

マウス移植腫瘍からの単細胞懸濁液の調製

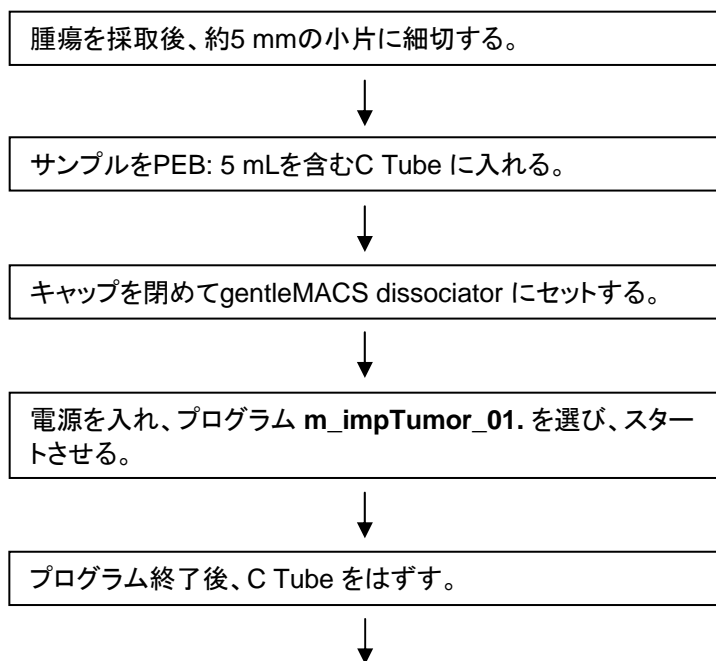
A. 準備

- gentleMACS Dissociator
- C tube (130-093-237)
- MACSmix™ Tube Rotator (130-090-753)
- Cell strainer (ポアサイズ70 μmのナイロンメッシュ)
- PEB buffer: **PBS pH 7.2, 0.5% BSA, 2mM EDTA**
 <bufferは、2-8°Cで冷やしてご使用ください>
 - *MACS BSA Stock Solution (130-091-376) をMACS Rinsing Solution (130-091-222) で 1:20 に希釈すると作れます。
 - *EDTAをACD-A や CPD に替えることができます。*BSA のかわりにゼラチン、マウス血清、FBS など也可以使用できます。
- オプション: ART 1000 REACH ピペットチップ(Molecular BioProducts, Inc.) ならばC tube のキャップ上部にあるシリコン部分にピペットを挿しこむことができ、危険なサンプルでも閉鎖された状態で中身を回収できます。

