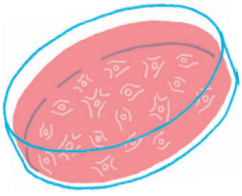
目次

第1章 細胞株の入手（分与・購入）

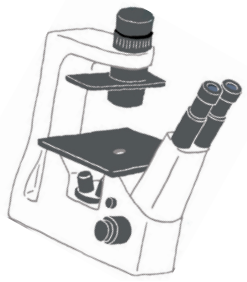
1. 細胞株とは …… 2
2. メーカーからの購入 …… 3
   COLUMN 細胞の不死化 …… 3
3. 細胞株分与の手順・マナー …… 4
   3-1 細胞バンクから細胞を入手する …… 4
   3-2 material transfer agreement（MTA） …… 6
   3-3 他の研究者から直接分与してもらう …… 8
   COLUMN 分与してもらう際のポイント …… 9

第2章 培養の準備（設備・器具）

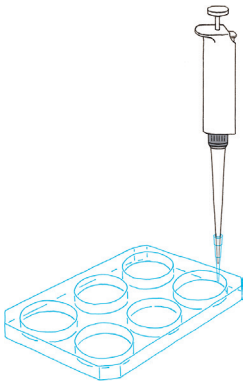
1. 実験室の準備 …… 12
2. 細胞培養の操作に必要なもの …… 15
   2-1 クリーンベンチと安全キャビネット …… 15
   COLUMN ベンチの利用を円滑にするために（カレンダーの利用） …… 17
   2-2 サクション …… 17
   2-3 ガスバーナー …… 18
   2-4 オートクレーブ …… 18
   2-5 乾熱滅菌機 …… 19
   2-6 乾燥機 …… 19
   2-7 遠心機 …… 19
   2-8 恒温槽（ウォーターバス） …… 20
   2-9 培地用冷蔵庫 …… 21
   2-10 低温フリーザー・超低温フリーザー …… 21
   2-11 ピペット・電動ピペッター・マイクロピペッター …… 21
   2-12 ピペットリンサー …… 22
   2-13 マイクロチューブ …… 23
   2-14 遠沈管 …… 23
   2-15 培養容器 …… 23
3. 細胞を飼うために必要なもの …… 27
   3-1 CO_2インキュベーター …… 27
   3-2 CO_2ボンベ …… 28
   3-3 浮遊細胞培養用のシェーカー …… 30



4. 細胞を見るために必要なもの …… 31
4-1 倒立型顕微鏡 …… 31
4-2 血球計算盤 …… 33
5. 細胞を保存するために必要なもの …… 34
5-1 細胞凍結保存液 …… 34
5-2 クライオチューブ …… 34
5-3 細胞凍結処理容器 …… 35
5-4 液体窒素タンク …… 35
5-5 ケーンとクライオボックス …… 36
COLUMN 液体窒素タンクと細胞のバックアップ …… 37
第3章 培地・試薬の作製
1. 基本培地 …… 40
1-1 細胞と培地の相性 …… 40
1-2 基本的な培地の組成と作り方 …… 41
1-3 一般に販売されている培地に添加する試薬類 …… 43
1-4 販売されている培地に含まれている成分の役割 …… 45
2. 血清の使い方 …… 48
2-1 非働化処理 …… 48
2-2 ロットチェック …… 49
3. 培養操作に必要な液体 …… 50
3-1 PBS（−）の作り方 …… 50
3-2 HBSS（−）の作り方 …… 51
3-3 トリプシン溶液の作り方（0.1%と0.25%の場合） …… 52
3-4 0.5%トリパンブルー溶液の作り方 …… 52
4. ディッシュのコーティング …… 53
4-1 Ⅰ型コラーゲンコーティングの方法 …… 53
4-2 ゼラチンコーティングの方法 …… 54
4-3 PLLコーティングの方法 …… 55
第4章 細胞の生育確認
1. 観察する（検鏡方法，タイミングなど） …… 58
1-1 接着細胞を観察する …… 58
1-2 浮遊細胞を観察する …… 59
COLUMN デジタル顕微鏡 …… 60



2. 培地を交換する …… 61
2-1 培地の色とpH …… 61
2-2 培地の色調変化の意味 …… 61
2-3 培地を交換する …… 62
3. コンタミネーション …… 64
3-1 初動 …… 64
3-2 汚染源の調査・再発防止 …… 65
4. 細胞数を数える …… 67
4-1 トリパンブルー染色 …… 67
4-2 血球計算盤 …… 68
4-3 細胞数の計算 …… 72
COLUMN 血球計算盤の種類 …… 73
4-4 機械を用いた方法 …… 74
COLUMN タイムラプス観察 …… 74
第5章 細胞培養操作の基本
1. 概要 …… 76
1-1 はじめに …… 76
1-2 増えすぎて過密になる前に継代する（植え継ぐ）必要がある …… 77



