

各種溶液の調製と培地の準備

各種溶液の調製と培地の準備

1. ストック試薬の調製

1) M2液 [調製量 100ml]

塩化ナトリウム	NaCl	0.568	g
塩化カリウム	KCl	0.0356	g
リン酸二水素カリウム（無水）	KH_2PO_4	0.0162	g
硫酸マグネシウム（7水和物）	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0293	g
重炭酸ナトリウム	NaHCO_3	0.0349	g
Hepes		0.4969	g
乳酸ナトリウム		0.261	g
(60%溶液の場合：0.4349g)			
ピルビン酸ナトリウム		0.0036	g
ブドウ糖（Glucose）	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0.1	g
B S A（Crystallized, Sigma A-4378）		0.4	g
フェノールレッド		0.001	g
(0.5%溶液の場合：0.2ml)			

以上を1/10N水酸化ナトリウム(NaOH)溶液でPH調整(PH7.2~7.4)の後、超純水で100mlにメスアップして0.22μmフィルターで濾過滅菌し、スπιツ管に分注して冷凍保存する。

2) 抗生物質（P C-S M混合液） [調製量 1ml] 《調製後約1週間使用可能》

ペニシリン（結晶ペニシリンGカリウム明治、10万単位）	1	本
ストレプトマイシン（硫酸ストレプトマイシン明治、1g力価入）	0.1	g
m-PBS	1	ml

- ①ストレプトマイシン(SM)を0.1g秤量し、ペニシリン(PC)10万単位が入っている小瓶に入れる。
 - ②蓋をしてパラフィルムで覆い、冷蔵保存する。
 - ③使用時に、m-PBS 1mlを加えて混和溶解し、冷蔵保存する。
- ※各種培養液への添加量は、PC-SM混合液が1000倍希釈されるようにする。

3) ヒアルロニダーゼストック [調製量 50ml]

ヒアルロニダーゼ（HYALURONIDAZE）	0.25	g
M2液	50	ml

以上を溶解して0.22μmフィルターで濾過滅菌し、4~5mlずつ滅菌チューブに分注して冷凍保存する。

4) サイトカラシンBストック [調製量 2ml]

サイトカラシンB (CYTOCHALACIN B)	10 mg
DMSO	2 ml

以上を溶解し、15 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

5) シクロヘキシミドストック [調製量 10ml]

シクロヘキシミド (CYCLOHEXIMIDE)	10 mg
TCM-199	10 ml

以上を溶解し、250 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

6) Caイオノフォアストック [調製量 1.91ml]

Caイオノフォア (CALCIUM IONOPHORE)	10 mg
DMSO	1.91 ml

以上を暗所で溶解し、10 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

※Caイオノフォアは遮光の必要があるため、分注したマイクロチューブを各々アルミホイルで包む。

7) ヘキスト染色液

ヘキスト (H33342, 1mg/ml in PBS(-))	10 μ l
m-PBS	1 ml

以上を使用時に混和し、遮光する。

2. 培養液の調製

1) 修正ダルベッコPBS (D-PBS+ピルビン酸ナトリウム+グルコース)

[調製量 1,000ml]

《調製後約1週間使用可能》

a) 塩化ナトリウム	NaCl	8.0	g
b) 塩化カリウム	KCl	0.2	g
c) リン酸一水素ナトリウム (無水)	Na ₂ HPO ₄	1.15	g
d) リン酸二水素ナトリウム (無水)	KH ₂ PO ₄	0.2	g
e) 塩化カルシウム (無水)	CaCl ₂	0.1	g
f) 塩化マグネシウム (六水和物)	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	g
g) ブドウ糖 (Glucose)	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.0	g
h) ピルビン酸ナトリウム		0.036	g

※ a)～d) : PBS(－) 予め調製済みの粉末あるいは錠剤(宝酒造 T900)が市販されている。

a)～f) : PBS(＋) 予め調製済みの培養液が市販されている。

a)～h) : m-PBS 予め調製済みの培養液(GIBCO 12350-021)が市販されている。

- ①超純水約700mlに、PBS(－)(上記 a)～d))を添加し、マグネティックスターを用いて溶解する(A液)。
- ②超純水約100mlに、e)及び f)を溶解し、良く攪拌する(B液)。
- ③A液を攪拌しながら、B液を少量ずつ4～5回に分けて添加し、PBS(＋)とする。
- ④約800mlのPBS(＋)に g)及び h)を加え、完全に溶解して超純水で1,000mlにメスアップする。
- ⑤0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、500mlの滅菌ボトルに入れ冷蔵保存する。

2) 3%CS加m-PBS [調製量 100ml]

m-PBS	97	ml
CS (Calf Serum)	3	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	100	μl

- ①メスシリンダーにm-PBS 97mlを入れ、CS 3ml、抗生物質 100μlを添加して、パラフィルムで蓋をして覆い、転倒混和する。
- ②0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、100mlの滅菌ボトルに入れてインキュベーター内で密栓して保温する。

3) 5%CS加TCM-199 [調製量 50ml]

TCM-199 (25mM Hepes緩衝)	47.5	ml
CS (Calf Serum)	2.5	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	50	μl

