

CD11c マイクロビーズ(マウス)による細胞分離

オーダー番号: 130-052-001

▲ 原理

CD11c⁺細胞をCD11cマイクロビーズで磁気標識する。

MACS Separator の磁場内に置いたカラムに細胞懸濁液をアプライする。

カラムのフロースルー (CD11c⁻細胞) を回収する。《ネガティブフラクション》

カラムを磁場からはずし、CD11c⁺細胞を回収する。《ポジティブフラクション》

▲ 準備するもの

- バッファー(脱気済): 0.5% BSA, 2 mM EDTA を含む PBS (リン酸緩衝食塩水) pH 7.2 (保冷: 4-8°C)
調製法は、こちらをご覧ください。 ⇒ [【準備】MACSバッファーの調製](#)
- MACS カラムと MACS Separator:
データシートを参照して細胞数と目的に合ったカラムと分離装置をお選びください。
- Collagenase D: 2 mg/ml in 10 mM HEPES-NaOH pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂ (Collagenase D は、0.15 U/mg 以上の精製度の良いものをお使いください(例: Roche Diagnostics 社))
- (オプション)Fcレセプターを介した蛍光染色を避けるための[FcRブロッキング試薬\(マウス\)\(#130-092-575\)](#)
- (オプション)フローサイトメーター解析のための蛍光標識CD11 抗体:[CD11c-FITC\(#130-091-842\)](#)、[CD11c-PE\(#130-091-830\)](#)、もしくは[CD11c-APC\(#130-091-844\)](#)など。
- (オプション) フローサイトメーター解析より死細胞を除去するための染色試薬:
[PI \(propidium iodide, #130-093-233\)](#)、もしくは [7-AAD \(7-Amino-actinomycin D\)](#) など。
- (オプション)細胞塊を除去するための[プレセパレーションフィルター\(# 130-041-407\)](#)
- (オプション)死細胞を除去するための[死細胞除去キット\(# 130-090-101\)](#)

▲ プロトコール

1. サンプルの調製

マウス脾臓から高い回収率と純度の良いCD11c⁺樹状細胞を得るために、コラゲナーゼD消化による単細胞懸濁液の調製法をお勧めします。 ⇒ その他のサンプル調製の英語プロトコールは[こちらをご覧ください](#)

- マウスから摘出した脾臓を、底が完全に隠れるまでコラゲナーゼ D を入れた(約 5mL)直径 6cm のシャーレに置く。
↓
- 1mL シリンジと 25G ニードルを用いて 1 脾臓につき 500 μL のコラゲナーゼ D をマウス脾臓に注入し、鋭利なハサミを用いて組織を小さな切片に切断する。
↓
- 脾臓片をコラゲナーゼ D 溶液中で、37°Cで 30 分間インキュベーションする。
↓
- 脾臓片を 70 μm のセルストレイナーにプランジャーを用いて通し、断片等を除く。
↓
- 15 mL チューブに細胞を回収し、容量が 14 mL になるようにバッファーを加えて細胞を懸濁する。

2. 磁気標識

★操作は手早く、細胞は常に冷却し、バッファーは前もってよく冷やしてお使いください。これにより、抗体のキャッピングと非特異的吸着を防ぎます。

★サンプル中に細胞の塊があると分離精度が低下しますので、単細胞懸濁液にして下さい。塊がある場合、[プレセパレーションフィルター\(# 130-041-407\)](#)に通します。プレセパレーションフィルターは使用前に 1mL のバッファーを流してフィルターをリンスします。

★死細胞は、非特異的にマイクロビーズに付着する可能性があります。死細胞の除去には、密度勾配遠心、もしくは[死細胞除去キット\(# 130-090-101\)](#)をお勧めします。

- | | |
|---|--|
| <p>□ 細胞数をカウントする ① <u> </u> x 10⁸ cells ⇒ A</p> <p>↓</p> <p>□ 遠心 (200xg, 10 分, 4°C) ②</p> <p>↓ ③</p> <p>□ 細胞をバッファーに再懸濁する ④</p> <p style="padding-left: 20px;">400 μL / 10⁸ cells <u> </u> μL</p> <p>↓ ⑤</p> <p>□ CD11c マイクロビーズを加える</p> <p style="padding-left: 20px;">100 μL / 10⁸ cells <u> </u> μL</p> <p>↓</p> <p>□ 良く混和して、冷蔵庫(4-8°C)で 15 分間インキュベート ⑥</p> <p>↓</p> <p>□ (オプション) 染色抗体を加え、冷蔵庫(4-8°C)で 5 分間インキュベート ⑦</p> <p>↓</p> <p>□ バッファーを加える</p> <p style="padding-left: 20px;">10-20 mL / 10⁸ cells <u> </u> mL</p> <p>↓</p> <p>□ 遠心 (200xg, 10 分, 4°C) ②</p> <p>↓ ③</p> <p>□ 10⁸ cells 以下の細胞を 500 μL のバッファーに再懸濁する ⑧ ⇒ B</p> <p style="padding-left: 20px;"><u> </u> μL</p> | <p>① 細胞数が 10⁸ cells を超える場合、バッファーやマイクロビーズの量は比例計算して増やします。細胞数が 10⁸ cells に満たない場合、バッファーやマイクロビーズ量はここに記載してある量で行って下さい。細胞数のカウントには、赤血球の数を含まないようにして下さい。</p> <p>② 200xg は、シングロータの場合、半径 17cm で 1,025 rpm です。</p> <p>③ 上清をアスピレートして完全に除きます。細胞をタッピングして良くほぐして下さい。金網などでハーブを奏できるようにやさしくチューブ底を波打たせると、細胞が良くほぐれます。</p> <p>④ 全液量が 400 μL / 10⁸ cells となるようにバッファーを加えます。</p> <p>⑤ 高純度の樹状細胞(≥90%)を得るためには、DC11c マイクロビーズを加える前に、FcR ブロッキング試薬(マウス)を添加し、Fc receptor を介した磁気標識をブロックします。</p> <p>⑥ 氷上でインキュベートすると、時間がかかります。室温あるいは長時間のインキュベートは非特異的吸着を起こします。</p> <p>⑦ 添加量は抗体データシート等を参照ください。</p> <p>⑧ 細胞数が 10⁸ cells を超える場合、バッファー量は比例計算して増やします。LD カラムを使用する場合は、500 μL / 1.25 x 10⁸ cells となるようにバッファーに再懸濁します。</p> <p>A 標識前サンプル
オプション操作で全細胞を蛍光標識する場合には、アイソタイプコントロール染色用に、一部を取り分けておきます。</p> <p>B オリジナルフラクション
純度・回収率の解析のために、一部を取り分けておきます。</p> |
|---|--|

