

培養細胞実験

12291046

王 舒揚

目的

細胞は動物や植物の個体を形成する最小単位である。細胞から、より大きい単位の組織と器官で、生物の色々な機能を果たす。細胞培養は、細胞を生体から取り出して、機能を持たせたままシャーレやフラスコなどの細胞培養溶液中で育つ技術である。この技術により、生体機能を細胞の視点から解明して研究できる。今回の実験で、ヒトの **HeLa 細胞** の培養により、細胞培養の **初代培養** を体験した。

HeLa 細胞

由来は子宮頸部癌である。黒人女性 Henrietta Lacks の子宮頸がん組織から取り出した。ヒトで初めて株化された細胞である。

初代培養

生体から組織を無菌的に取り出し、トリプシン処理などでバラバラした細胞を培地を入れたシャーレに入れ、育つのは初代培養。初代培養細胞には単一の細胞ではなく、様々な種類の細胞がある。初代培養細胞を継代したものは **継代細胞**。

試薬

今回使う固定液は **PBS**、細胞分散液は **0.25%トリプシン溶液**、完全培地と無血清培地を使う、滅菌操作のため、**70%アルコール** も使う。透明な細胞を観察するため、**位相差顕微鏡** を使う。

PBS

PBS は一般的な固定液、多くの免疫染色に使える。PBS はリン酸緩衝生理食塩水、細胞に対して等張で無毒性。無色透明の液体で、人体に有害な物質は含まれていない。

トリプシン

トリプシンは小腸で働く酵素で、タンパク質を加水分解してペプチドにし、それをアミノ酸に分解する。最適な pH は 8 前後、温度は 37°C 前後。皮膚刺激や激しい目のかゆみを引き起こす可能性があるため、使用時には体内への侵入を避けること。

アルコール

アルコールは可燃性で、ガスバーナーを使う時注意すること。

原理

細胞の分散液

トリプシンの作用は、細胞間のタンパク質を加水分解し、それによって細胞を解離させることである。組織や細胞によって、トリプシンの作用に対する反応は異なる。トリプシンの細胞分散活性は、濃度、温度、作用時間に関係ある。トリプシン溶液の作用が最も強い場合は、pH8.0、37°Cのときです。過消化による細胞損傷を避けるため、濃度、温度、作用時間をコントロールする必要がある。

細胞の固定

細胞固定で最も大切なことは、細胞内の生体分子を生きていた時の状態のまま正確に保存して、それを検出することである。一般的な固定に使う試薬は、メタノールやエタノールなどのアルコールとホルムアルデヒドなどのアルデヒド基を持つ化学物質である。

実験操作①

①、クリーンベンチの準備をした。



①、ガスのスイッチを開けた。

②、三角フラスコをシェルフに置いた。



①、必要に応じて、磁石を下方に移動させた。

②、三角フラスコに、ホースに取り付ける瓶栓を差し込んだ。

③、アスピレーターのスวิตช์を開けた。



④、照明と扇風機のスวิตช์を開けた、扇風機の音が聞こえることを確認した。

②、試薬と実験道具を準備した。

- メスピペット x2
- 青マイクロピペット、黄マイクロピペット、チップ x2
- 完全培地、BPS、トリプシン(チューブ)
- アスピレーターのピペット、チップ
- 計算盤
- 空シャーレ(10 cm)
- 遠心管

