

海馬神経初代分散培養法

Culture Medium :

- 50 ml Neurobasal Medium
- 1 x B-27 supplement
- 0.5 mM glutamine
- 1/200 penicillin-streptomycin

Dish Coating :

- 1) laminin(5 μ g/ml)、poly-D-lysine(50 μ g/ml)でコーティングを行い、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。
- 2) ディッシュを滅菌水により3回洗浄し、4-7時間程度インキュベートする。
(乾燥後は冷蔵庫にて1-2週間保存可能)
(ガラス製の場合は1 N NaOH MilliQ 1 N HCl MilliQ 75% EtOH 100% EtOHの順で洗浄してからコーティングを行う。)

Papain Solution (pH 7.4) :

- 10-15 units/ml papain
- 0.45 mg/ml L-cystein hydrochloride
- 0.01% DNaseI in PBS

Materials:

Neurobasal Medium	GIBCO (21103-049)
glutamine	GIBCO (21051-024)
B-27	GIBCO (17504-044)
laminin	BD (354232)
poly-D-lysine	BD (354210)
DNaseI	Wako
papain	Worthington (37A9379)
L-cystein hydrochloride	SIGMA (C7880-100G)
Ara-C	SIGMA (C5545-5G)

Preparation protocol :

- 1) 直前に L-cystein hydrochloride を 4.5 mg/10 ml (pH 7.4) に調整し (調整前は pH 6.7 くらい。9 μ l(4 N NaOH)/10ml で調整するとよい。) papain を 15 units/ml で加える。
- 2) パパイン溶液を 37 $^{\circ}$ C、5分で溶解後、フィルター滅菌を行い使用するまで氷上で保存。
- 3) 当日生まれた新生児に 75% EtOH を吹きかけ消毒し、海馬を ice cold PBS 中で取り出す。
- 4) 取り出した海馬は ice cold PBS が入った 15 ml チューブへ。
- 5) 全ての海馬を取り出した後、ice cold PBS で上清をピペットで捨て、新たな ice cold PBS を加える。この操作を 3 回程度行う。(Wash)
- 6) 以下の操作は、室温でよい。
- 7) パパイン溶液へ海馬を入れ、37 $^{\circ}$ C で 15-30 分間インキュベートする。

- 8) このインキュベート中にパスツールピペットの先端をバーナーで焼き、穴を小さくしたものを作製する。(穴の大きさは、大きめと小さめの2種類を作製)
- 9) インキュベート終了後、PBS 中へ海馬を入れ3)の操作を同様に行う。(Wash)
- 10) メディウムの入った 15 ml チューブへ海馬を入れ、まず大きめの穴でできたパスツールで懸濁を行い、ある程度細胞をバラバラにする。その後、小さめのパスツールで更なる懸濁を行い細胞を単離する。
- 11) 細胞数を計数し、目的に応じた濃度に希釈する。
- 12) 330 μ l 程度の量で播種しディッシュに細胞を接着させる (24 well dish)
- 13) 2-3 時間後、500 μ l のメディウムを加える。

- 14) 2-3 日後、終濃度 5-10 μ M となるように Ara-C を加える。
- 15) 様子を観察しながら 5-7 日程度毎にメディウムを半分量ずつ置換する。

Notice:

- ・ やさしく素早く行うことが重要。
(生後 24 時間以内であれば特に問題はないと思われるが、胎生時に行うのが望ましい)

Ref.:

- Free Radical Biology & Medicine*, **28**, 5, 665-672 (2000)
J. Neurosci Res., **71**, 811-818 (2003)
J. Neurosci. Meth., **149**, 110-120 (2005)
日薬理誌, **119**, 163-166 (2002)
実験医学, **20**, 15 (10月号, 2002)
脳・神経研究の進め方, 羊土社, 53-58

MAP2 (神経細胞特異的マーカー) による免疫染色 (培養 18 日後)

