

## A. 準備

- gentleMACS Dissociator
- gentleMACS C tube (130-093-237)
- MACSmix™ Tube Rotator (130-090-753)
- ナイロンメッシュ ポアサイズ70 μm
- 赤血球溶血溶液 (10x) (130-094-183)
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 含む。2~8°Cに冷やしておく: 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.41 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.3 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 137.93 mM NaCl, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.55 mM Dextrose
- Collagenase II 溶液 : 10,000 U/mL in HBSS (Worthington, CLS-2)
- DNase I 溶液 : 30,000 U/mL (AppliChem)
- PEBバッファー: 0.5% BSA / 2mM EDTA / PBS, pH7.2
  - \*MACS BSA Stock Solution (130-091-376) をMACS Rinsing Solution (130-091-222) で1:20に希釈すると簡単に作れます。
  - \*EDTAをACD-A や CPD に替えることができます。
  - \*BSA のかわりにセラチン、マウス血清、FBS なども使用できます。
  - \*Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> を含むバッファーはお勧めいたしていません。
- 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 のキャップ中央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. マウス心臓からの単細胞懸濁液調製

- このプロトコールはマウスの心臓から内皮細胞やSca-1<sup>+</sup> 細胞を得るのに適しています。
- 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。
- 心臓の重さの目安: BALB/c メス 6~7週齢の場合・・・約80~115mg / 匹
- C Tube1本につき、最大4個のマウス心臓(400mg)を処理できます。

マウス心臓を上下二つになるようにカットし、冷やしたHBSS/バッファーで洗う。

HBSS 4.7mL の入っているC Tubeに心臓を移し、300 μL の Collagenase II 溶液 (終濃度600U/mL) と 10 μL の DNase I 溶液 (終濃度60U/mL) を加える。

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、m\_heart\_01. を選択。start ボタンを押す。

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。

このプロトコールは Collagenase II (Worthington, CLS-2) を使用した場合に最適です。他の酵素や濃度の使用にはお勧めしません。

\* MACSmix Tube Rotator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。

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_heart_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。

スピンドウンしてチューブの底にサンプルを集める

ナイロンメッシュ(ポアサイズ  $70\mu\text{m}$ ) に細胞懸濁液を通し、50mL のチューブに回収する。通し終わった後に HBSS 5mL でメッシュを洗う。

300g x 10 min で遠心し、上清を捨てる

1mL PEBバッファー で細胞を再懸濁し、10mL の 1x 赤血球溶血溶液を加える。

室温で最大2分間インキュベートする。

300g x 10 min で遠心し、上清を捨てる。

細胞を 1mL PEBバッファーで再懸濁してから、終量10mL にメスアップする。

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。

\* **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、C Tube のキャップ中央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**: 1x赤血球溶血溶液の調製に関しては、赤血球溶血溶液(10x) のデータシートを参照してください