～先生がチェックした後～

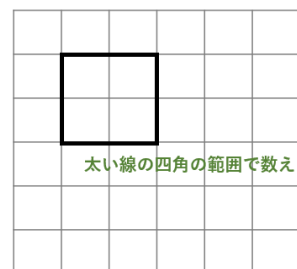
- 接着細胞を持つシャーレ

③、接着細胞を持つシャーレの培地を全部アスピレーターで除去した。

シャーレを少し傾きに置いて除去した。

- ④、PBS をメスピペット(1 番)で 5 ml 取って、シャーレに入れた。
リンスして、全部アスピレーターで除去した。
- ⑤、トリプシンを青マイクロピペットでチューブから 1 ml 取って、シャーレに入れた。
シャーレを均一にのばせて、全部アスピレーターで除去した。
- ⑥、位相差顕微鏡で細胞を観察しに確認した。
細胞が丸になるはずである。
- ⑦、シャーレを少し激しく叩いて、細胞をシャーレの壁から離れるにした。
- ⑧、完全培地をメスピペット(2 番)で 10 ml 取って、シャーレに入れた。
リンスした。
- ⑨、シャーレに載せたものを全部メスピペット(2 番)で遠沈管に入れた。
ピペッティングした。

- ⑩、黄マイクロピペットで遠沈管から 20 μl 取って、計算盤に入れた。



①、計算盤を位相差顕微鏡で観察して、細胞数を数えた。

②、遠沈管を遠心した。300g 3 分間

- ⑪、数えた細胞により、新しいシャーレに入れる培地の必要量を計算した。

式：

$$1.0 \cdot 10^5 / (\text{細胞数} / 2.0 \cdot 10^{-4})$$

▲カッコ内は全シャーレの予想細胞数

計算：

$$1.0 \cdot 10^5 / (44 / 2.0 \cdot 10^{-4}) \\ = 25 / 11 \approx 2.27 = 227 \mu\text{l}$$

- ⑫、遠心した遠沈管の上清をアスピレーターで除去した。
メスピペット(私の場合は右)で培地を遠沈管に 10 ml までに入れた。
ピペッティングした。
- ⑬、遠沈管に載せたものをメスピペット(2 番)で、全部新しいシャーレに入れた。
培地を黄マイクロピペットで計算した量取って、新しいシャーレに入れた。
新しいシャーレにラベルを付けて、適当な温度で一週間培養した。

実験操作②、血清濃度により細胞培養の影響を調べた

- ①、実験操作①と同じ、細胞懸濁液(完全培地)を作製した。
①と違って、3つの 5 cm シャーレも準備した。
- ②、3つの 5 cm シャーレに、完全培地と無血清培地を必要量(加えて 5 μl、共に 50 μl)で加えて、遠心管から 45 μl の細胞懸濁液を加えた。

私は 0%、3%、5% 血清で培養するつもりなので、3つのシャーレに

血清濃度%	0%	3%	5%
完全培地量(μl)	0 μl	3.5 μl	2.5 μl

細胞懸濁液(μl)	5 μl	1.5 μl	2.5 μl
------------------------	-----------------	-------------------	-------------------

