

Attaching cells 배양 방법

2021.05.31. 권정원 작성

○ Cell Stock 풀기

1. 얼려있던 세포 스탱을 water bath에 넣어 빠르게 녹인다. (3분 이내, water bath 물에 오염되지 않게 주의)
2. 적정 배지 (10% FBS 함유) 10ml 에 중화시켜 DMSO 독성을 제거한다.
3. 1300 rpm, 5분 centrifuge 하여 세포를 다운 시킨다.
4. Sup을 suction 하여 버리고 새로운 배지 1ml로 풀어준다.
5. 적정 플라스크 (예, 25T flask)에 넣어 배양한다.

○ 계대 배양하기

1. 세포의 confluency가 80-90%가 되었는지 확인한다.
2. 0.25% 트립신을 처리하여 attaching 되어 있는 세포를 떼어낸다. (25T flask의 경우 700 μ l, 75T flask의 경우 1ml 처리)
3. 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 3분간 인큐베이션 한다.
4. 세포가 다 떨어졌는지 확인한 후 세포 적정 배지 (10% FBS 함유)를 사용하여 트립신을 중화시킨다. (25T flask의 경우 5ml, 75T flask의 경우 10ml 넣음)
6. 중화시킨 배지를 걸러 1300 rpm, 5분 centrifuge 하여 세포를 다운 시킨다.
7. 세포 카운팅 후 세포의 confluency가 30-40%가 되도록 씨딩한다. (보통한 플라스크에서 10-30% 정도로 계대 배양, 세포마다 다름)
5. 2-3일에 한번씩 세포를 계대 배양한다.

○ 세포 스탱 저장하기

1. 저장하고자 하는 세포를 카운팅 한다.
2. 75T flask에 풀 경우에는 2×10^6 cells/stock 이상으로 저장한다. (세포마다 다름)
3. 세포 저장 배지는 5% DMSO, 95% FBS를 사용한다.
4. Cyrotube에 세포를 넣고 cyrotank를 사용하여 (1분에 -1 $^{\circ}$ C씩 내려감) -80 $^{\circ}$ C에서 보관한다. 3개월 이상 보관할 경우 질소탱크에서 보관한다.