

神経組織からの単細胞懸濁液の調製

A. 準備

- gentleMACS Dissociator
- C tube (130-093-237)
- MACSmix™ Tube MACS Rotator (130-090-753)
- プレセパレーションフィルター (130-041-407)
※Cell strainer (ポアサイズ30 μmのナイロンメッシュ)
- Neural Tissue Dissociation Kit (Papain) (130-092-628) もしくは
Neural Tissue Dissociation kit (Trypsin) (130-093-231)
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Sigma-Aldrich #H4891)
- HBSS with Ca²⁺ and Mg²⁺ (Sigma-Aldrich #H1387)
- Beta-mercaptoethanol (Sigma #63689)
- 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. マウス神経組織からの単細胞懸濁液調製

B-1. 試薬の準備

	Solution 1 (mL)	Solution 2 (mL)	Solution 3 (mL)	Solution 4 (mg)	Storage Buffer (mL)
NTDK(P)	2.5	2X50	1.5	5-15	1
NTDK (T)	10	2X50	1.5	5-15	1

Table 1: Neural Tissue Dissociation Kit (NTDK)のキット内容

beta-mercaptoethanolを終濃度:0.067 mMになるようにSolution 2に加える。
例) 50 mM beta-mercaptoethanol:13.5 μLをSolution 2: 10 mLに加える。

NOTE: この溶液は4°Cで1ヶ月保存出来ます

Solution4とラベルされた凍結乾燥粉末を含む小瓶にStorage Buffer: 1 mLを加えSolution4を作製する。
Solution4は、vortexしないで下さい。
細胞培養を行う場合は、滅菌フィルターに通した後分注し-20°Cで保存して下さい。

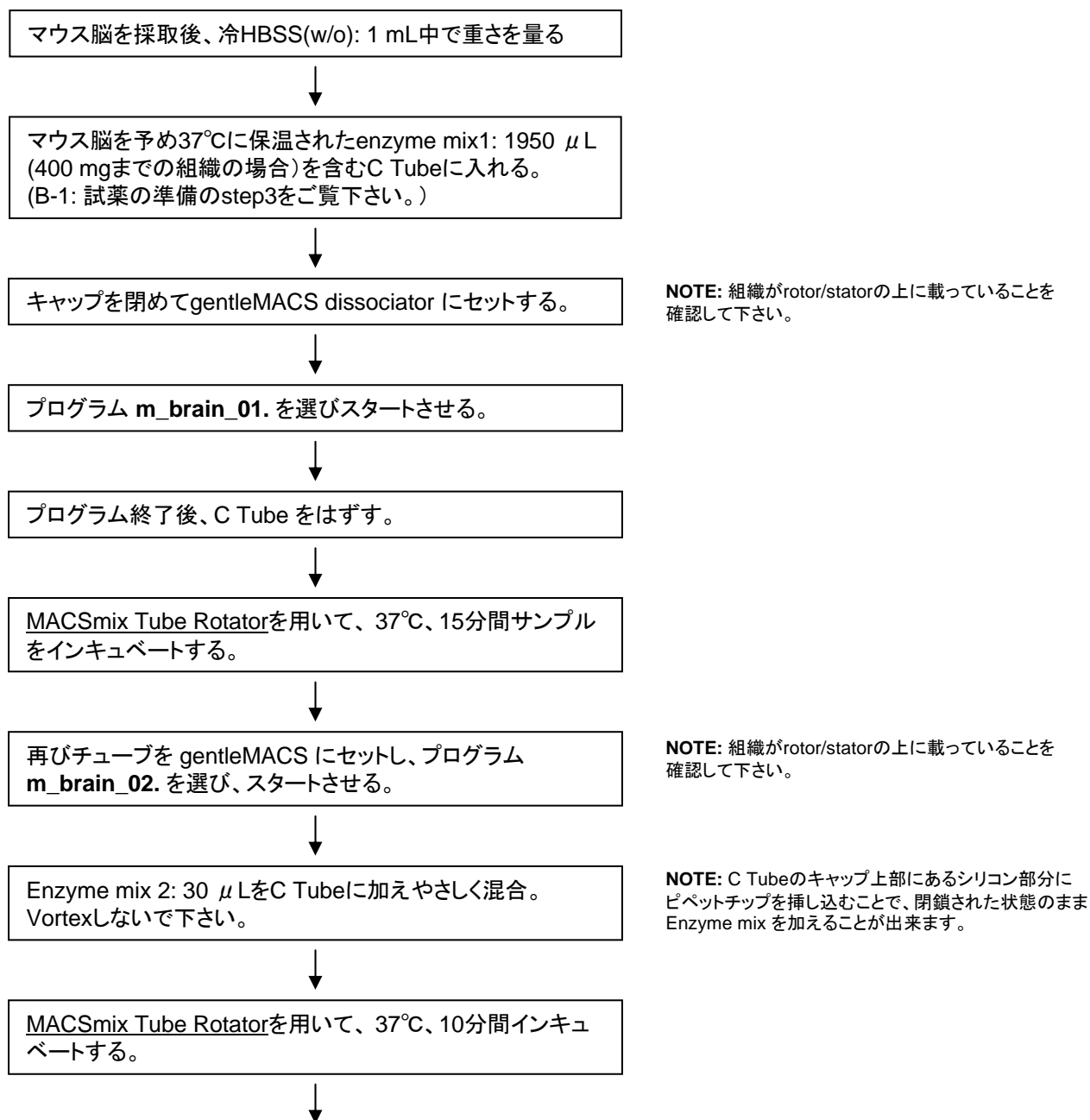
400 mg以下の組織の場合、Table 2に従い Enzyme mix 1: 1950 μLを調製しvortexする。
gentleMACS™ C tubeにenzyme mix 1 を移し、使用する前に予め37°Cで10-15分保温しておく。

