



Accutase®を使用したマクロファージ継代プロトコール

製品名 : Accutase

CATALOG#: AT104

形 式 : 100 ml ready-to-use 滅菌済凍結液体

品質管理 : 1. USP メンブレン濾過法による滅菌テスト済
2. 組織培養用プラスチック容器からの細胞剥離テスト済

成 分 : 1 × ACCUTASE 酵素を 0.5 mM EDTA・4Na および 3mg/L Phenol Red を含む
Dulbecco's PBS で溶解
(Dulbecco's PBS : KCl 0.2 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l)

安 定 性 : -20°Cで安定

各ロットの使用期限をご覧ください。製品到着後、-20°Cで保存してください。

解凍後2ヶ月以内は4°Cで保存可能です。室温では保存しないでください。

Accutase、Accumax の正しい解凍方法と保存のためのヒント は弊社ウェブサイトをご覧ください。

概要 :

初代マクロファージ培養は全血または骨髄を特定の成長因子の存在下で密度勾配分離法で分離させた細胞を使います。このような分離のプロトコールは文献より手に入れることができます。本製品はプロテアーゼ、コラーゲン分解酵素による細胞剥離剤です。分離した細胞を集め、37°C 5% CO₂ インキュベーターで培養をすると、マクロファージ前駆細胞は細胞培養フラスコに接着し、マクロファージ分化を促すために培地を交換する際にフラスコに残ります。

初代マクロファージ培養細胞を培養プレートから剥がすプロトコールは以下の通りです。

細胞を取り扱う作業は、クリーンベンチ内などの適切な無菌環境で行ってください。

全血または骨髄由来のマクロファージ継代手順

1. T25 フラスコまたは細胞培養ディッシュから上清を取り除きます。
2. 5mL の滅菌済み PBS でフラスコまたはディッシュを洗い、PBS を取り除きます。
3. 5mL の Accutase®をフラスコまたはディッシュに入れ、室温で 10-15 分静置します。
倒立顕微鏡で細胞を観察し、細胞の収縮や剥離を確認します。
4. フラスコを穏やかにゆらし、Accutase®をさらに 5mL 加えます。さらに 10-15 分室温で静置します。数回のピペティングで細胞を懸濁します。このとき泡立たないように気を付けます。
5. 細胞数をカウントします。

NOTE: これらの手順でフラスコを静置する時間を短くすることが望ましい場合は、氷上で行うと短縮できます。

DH82 や RAW264.7 などのマクロファージ細胞株の継代手順

不死化された細胞株を使用する場合も、標準的な接着細胞と同じような方法で Accutase による剥離を行うことができます。

1. 培養器から T25 フラスコを出し、倒立顕微鏡で細胞密度をチェックします。
2. クリーンベンチなどに移動し、細胞継代を行います。培地をフラスコから除去します。

5mL の滅菌済み PBS で 2 回洗い、加えた PBS はすべて取り除きます。

3. 5mL の Accutase を加え、室温で 5-10 分静置します。
4. 顕微鏡で観察し、細胞の縮みや丸味がでるなど剥離の兆候がおこっていることをチェックします。
 - a. もし細胞が丸くなっている様子が顕著であれば、フラスコをクリーンベンチにもどし、泡が出来ないようにきをつけて数回のピペッティングを行ってください。
 - b. もし細胞が丸まっていない様子であれば、さらに 2-3 分静置し、上の a の手順に進んでください。
5. 1:2 または 1:4 の割合で、3-6 日に 1 回のペースで継代してください。

Note :

細胞の種類が異なればプラスチックへの接着の度合いが替わります。このために静置しておく時間は細胞によって微調整が必要です。非常に接着が強固な細胞の場合は、より強い成分を含む Accumax®がお勧めです。