラスへまき込むときのポイント …… 111
- 1 ディッシュにカバーグラスを入れて細胞をまく場合 …… 112
- 1 クローニングの目的と方法 …… 113
- 1 どのコロニーを選ぶか …… 115
- 1 必要なコロニーに印をつける …… 116
- 1 細胞は乾かさないように …… 118
- 1 いくつぐらいのコロニーを拾うか …… 120

## 第5日

# 増殖曲線の作成と応用実習にチャレンジしよう！

122

### 実習1 ● 増殖曲線を描く …… 122

- 1 実験操作で注意すべきこと …… 125
- 2 増殖曲線の描き方 …… 127

**実習 2 ● 応用実習** ..... 130

- 実習 2-0 実験材料となる細胞の準備 ..... 130
- 実習 2-1 免疫染色 ..... 131

- 実習 2-2 細胞への遺伝子導入  
(トランスフェクション) ..... 135
- 実習 2-3 放射性同位元素で標識する ..... 138

**解説**

- 増殖曲線についての解説 ..... 126
- カバーガラス上の細胞の洗い方 ..... 130
- カバーガラスを培養器から出して固定する場合 ..... 131
- チミジンをチップで加えるときのコツ ..... 139
- 取り込まれたチミジンの算出法 ..... 140

**特別実習**

**細胞培養に必要な準備を学ぼう！**

**141**

**実習 1 ● 培養室のメンテナンス** ..... 141

- 実習 1-1 培養室の掃除 ..... 141
- 実習 1-2 インキュベーターの掃除 ..... 142
- 実習 1-3 炭酸ガスボンベの交換 ..... 143
  - 1 炭酸ガスゲージの見かた ..... 143
  - 2 炭酸ガスボンベの交換 ..... 143

**実習 2 ● 器具・試薬の滅菌** ..... 145

- 実習 2-1 オートクレーブ ..... 145
- 実習 2-2 乾熱滅菌 ..... 147
- 実習 2-3 濾過滅菌 ..... 147
  - 1 数十 mL までの濾過 ..... 148
  - 2 数十 mL から数百 mL 程度の濾過 ..... 149
  - 3 大量の溶液 (数 L から 10 L まで) の濾過 ..... 150
- 実習 2-4 ガラスピペットの洗浄と滅菌 ..... 150
  - Step1 ピペットの洗浄 ..... 150
  - Step2 ピペットの準備 ..... 151
  - Step3 乾熱滅菌 ..... 151

**実習 3 ● 共通試薬の調製** ..... 152

- 実習 3-1 培地を作る ..... 152
- 実習 3-2 血清を非動化する ..... 155
- 実習 3-3 トリプシン/EDTA を作る ..... 157
- 実習 3-4 血清のロットチェック ..... 158

**実習 4 ● 細胞の管理** ..... 160

- 実習 4-1 細胞を凍結保存する ..... 160
- 実習 4-2 細胞を解凍する ..... 164
- 実習 4-3 マイコプラズマの検出 ..... 166

**● 特別実習を通じて** ..... 168

**解説**

- なぜ綿を詰めるのか ..... 151
- 血清の非動化処理のしかた ..... 156
- 凍傷に対する注意 ..... 165
- 爆発に対する注意 ..... 165
- 温め方：液体窒素が消えたらなるべく急速に解凍する ..... 166