シートのように加えた。

適当な温度で一週間培養した。

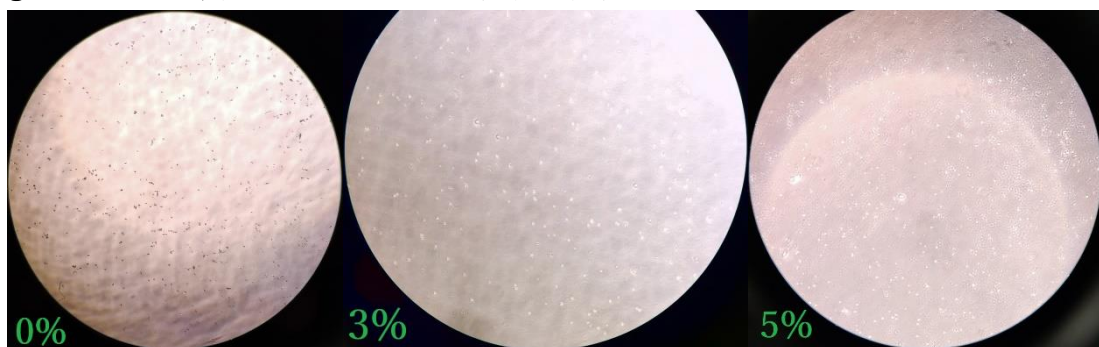
3 回目実験の前に、生細胞と死細胞の見分け方を調べた

生細胞と死細胞の見分け方は様々で、この実験に使用したシャーレの種類や顕微鏡の種類によっては、細胞の付着の仕方で判断することができる。

シャーレや細胞の種類にもより、生きている Hela 細胞はシャーレの下壁に付着させ、死んでいる Hela 細胞は細胞懸濁液に浮遊させるはずである。

実験操作③、違う濃度の血清で培養する細胞の培養状況を調べて考察した

①、先週から培養した細胞を位相差顕微鏡で観察した。



②、3つのシャーレの培地を遠沈管に入れた。

③、3つのシャーレに PBS を適量で入れた。

④、遠沈管にトリプシンを適量で入れた。

⑤、3つのシャーレにマイクロピペットで 330 μl の培地を入れて、リンスをした。