- ①メスシリンダーに25mM Hepes緩衝TCM-199液を47.5ml入れ、CSを2.5ml、抗生物質を50μl添加し、パラフィルムで蓋をして覆い転倒混和する。
- ②0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、50mlのカルチャーフラスコに入れて38.5℃、5%CO₂ in airのインキュベーター内で蓋をあけて保温する。

4) C R 1 a a

予めA液, B液の2種のストック液を作製しておく。

☆A液 [調製量 760ml] 《調製後1ヶ月間冷蔵保存可能》

塩化ナトリウム	NaCl	6.7031	g
塩化カリウム	KCl	0.2311	g
ピルビン酸ナトリウム		0.0440	g
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011	g
フェノールレッド (0.5%溶液)		2.0	ml

以上を超純水に順次溶解し、760mlまでメスアップした後、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

☆B液 [調製量 200ml] 《調製後1ヶ月間冷蔵保存可能》

L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	0.5996	g
-----------------------------------	--------	---

超純水に溶解し、200mlまでメスアップした後、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

★C R 1 a aの調製 [調製量 100ml] 《調製後1週間冷蔵保存可能》

A液	76	ml
B液	20	ml
BME Essential Amino Acids (x50)	2	ml
MEM Nonessential Amino Acids (x100)	1	ml
L-Glutamic Acid (17mg/ml20mgを超純水10mlで溶解)	1	ml
BSA (Fatty acid free, SIGMA A-7030)	0.3	g
抗生物質 (PC-SM混合液)	100	μ l

以上を転倒混和 (BSA添加時は静置融解) し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

5) 5%CS加C R 1 a a [調製量 100ml]

C R 1 a a	97.5	ml
CS (Calf Serum)	2.5	ml

以上を転倒混和し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

6) 20%CS加m-PBS [調製量 50ml]

m-PBS	40	ml
CS (Calf Serum)	10	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	50	μ l

以上を転倒混和し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

3. 核移植用試薬の調製と培地の準備（当日に準備する）

1) 融合液 (Zimmerman cell fusion medium) [調製量 100ml]

ショ糖 (Sucrose)		9.5840	g
酢酸マグネシウム (4水和物)	$Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$	0.0107	g
酢酸カルシウム	$Ca(C_2H_3O_2)_2$	0.0016	g
Potassium Phosphate	K_2HPO_4	0.0174	g
Glutathione		0.0031	g
B S A (Fatty acid free, SIGMA A-7030)		0.0010	g

- ① 以上を超純水で100mlにメスアップし、マグネティックスターを用いて溶解する。
- ② 0.22 μ mのフィルターを用いて濾過滅菌し、100mlの滅菌ボトルに入れて室温(25℃)下に置く。

2) 5%CS加TCM-199 [調製量 50ml]

- ① 培養液の作製はP. 38の「2. 培養液の作製の3)5%CS加TCM-199」と同様。
- ② 洗浄用シャーレ、透明帯切開用シャーレおよびインジェクション用シャーレ(体細胞由来の場合)を作製する。
- ③ それぞれのシャーレをインキュベートする。

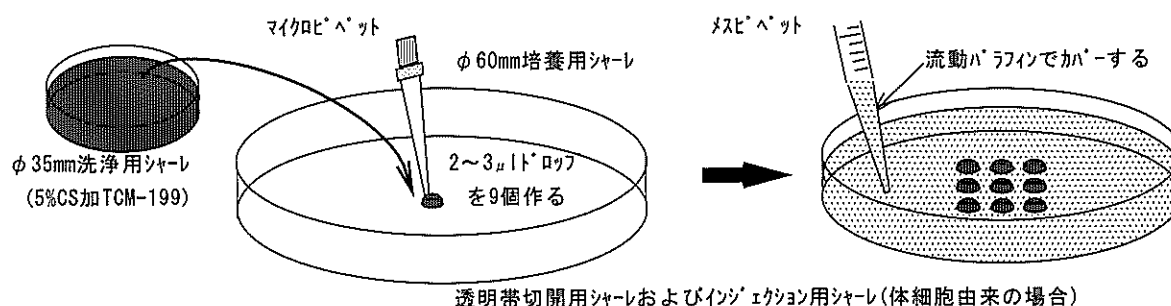


図27. 透明帯切開用シャーレおよびインジェクション用シャーレ(体細胞由来)の作製

3) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシンB in 20%CS加m-PBS [調製量 10ml]

m-PBS	8 ml
CS	2 ml
抗生物質 (PC-SM)	10 μl
サイトカラシンBストック	10 μl

- ①以上を転倒混和後、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌する。
- ②除核用洗浄シャーレと除核用シャーレを作製し、それぞれのシャーレを室温 (25°C) 下に置く。

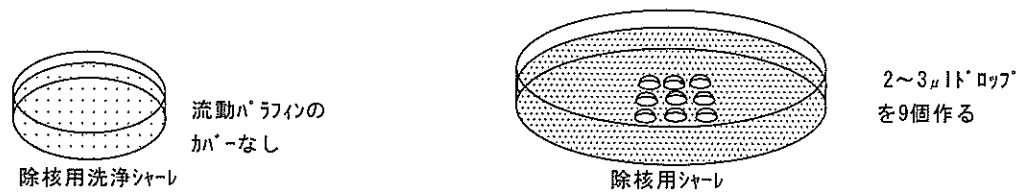


図28. 除核用洗浄シャーレおよび除核用シャーレの作製