

Tech Support

- ▶ Contact Us
- ▶ FAQs
- ▶ Methods
- ▶ Software Upgrades

MED64 Systems
お問い合わせ
テクニカルサポート

Methods

心筋細胞培養プロトコル

名古屋大学環境医学研究所循環器分野
李 鍾国
E-mail: jlee@riem.nagoya-u.ac.jp

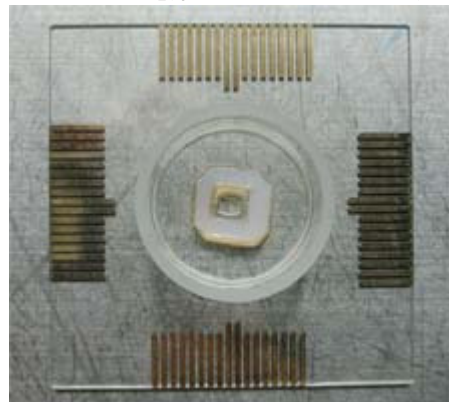
- (1) シリコン枠の準備
- (2) プローブの事前滅菌
- (3) プローブのコラーゲンコーティング
- (4) 培養器具の事前滅菌
- (5) 心筋細胞の培養
- (6) 細胞の播種と培地交換
- (7) 細胞の活動状態
- (8) 参考文献

(1) シリコン枠の準備

—十分量の細胞が得られる場合は、このステップを省略することも可能—

1. シリコンシートを用いて正方形の枠(リング)を作る。使用する電極アレイが全て囲いの中に入るように作成する。高さは2~3mm程度。
2. 上記シリコンリングをシリコン性接着剤(信越化学、一液型RTゴム:KE45T)で装着する。
#電極を傷つけないように注意
3. 約8時間程度乾燥させる。

(シリコンリングを貼り付けたMEDプローブ)



[\(目次トップへ\)](#)

(2) プローブの事前滅菌

1. シリコンリングをつけたMEDプローブを70%EtOHにつける(15min)

2. クリーンベンチ内で完全に風乾させる(30min)
3. クリーンベンチ内でUV照射(15min)
4. 滅菌済み10cmシャーレ内にMEDプローブを格納

[\(目次トップへ\)](#)

(3) プローブのコラーゲンコーティング

1. ラットテールコラーゲン液*を電極面全体に注入する
2. 37°Cインキュベーター内で30分インキュベートする
3. クリーンベンチ内でパストゥールピペットでコラーゲン液を除去する
4. 滅菌PBS(-)で2回リンス(各1~1.5cc)
5. クリーンベンチ内でなるべく風乾させる(表面の水滴がなくなる程度でよい)
6. 血清入りの培地(10%FBS M199)を入れ37°Cインキュベーター内で約15分程度おく
7. 使用前に培地を吸引してから、本培養に用いる

*ラットテールコラーゲンの場合は、0.15M酢酸で5倍希釈し、40 ug/mL 程度の濃度のもを用いる。(市販のコラーゲンでも可能)

[\(目次トップへ\)](#)

(4) 培養器具の事前滅菌

眼科用ハサミ2本、ピンセット2本、ビーカー(30 mL 1個、50 mL 1個)をオープンで乾熱滅菌(250°C、30分)。滅菌後、ビーカーにはそれぞれ70%EtOHを入れておく。

[\(目次トップへ\)](#)

(5) 心筋細胞の培養

— Worthington社: Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (NCISキット) を使用。Original の使用方法から改変 —

[1日目]

1. 新生仔ラット(生後1日齢)をエタノールにつけた後、すばやく開胸し心臓を摘出**、HBSSに入れる(上記 NCISキットに添付されている。事前に4°Cに冷やす。実験中は直径10cmの滅菌済シャーレにいれ常に氷上におく。上記処置を一匹ずつ行う(合計約10匹)。
2. 新しいハサミで心室を他の部分から切り離して、新しいHBSSに入れる。
3. 心室をハサミで切り、できるだけ小さな切片にする。
4. 心室切片をNCISキット添付のトリプシンを溶かしたHBSS(トリプシンの最終濃度: 100 ug/mL)に移す。
5. 冷蔵庫に入れて処理(overnight)。