現在、生細胞はシャーレにいて、死細胞は遠沈管にいる。

⑥、3つのシャーレと3つの遠沈管の細胞懸濁液をマイクロピペットで 20 μl を取って、計算盤に入れた。

計算盤は二人で二つを使う、一人は共に 6 個使う。

		F	F
個人		共用	
0%死細胞数	29	3%死細胞数	10
5%生細胞数	12	5%死細胞数	3
3%生細胞数	11	他人	
0%生細胞数	21	他人	

⑦、計算盤の細胞数により、シャーレの細胞を計算しに予想した。

$$0\% \text{生細胞数} = 21 / [2 * 10^{(-4)}] = 105000$$

0%死細胞数=29/[2*10⁻⁴]=145000

3%生細胞数=11/[2*10⁻⁴]=55000

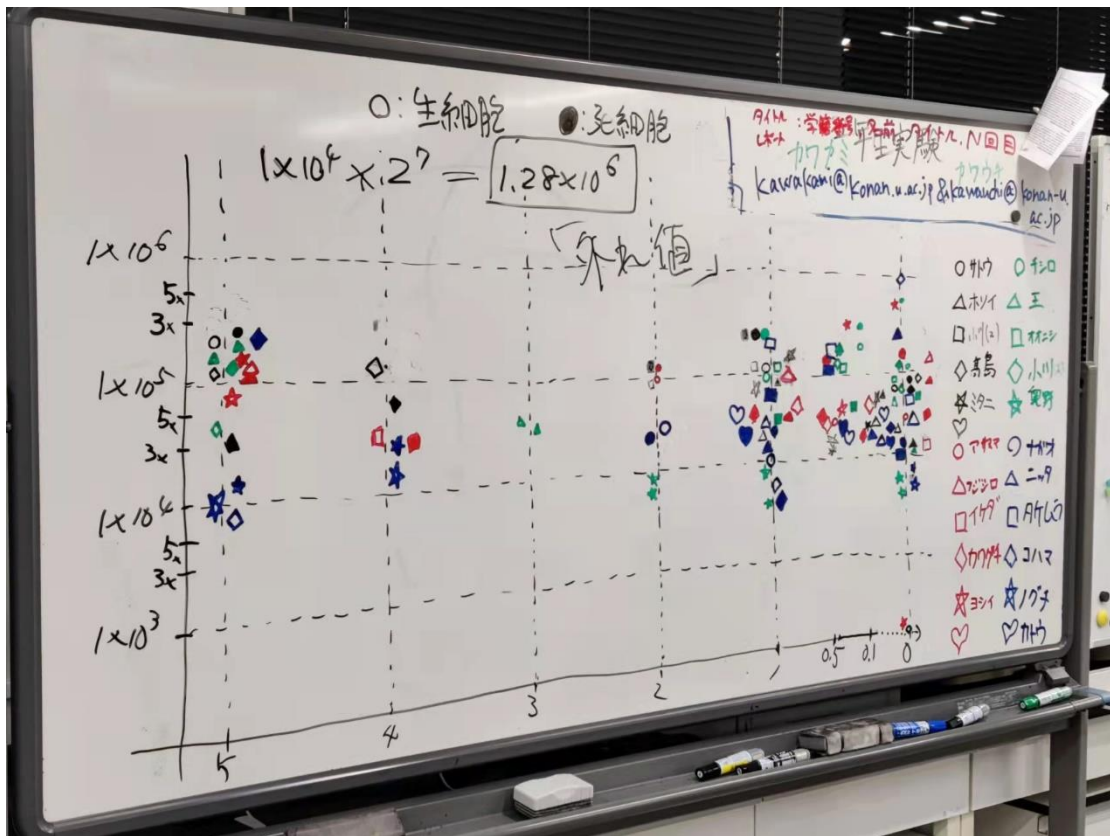
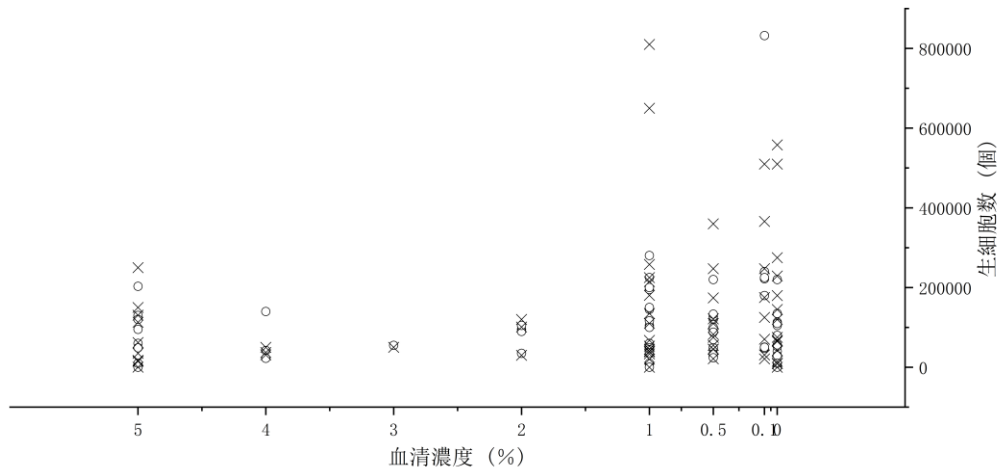
3%死細胞数=10/[2*10⁻⁴]=50000