2. 基本操作（細胞を剥がす～再播種まで） …… 79
2-1 基礎知識 …… 79
2-2 実際の手順・方法 …… 79
COLUMN 培養操作時の手指衛生と服装 …… 84
3. 細胞の撒き方におけるトラブルシューティング …… 85
3-1 同じ容器のなかで細胞密度にムラが生じる …… 85
3-2 同じ条件で播種したはずなのに，ウェル間で細胞密度が異なる …… 86
4. 最初に扱う細胞の準備 …… 87
4-1 凍結保存されている細胞のリカバリー（融解と播種） …… 87
5. 初期ストックを作製する …… 90
5-1 マスターストック …… 90
5-2 ワーキングストック …… 91
6. マイコプラズマ汚染のチェック …… 92
6-1 マイコプラズマとは …… 92
6-2 マイコプラズマ汚染の検出方法 …… 92
6-3 マイコプラズマ汚染の原因と予防 …… 93
COLUMN 細胞培養を行うタイミングと時間帯 …… 94

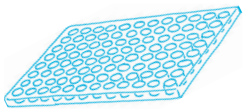
7. WST-8アッセイ ····· 96
7-1 細胞を用いたアッセイ ····· 96

第6章 細胞への遺伝子導入

1. 遺伝子導入法の分類 ····· 102
1-1 化学的方法 ····· 102
1-2 物理的方法 ····· 103
1-3 生物学的方法 ····· 103
1-4 トランスフェクションとは ····· 104
2. トランスフェクション試薬 ····· 106
2-1 リン酸カルシウム法 ····· 106
2-2 カチオン性脂質試薬 ····· 106
2-3 非脂質カチオン性ポリマー試薬 ····· 107
3. リポフェクションの方法 ····· 109
3-1 フォワードトランスフェクション（forward transfection） ····· 109
COLUMN トランスフェクション試薬の条件検討の順番 ····· 111
3-2 リバーストランスフェクション（reverse transfection） ····· 111
3-3 フォワードトランスフェクションとリバーストランスフェクションの特徴 ····· 113
4. 遺伝子導入の成否を確認する方法 ····· 114
COLUMN 蛍光レポーターと発光レポーターの違い ····· 114
4-1 発光レポーターを用いた実験例（発光レポーターアッセイ） ····· 115

第7章 安定発現株の作製と細胞のクローニング

COLUMN 細胞株樹立における安定発現技術の役割～細胞の不死化～ ····· 122
1. 外来DNAをホストゲノムに組み込む方法 ····· 123
1-1 ゲノムに組み込むための戦略 ····· 123
1-2 プラスミドベクターの準備・導入 ····· 124
2. 薬剤耐性によるセレクション：薬剤耐性細胞集団を得る ····· 126
2-1 予備実験（薬剤濃度の検討） ····· 126
2-2 本番実験 ····· 127
3. 細胞のクローニング ····· 129
3-1 限界希釈法 ····· 129
3-2 セルソーターを用いたシングルソーティング ····· 130
3-3 コロニーピック法 ····· 130



第8章 導入した遺伝子の発現・局在の確認

1. 概要 …… 136

2. 細胞を見て確認する―蛍光レポーターを利用した方法 …… 138

2-1 基本の蛍光顕微鏡観察 …… 138
2-2 細胞の固定（fixation）と核染色 …… 139
2-3 細胞の固定と核染色の実際 …… 139
COLUMN 蛍光タンパク質タグはどこにつけるのがよい？ …… 141

3. 細胞を破砕して確認する
―免疫ブロッティング（ウエスタンブロッティング）の概要 … 142

4. 細胞の可溶化 …… 143

4-1 細胞の回収方法 …… 143

5. タンパク質濃度の測定 …… 151

5-1 BCA法 …… 151
5-2 BCA法のプロトコル …… 151
5-3 Bradford法（CBB法） …… 154
5-4 Bradford法（CBB法）のプロトコル …… 155

6. SDS-PAGE …… 157

6-1 原理 …… 157
6-2 サンプルの前処理 …… 160
COLUMN “○○型”電気泳動 …… 162
6-3 ゲル板の組み立て～泳動準備 …… 163
6-4 サンプルのアプライ～泳動 …… 169
6-5 ゲルの取り外し～片付け …… 172
6-6 ゲルの染色（CBB染色,SYPRO Ruby 染色） …… 173
COLUMN 泳動結果から分子量を推定する …… 175

7. 転写 …… 176

7-1 転写の原理 …… 176
7-2 メンブレンの種類と特徴 …… 176
7-3 転写方法の種類 …… 177
7-4 セミドライ式転写のプロトコル …… 178

8. ブロッキング・抗体反応・検出 …… 183

8-1 ブロッキングの流れ …… 183
8-2 ブロッキングとは …… 183
8-3 間接法とは …… 184
8-4 抗体選別の概要 …… 185

COLUMN 外注もしくは自作した抗体の確認（抗原ペプチドによるクエンチ確認）……186
8-5 HRPによる化学発光の原理……187
8-6 ブロッキング～検出までの手順……187
COLUMN 一次抗体溶液……188
COLUMN 一次抗体の使い回し……189
8-7 ストリッピング（抗体剥離）……191

第9章 細胞の保存と譲渡

1. 細胞の保存……196
1-1 細胞凍結に必要な物品等……197
COLUMN もっと詳しく！細胞保存液に関する情報……198
1-2 凍結方法（緩慢冷却法）……198
COLUMN 個人用のワーキングストックは何本必要？……201
COLUMN どのようなワーキングストックがよい？……202
2. 細胞の譲渡……203
2-1 方法……203
2-2 注意点……203
2-3 細胞バンク……204

索引……206

