

コラゲナーゼ D 処理と組み合わせた マウス脾臓からの単細胞懸濁液の調製

A. 準備

- gentleMACS Dissociator
- gentleMACS C tube (130-093-237)
- MACSmix™ Tube Rotator (130-090-753)
- プレセパレーションフィルター (130-041-407) または ポアサイズ30 μm のナイロンメッシュ
- HEPESバッファー: 10mM HEPES-NaOH pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1.8mM CaCl_2
- コラゲナーゼD 溶液: 100 mg / mL in HEPES (コラゲナーゼD >0.15 U / mg、Roche Diagnostics)
- DNase I 溶液: 20,000 U / mL (AppliChem)
- PEBバッファー: PBS pH 7.2, 0.5% BSA, 2mM EDTA

*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 なども使用できます。

•オプション: ART 1000 REACH ピペットチップ(Molecular BioProducts, Inc.) またはそれと同等のサイズのチップなら、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. マウス脾臓からの単細胞懸濁液調製

- 組織分散後にカルチャーを行う場合は無菌的に操作をしてください。
- 脾臓重さの目安: BALB/c メス 6~7 週齢の場合...約 80~120mg / 脾臓

1~2 個の脾臓とコラゲナーゼ D 溶液 100 μL を 4.9 mL HEPES の入っている C Tube に入れる。(終濃度: 2mg/mL)



しっかりキャップを閉めてgentleMACS dissociator にセットする。組織がrotor/statorの上に載っていることを確認。



電源を入れ、プログラム m_spleen_02. を選び、スタートさせる。



プログラム終了後、C Tube をはずす。



MACSmix Tube Rotator を用いて、37°C、30分間インキュベートする。MACSmix Tube Rotatorがない場合は5分おきにチューブを転倒混和する。

* MACSmix Tube Rotatorは に C Tube を斜めに取り付け、12rpm で連続的に混和してください。



DNase I 溶液を 12.5 ~ 25 μL を入れる。
(最終濃度: 50 ~ 100 U / mL)



コラゲナーゼ D 処理と組み合わせた マウス脾臓からの単細胞懸濁液の調製



再びチューブを gentleMACS にセットし、組織が rotor/stator の上に載っていることを確認。
プログラム `m_spleen_03` を選び、スタートさせる。



プログラム終了後、C Tube をはずす。

* オプション: 軽く遠心し、サンプルをチューブの底に集める



プレセパレーションフィルターに細胞懸濁液を通し、15 mL のチューブに回収する。通し終わった後に HEPES バッファー 5 mL でメッシュを洗う。

* NOTE: ART 1000 REACH ピペットチップ (Molecular BioProducts, Inc.) またはそれと同等のサイズのチップなら、CTube 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。



プレセパレーションフィルターを捨て、300g x 10 min で遠心し、上清を吸引して捨てる。



PEB 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。