5%生細胞数=12/[2*10⁻⁴]=60000

5%死細胞数=3/[2*10⁻⁴]=15000

⑧、全グループの実験データで、グラフを作った。

○ 生細胞数
× 死細胞数

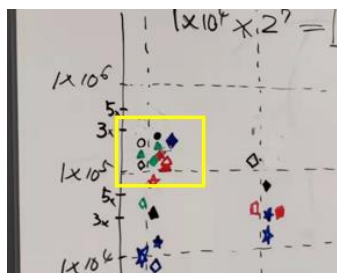


分析

全体の傾向を見ると、血清濃度が高いほど、培養皿の細胞数(生細胞+死細胞)が多いと

考える。特に、5%血清の場合、生きている細胞と死んでいる細胞の数が非常に接近している状況がある。理想的な培養細胞数を計算すると、

$$1 \times 10^4 \times 2^7 = 1.28 \times 10^6$$

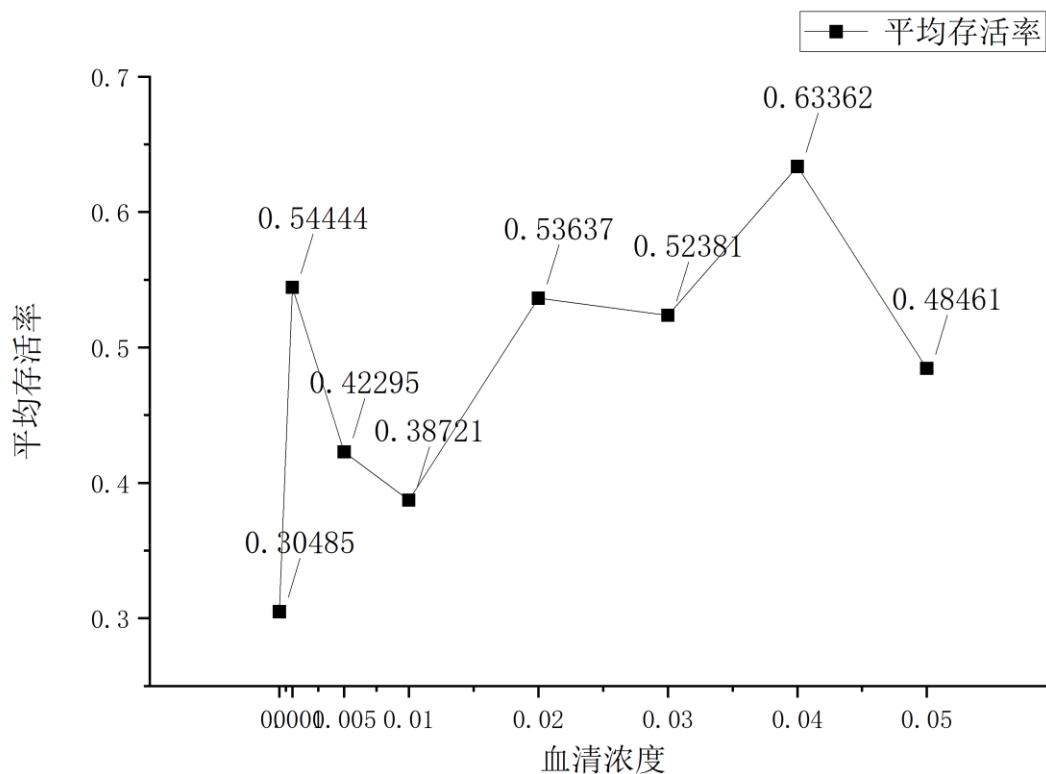


5%血清の場合、生きている細胞と死んでいる細胞の数は、理想的な細胞の数の非常に近いことがある。したがって、血清濃度5%のデータの中には、理想的な状態に非常に近いものがあり、培養した細胞数が多くて、後に死亡したのも多いということは、この環境下で培養した細胞数の最大値を示すことができると考える。

全グループのデータにより、各場合の細胞数の平均値を調べて、血清濃度と細胞の存活率との関係を考察した。

	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001	0
平均生細胞数	80765.77778	68166.67	55000	81250	113785.1	87953.4	230915.6	61525.12
平均死細胞数	85895	39416.67	50000	70231.25	180075.5	120000	193221.9	140295.9
存活率%	48.4612%	63.3617%	52.3810%	53.6370%	38.7208%	42.2948%	54.4436%	30.4850%

シートにより、存活率のグラフを作った。



実験データだけでは、細胞の生存率は血清濃度と関係がない可能性があり、実験結果の細胞生存率は非常にランダムであると思われる。そして、血清の成分と作用を調べた。

血清

血清は、血液凝固後にフィブリノゲンや特定の凝固因子が除去された、黄色がかった透

明な液体または血漿である。主な機能は、基本的な栄養素の供給、ホルモンや各種成長因子の供給、結合タンパク質の供給、プロコンタクトや成長因子の供給、機械的損傷から細胞壁を保護し、培養中の細胞に何らかの保護を与えることである。

参考文献

[1]教科書：『ゼロから始めるバイオ実験マスターコース』

[2]実験のテキスト

[3] Alfa Aesar, <https://www.alfa.com/zh-cn/>

[4] ウィキペディア, <https://zh.wikipedia.org/>

[5] 百度百科, <https://baike.baidu.com/>