**麻酔方法に関しては、各施設の動物実験規則に従って施行して下さい。

[2日目]

1. NCISキットに添付の L-15液 20 mLに、同じく添付の collagenase 1バイアル分を溶かす(以下 A液)とする。
 2. 一晩おいた心臓の薄片入りのトリプシン入りHBSSを、遠心チューブ(50 mL、Falcon)に移す。
 3. 遠心(@ 1000 rpm、5分、室温)(フタをきつく閉めすぎないように注意)
 4. 上清を捨てる
 5. A液 20 mLを上記遠心チューブに添加して、軽くピペティング。
 6. 75 cm² 培養フラスコ(Falcon: #353136, vent cap)にすべて移す。
 7. Water Bath (37°C) で立ててゆっくりshakeする(30~45分)
- 注) 切片の状態では時間を調整。処理しすぎると細胞にダメージを与える場合あり

8. 室温にてゆっくりピペッティングし(10~20回)、3~4分放置。
9. セルストレイナーに通す。
10. (O₂ でバブリング)(スキップ可能)
11. (室温で20分放置)(スキップ可能)
12. 手で少し揺らす。
13. 遠心(@ 1000 rpm、5分、室温)
14. 上清を捨てる。
15. NCISキットに添付の L-15液 20 mL を加える。
16. 軽くピペッティング。
17. 遠心(@ 1000 rpm、5分、室温)
18. 上清を捨てる。
19. NCISキットに添付の L-15液 20 mL を加える。
20. 軽くピペッティング。
21. 遠心(@ 1000 rpm、5分、室温)
22. 上清を捨てる。
23. 培地(10%FBS M199) 10 mL に懸濁。
24. 25 cm² 培養用フラスコ (Corning: #430639, vent cap) に入れ、37°Cインキュベーター内に放置(30分)
#pre-plating method: fibroblast を除去
25. 浮遊液を回収

[\(目次トップへ\)](#)

(6)細胞の播種と培地交換

1. 回収した浮遊液10 mL を、あらかじめ準備したMED プローブのシリコン枠内に静かに入れる。
(参考)1.5 x 10⁷ cell/ml の液を調整し、下記の量をシリコン枠内に入れると電極アレイ面に細胞が存在する状態になる。

- # 電極間隔 150 um(シリコンリング3mm角程度) : 25 -50 uL
- # 電極間隔 450 um(シリコンリング5mm角程度) : 50-100 uL

2. CO₂インキュベータで30分~1時間ほど細胞がMEDプローブ上に付着するのを待つ。
3. 付着後、静かに枠の外側から下記の培養液(1~1.5 mL)を入れ、シリコン枠内の培養液と混合させ、本培養を開始する。

(培地: 10%FBS M199)

M199 (培地)	GIBCO 11150-059
10% 胎仔ウシ血清(FBS)	GIBCO
抗生物質(ゲンタマイシン) 50 ug/mL	SIGMA

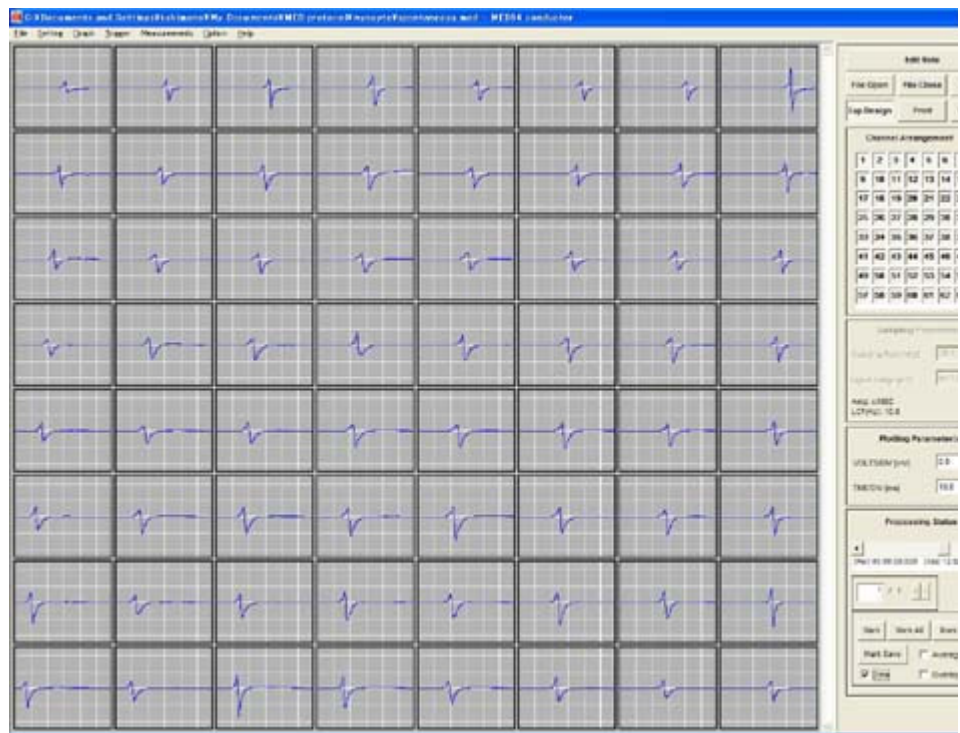
* 培地は、少なくとも一日おきに交換する(全量交換)