3. 磁気分離

- ★カラムにかける全細胞数とカラムに保持させるCD11c⁺細胞により、適したカラムと分離装置を選択して下さい。
- ★存在率の低いサンプル(目安:5%以下)よりポジティブセレクションで高い純度を得るためには、カラムによる分離を2度行います(カラムを2本使用します)。

3-1. MS カラム/LS カラムによる磁気分離

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> □ カラムを MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを適量のバッファーでリンスする ②
MS: 500 μL LS: 3 mL <li style="text-align: center;">↓ □ ネガティブフラクション回収用のチューブをセットし、細胞懸濁液をカラムにアプライする ⇒ C <li style="text-align: center;">↓ □ カラムをバッファーで3回洗浄する ③ ⇒ C
MS: 3x500 μL LS: 3x3 mL <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを磁石からはずし、ポジティブフラクション回収用チューブの上に置く ④ <li style="text-align: center;">↓ □ 適量のバッファーをカラムに添加し、速やかに添付のプランジャーで磁気標識された細胞をしっかりと押し出す ⇒ D
MS: 1 mL LS: 5 mL <li style="text-align: center;">↓ □ より純度を上げるため、リンス済みの新しいカラムを用いて磁気分離を繰り返す ⇒ D | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくはカラムのデータシートをご覧ください。 ② リンスした液にはカラムのコーティングが溶け出しているため、捨てて下さい。 ③ カラム上部の液が落ちきってから、次のバッファーを加えて下さい。 ④ カラムを2回通す場合は、回収用チューブではなく、リンス済みのカラムの上に直接溶出することができます。 C ネガティブフラクション
細胞懸濁液のフロースルーとカラムの洗浄液を合わせた非標識細胞のフラクション D ポジティブフラクション
CD11c マイクロビーズで標識された細胞のフラクション |
|---|--|

3-2. XS カラムによる磁気分離

カラムのアセンブリ及び分離については、XS Column data sheet をご覧ください。

3-3. LD カラムによるディプリーション

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> □ LD カラムを MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを2 mLのバッファーでリンスする ② <li style="text-align: center;">↓ □ ネガティブフラクション回収用のチューブをセットし、細胞懸濁液をカラムにアプライする ⇒ C <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを1 mLのバッファーで2回洗浄する ③ ⇒ C | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくは LD カラムのデータシートをご覧ください。 ② リンスした液にはカラムのコーティングが溶け出しているため、捨てて下さい。 ③ カラム上部の液が落ちきってから、次のバッファーを加えて下さい。 C ネガティブフラクション
細胞懸濁液のフロースルーとカラムの洗浄液を合わせた非標識細胞のフラクション |
|--|--|

3-4. CS カラムによるディプリーション

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> □ CS カラムを組み立て、MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 60 mL のバッファーでリンスする ② <li style="text-align: center;">↓ □ 22G flow resistor をカラムの 3-way-stopcock に装着する ① <li style="text-align: center;">↓ □ ネガティブフラクション回収用のチューブをセットし、細胞懸濁液をカラムにアプライする ⇒ C <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 30 mL のバッファーで洗浄する ③ ⇒ C | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくは CS カラムのデータシートをご覧ください。 ② リンスした液にはカラムのコーティングが溶け出しているため、捨ててください。 ③ カラム上部の液が落ちきってから、次のバッファーを加えてください。 <p>C ネガティブフラクション
細胞懸濁液のフロースルーとカラムの洗浄液を合わせた非標識細胞のフラクション</p> |
|---|--|

3-5. D カラムによるディプリーション

カラムのアセンブリ及び分離については、D Column data sheet をご覧ください。

3-6. autoMACS による磁気分離

★ autoMACS のマニュアルは、こちらよりご覧いただけます。 ⇒ [マニュアル](#)

★ autoMACS Separator、auto MACS Pro Separator にて使用するバッファーは、10°C 以上にしてください。

autoMACS Separator

分離ストラテジー	推奨プログラム	アウトレットポート
ポジティブセレクション	Posseld	Pos2
ディプリーション	Depletes	neg1

auto MACS Pro Separator

分離ストラテジー	推奨プログラム	チューブラック
ポジティブセレクション	Posseld	C
ディプリーション	Depletes	B

★ 最適なプログラムは、分離のストラテジー、磁気標識の強さ、磁気標識細胞の存在率により変わります。autoMACS ユーザーズマニュアルの「分離プログラム」の項を参考にして最適なプログラムを選択してください。

4. (オプション)分離精度の評価

各フラクションから分取したサンプル(フラクション **A**、**B**、**C**、**D**)は、蛍光標識抗体で染色することにより、フローサイトメーターまたは蛍光顕微鏡で分離精度を確認することができます。