

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100 μm
- 赤血球溶血溶液 (10x) (130-094-183)
- Kerbs-Ringer-Buffer (KRB) : 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 5.5 mM Glucose, 20.1 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, pH 7.4 (NaOH で調整)
- 0.5 M CaCl₂ 溶液
- 0.2 M MgCl₂ 溶液
- Collagenase IV 溶液 : 5,000 collagenase Digestion Units (CDU) / mL in KRB (collagenase IV C5138, Sigma-Aldrich)
- DNase I 溶液 : 30,000 U / mL in KRB (AppliChem)
- PEBバッファー : 0.5 % BSA / 2 mM EDTA / PBS, pH 7.2

*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 のかわりにゼラチン、マウス血清、FBS なども使用できます。

*Ca²⁺ Mg²⁺ を含むバッファーはお勧めいたしておりません。

- 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. マウス肝臓からの単細胞懸濁液調製

- このプロトコルは肝実質細胞以外の細胞 (i.e. LSEC, Kupffer 細胞) の調製に適しています。
- 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。
- 肝臓の重さの目安: CD1マウス 8週齢の場合・・・約750~1200mg / 匹
- C Tube1本につき、マウス1匹分の肝臓を処理できます。

C Tube 中でdissociation mix を用事調製する: 4.4 mL KRB, 20 μL CaCl₂, 50 μL MgCl₂, 500 μL collagenase IV 溶液 (終濃度500 CDU/mL), 25 μL DNase I 溶液 (終濃度150U/mL)

Dissociation mix を、30 分 37 °Cインキュベーションする。

肝臓を KRB でリンスする。

プレウオームしたDissociation mix の入っている C Tube に肝臓を入れる。

NOTE: 肝臓を破碎する前にピンセットを用いて胆嚢を取り除いてください。また、結合組織を取り除いてください。



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_liver_01.02 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。

* 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_liver_02.02 を選び、スタートさせる。



プログラム終了後、C Tube をはずす。



50 mL チューブとナイロンメッシュ(ポアサイズ100 μm)をあらかじめ PEB バッファーでリンスしておく。



ナイロンメッシュに細胞懸濁液を通し、50 mL のチューブに回収する。その後 PEB 5 mL で C Tube を洗いメッシュに通し、さらに PEB 10 mL でナイロンメッシュを洗い 50 mL チューブに集める。



オプション: 軽く遠心してサンプルをチューブの底に集める。

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。



ナイロンメッシュを捨てて、サンプルにさらに 10 mL PEB を加える。



肝実質細胞を取り除くため、17 - 21g, 4 分, 4 °C で遠心する。



上清をターゲット細胞の浮遊している画分とし、あらかじめPEBでリンスした新しい 50 mL チューブにピペットで上清を移す。

* デカンテーションで回収しないでください。



300 g, 10 分, 4 °C で遠心し、上清を吸引して捨てる



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

* **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



室温で 5 分インキュベートする。



PEBを 30 mL 加え、300 g, 10 分, 4°C で遠心し、上清を吸引して捨てる



PEB 1~2 mL で細胞を懸濁して再びPEBで 30 mL になるようにメスアップする。



300 g, 10 分, 4°C 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