

ニワトリ PGCs の培養

培地組成

基礎培地: Avian Knockout DMEM

B-27 serum free supplement	1X
100x Glutamax (35050-038)	1X
100x NEAA (11140-050)	1X
EmbryoMax® Nucleosides	1X
100x Sodium Pyruvate	0.2X
β-mercapotethanol	100 μM
Penicillin-Streptomycin	20 U/ml
Activin A	62.5 ng/ml
bFGF	4 ng/ml
Heparin	100 μg/ml
Ovotransferrin	5 μg/ml

1. 準備

- Avian Knockout DMEM Invitrogen (Custom order #041966570M)
Whyte ら (Stem Cell Report 5: 1171-1182 (2015)) に基づくオーダーメイド。
(250 mOsm/kg, 12.0 mM glucose, calcium chloride free)
- B-27 serum free supplement (10 mL) Life Technologies (17504-044)
- 100x Glutamax (35050-038) Life Technologies (35050-038)
- 100x NEAA (11140-050) Life Technologies (11140-050)
- EmbryoMax® ES Cell Qualified Nucleosides (100X) Millipore (ES-008-D)
- 100x Sodium Pyruvate (11360-039) Life Technologies (11360-039)
- β-mercapotethanol 50mM (20 mL) Life Technologies (31350-010)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) 100mL Thermo Fisher (15140122)

- Recombinant Human/Murine/Rat Activin A (Insect derived) 10μg Peprotech (120-14)
- Recombinant Human FGF basic (157 aa) Protein 25μg R&D System (234-FSE-025)
- Albumin from chicken egg white 1g (Ovalbumin) Sigma (A5503-1G)
- Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa Sigma (H3149-250KU)
- Conalbumin from chicken egg white (= Ovotransferrin) Sigma (C7786-100MG)

※基礎培地は通常の KO-DMEM でも代用できるが、PGC が凝集しやすくなる。特に雌の PGC は樹立・培養共に困難になる

2. 各種ストック溶液の作成

Ovalbumin (20 %)

- 1) 15 mL チューブ内に準備した Avian KO DMEM (1 mL) に Ovalbumin (200 mg) を加える
- 2) 完全に溶解するまで振とうする
- 3) シリンジフィルター (0.22 μm) でろ過する
- 4) 分注して 4°C 保管

hActivin-A (25 μg / mL)

- 1) 0.1% Ovalbumin 溶液を準備 (20% Ovalbumin 溶液 (10 μL) を超純水 (2 mL) で希釈する)

- 2) シリンジフィルター (0.22 μm) でろ過する
- 3) Activin (粉末: 10 μg) のバイアルを遠沈する
- 4) 3) のバイアルに 0.1 % Ovalbumin 溶液 (400 μL) を加えて懸濁する
- 5) 分注して-80°C保管

hFGF-2 (25 μg / mL) BSA 含有

- 1) 0.1% Ovalbumin 溶液を準備 (20% Ovalbumin 溶液 (10 μL) を超純水 (2 mL) で希釈する)
- 2) シリンジフィルター (0.22 μm) でろ過する
- 3) FGF (粉末: 25 μg) のバイアルを遠沈する
- 4) 3) のバイアルに 0.1 % Ovalbumin 溶液 (1000 μL) を加えて懸濁する
- 5) 分注して-80°C保管

Heparin (50 mg / mL)

- 1) 15 mL チューブ内に準備した Avian KO DMEM (2 mL) に heparin (100 mg) を加える
- 2) 完全に溶解するまで振とうする
- 3) シリンジフィルター (0.22 μm) でろ過する
- 4) 分注して 4°C保管

Ovotransferrin (10 mg / mL)

- 1) 15 mL チューブ内に準備した Avian KO DMEM (1 mL) に ovotransferrin (10 mg) を加える
- 2) 完全に溶解するまで振とうする
- 3) シリンジフィルター (0.22 μm) でろ過する
- 4) 分注して 4°C保管

3. 基礎培地ストック (50 mL)

- 47 mL: Avian Knockout DMEM (Invitrogen; Custom order #041966570M)
- 1 mL: B-27 supplement (RA および Insulin 含有)
- 500 μL : 100x Glutamax
- 500 μL : 100x NEAA
- 500 μL : EmbryoMax
- 100 μL : Pyruvate
- 100 μL : β -mercaptoethanol (Invitrogen)
- 100 μL : Pen-strep (Invitrogen)

4. サイトカインミックスストック (培地 100 mL 分)

- 250 μL : hActivin-A
- 16 μL : hFGF-2
- 200 μL : Hparin
- 200 μL : chicken serum
- 50 μL : Ovotransferrin

5. 培地の調整 (10 mL)

基礎培地 10 mL に対して 7 μL のサイトカインミックスを添加 (FacsOT medium)

6. PGC の培養

継代培養

- 1) 浮遊培養。標準は2日に1度約2倍に希釈
※ 24 well プレート 1 ウェルに培地 500 μ L を標準とする
※ 24 well プレートでは 200,000 細胞 / well まで培養可能

凍結保存

- 1) バイアルにマーキング（細胞名、日付、実験者； 蓋には細胞名を書く）
- 2) Cell Banker2（血清を含まない）で細胞ペレットを懸濁（バイアルあたり 300ul 程度）
- 3) 4°Cに冷やしてある BICELL に入れ-80°Cに入れる（ひっくり返らないように入れる）
- 4) 翌日細胞ストックボックスに移す
※ 24 ウェル x2 程度をバイアル 1 本に保存。

初代培養

- 1) 48 well プレートに培地を 300 μ L ずつ分注する
- 2) ニワトリ 2 日胚の背側大動脈および周縁静脈からガラスピペットで採血する
- 3) 回収した血液を培地に移す (1 胚 / 1 well)
- 4) CO₂ 濃度 5%、37°Cの条件で培養する
※ 採血後、胚を回収して PCR を用いた性別を行う

培地交換

- 1) 2日に1度、培地の上清を 90 μ L ずつ丁寧に除去し、新鮮な培地を 100 μ L ずつ加える
※ 2週間を目処に培養し、選別を行う。PGCs が増殖していない well は廃棄する。
※ 細胞数が 50,000 を超えたら、24 well プレートで継代培養する