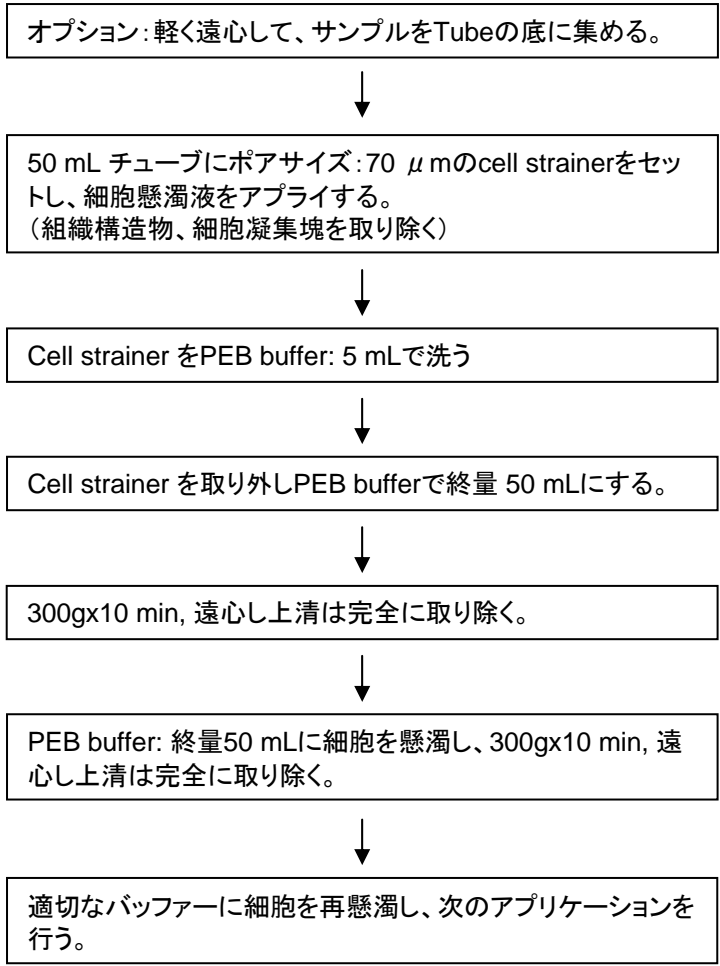
B. マウス移植腫瘍からの単細胞懸濁液調製

- gentleMACS Dissociator の使用方法の詳細は、ユーザーマニュアルをご参照下さい。
- 組織分散後に培養する場合は無菌で操作をしてください。
- MACSmix Tube Rotatorは“permanent run”に設定し、約12 rpmで使用してください。
MACSmix が無い場合は、5分おきにtubeを転倒混和して下さい。
- 腫瘍は、CJ57/BI6マウス(B16, progressive mPAC)もしくはBALB/cマウス(CT26)の左右後肢の上部に10⁶個の腫瘍細胞株を皮下移植し誘導しています。
- このプロトコルは、0.2-3.5g/C Tube におけるマウス腫瘍サンプルの調製用に開発されています。

B-1. mouse B16 melanomas から腫瘍浸潤リンパ球(TILs)の調製



NOTE: 組織がrotor/statorの上に乗っていることを確認して下さい。



NOTE: ART 1000 REACH ピペットチップを使用すると、C tube のキャップ上部にあるシリコン部分にピペットを挿しこむことができ、危険なサンプルでも閉鎖された状態で中身を回収できます。

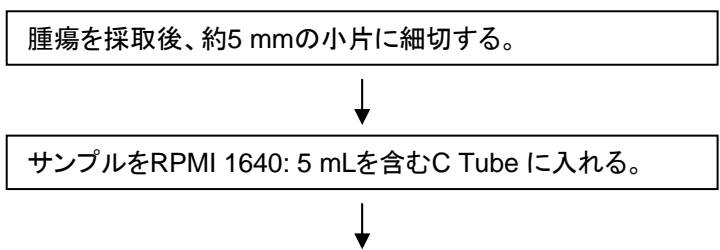
NOTE: 洗いの後で細胞塊がある場合は、1 mLの細胞懸濁液に対し、さらにenzyme mix 2: 30 uLを加えやさしく混合し、MACSmix Tube Rotatorを用いて37°C、最低5分間インキュベートする。

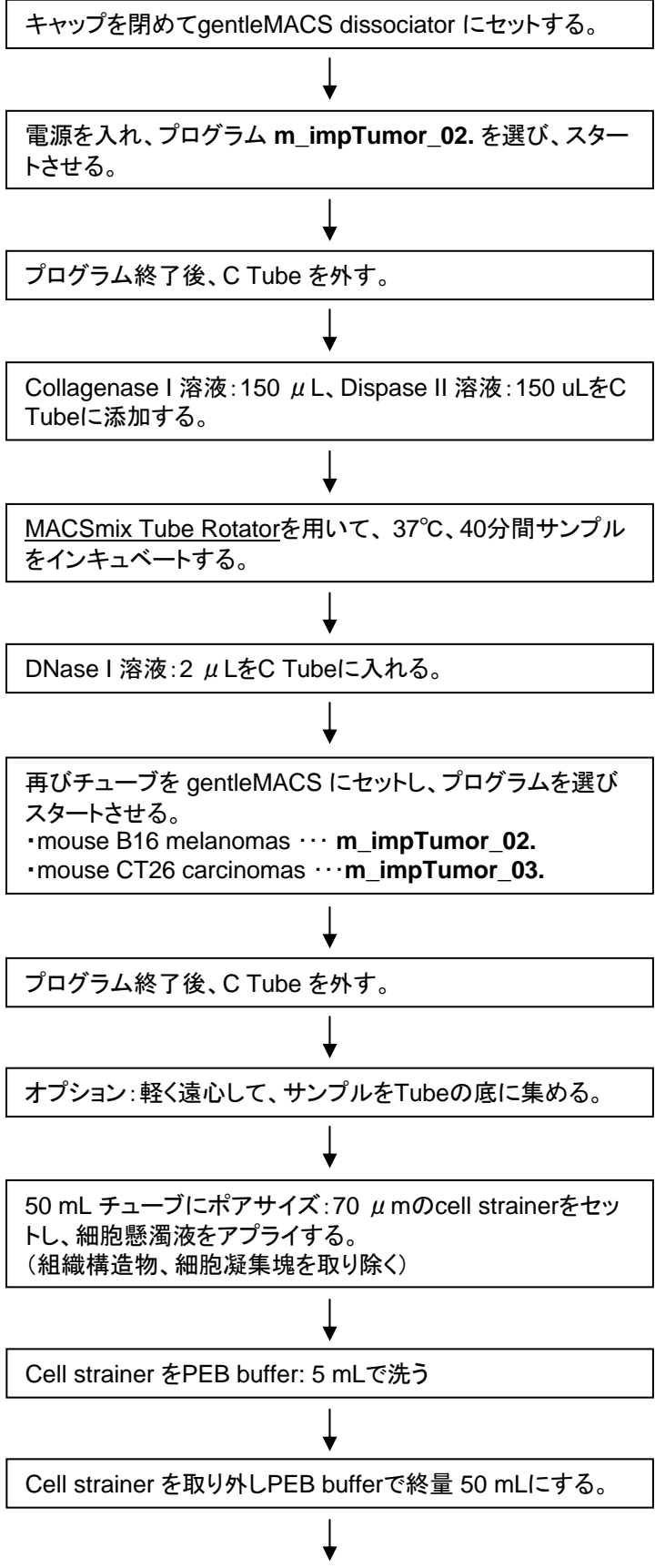
B-2. mouse B16 melanomas, mouse CT26 colon carcinomas もしくはmPAC pancreatic tumors から腫瘍浸潤リンパ球(TILs)および腫瘍細胞の調製