[\(目次トップへ\)](#)

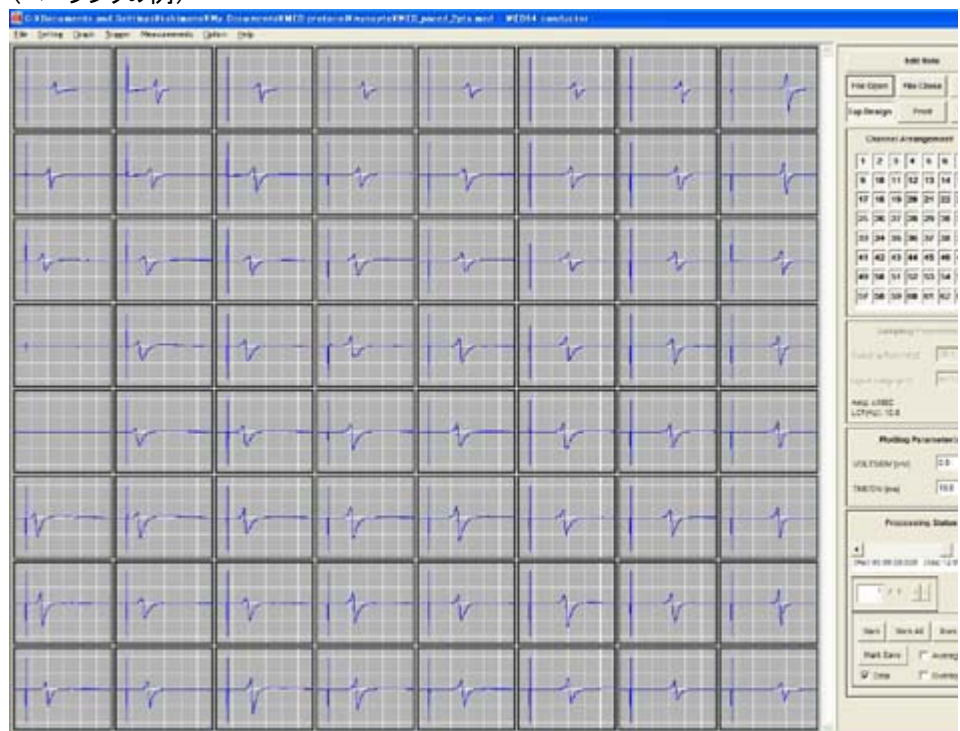
(8)細胞の活動状態

1. 自発細胞外電位記録は約2日後から可能
2. ペーシングによる細胞外電位記録は約3-5日後から可能

(自発活動の例)



(ペースンクの例)



[\(目次トップへ\)](#)

(8)参考文献

1. Jong-Kook Lee et al, Circulation. 2002;106.II-68
(abstract: American Heart Association 75th Annual Scientific Meeting).

[\(目次トップへ\)](#)

[\(Methodのトップページへ\)](#)

[Home](#) | [Products](#) | [Software](#) | [Tech Support](#) | [Downloads](#) | [Applications](#) | [Publications](#) | [Technology](#)

© 2002, Alpha MED Sciences Co., LTD.