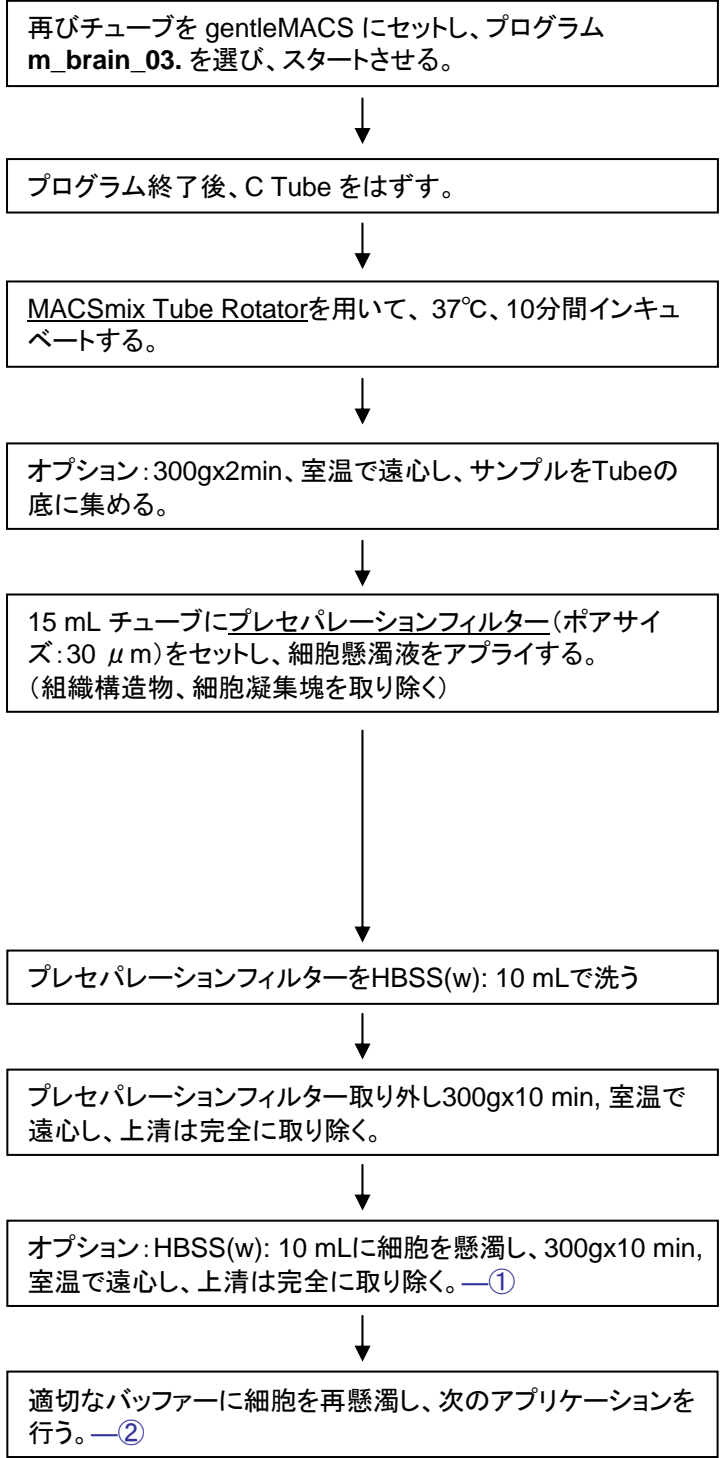
	Enzyme mix 1		Enzyme mix 2	
NTDK (P)	Solution 1 50 μL	Solution 2 1900 μL	Solution 3 20 μL	Solution 4 10 μL
NTDK (T)	Solution 1 200 μL	Solution 2 1750 μL	Solution 3 20 μL	Solution 4 10 μL

Table 2: enzyme mixesの準備

B-2. サンプルの準備

- 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。
- マウス脳の重さの目安: 3週齢マウスの場合・・・約400mg / whole brain
- 下記プロトコルでは、400mg以下のサンプルを処理する場合の量が記載されています。
400mg以上のサンプルを処理される場合は、全ての試薬量およびtotal volumeを増やしてください。
- C Tubelは、最大1600 mg のマウス脳まで調製できますが、総容量は10 mLを超えないで下さい。
- 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4 rpmで使用してください。
MACSmixが無い場合は、ローテーターで代用出来ます。





NOTE: 400 mg以上の脳を処理する際は、50 mLチューブおよび最適なCell strainerを使用して下さい。

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: プルンキエ細胞やモーターニューロン等の直径が30 μm以上の細胞はフロースルーとして回収できないため、これらの細胞が必要な場合は、最適なポアサイズのcell strainerをご使用下さい。

NOTE: 400 mg以上の脳を処理する際は、最大30 mLのHBSS(w)でcell strainerの洗いを行ってください。

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 μL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後、再度、①と②のステップを繰り返してください。