B-2-1. 準備 (A.準備も必要です)

- RPMI 1640 (130-091-440)
- Collagenase I 溶液:10,000 CDU/mL collagenase I in PBS (Collagenase I; Sigma-Aldrich C0130)
- Dispase II 溶液:32 mg/mL Dispase II in PBS (Dispase II; Roche 04942078001)
- DNase I 溶液:5 MU/mL DNase I in buffer (DNase I; Calbiochem 260913)
<※1MU: 1,000,000 Dornase units activity>

B-2-2. mouse B16 melanomas, mouse CT26 colon carcinomas から腫瘍浸潤リンパ球(TILs)および腫瘍細胞の調製





NOTE: 組織がrotor/statorの上に乗っていることを確認して下さい。

NOTE: 組織がrotor/statorの上に乗っていることを確認して下さい。

NOTE: ART 1000 REACH ピペットチップを使用すると、C tube のキャップ上部にあるシリコン部分にピペットを挿しこむことができ、危険なサンプルでも閉鎖された状態で中身を回収できます。

300gx10 min, 遠心し上清は完全に除去する。

↓

PEB buffer: 終量50 mLに細胞を懸濁し、300gx10 min, 遠心し上清は完全に除去する。

↓

適切なバッファーに細胞を再懸濁し、次のアプリケーションを行う。

B-2-3. mPAC pancreatic tumors から腫瘍浸潤リンパ球(TILs)および腫瘍細胞の調製

腫瘍を採取後、約5 mmの小片に細切する。

↓

サンプルをRPMI 1640: 5 mLを含むC Tubeに入れる。

↓

Collagenase I 溶液: 150 μ L, Dispase II 溶液: 150 μ LをC Tubeに添加する。

↓

キャップを閉めて、MACSmix Tube Rotatorを用いて、37°C、20分間サンプルをインキュベートする。

↓

gentleMACS dissociator にセットする。

NOTE: 組織がrotor/statorの上に載っていることを確認して下さい。

↓

電源を入れ、プログラム m_impTumor_04. を選び、スタートさせる。

↓

プログラム終了後、C Tube を外す。

↓

MACSmix Tube Rotatorを用いて、37°C、20分間サンプルをインキュベートする。

↓

DNase I 溶液: 2 μ LをC Tubeに入れる。

再びチューブを gentleMACS にセットし、プログラム m_impTumor_04. を選びスタートさせる。



プログラム終了後、C Tube を外す。



オプション: 軽く遠心して、サンプルをTubeの底に集める。



50 mL チューブにポアサイズ: 70 μ m の cell strainer をセットし、細胞懸濁液をアプライする。
(組織構造物、細胞凝集塊を取り除く)



Cell strainer を PEB buffer: 5 mL で洗う



Cell strainer を PEB buffer: 5 mL で洗う



Cell strainer を取り外し PEB buffer で終量 50 mL にする。



300gx10 min, 遠心し上清は完全に取り除く。



PEB buffer: 終量 50 mL に細胞を懸濁し、300gx10 min, 遠心し上清は完全に取り除く。



適切なバッファーに細胞を再懸濁し、次のアプリケーションを行う。

NOTE: 組織が rotor/stator の上に載っていることを確認して下さい。

NOTE: ART 1000 REACH ピペットチップを使用すると、C tube のキャップ上部にあるシリコン部分にピペットを挿しこむことができ、危険なサンプルでも閉鎖された状態で中身を回収できます。