

ユーザー提供プロトコール : ICELL8 システム解析用の成体マウス心筋細胞の調製

本プロトコールは Max Planck Institute for Heart and Lung Research (マックスプランク心肺研究所) の研究者が、自身の研究 (Yekelchyk *et al.* 2019) の中で、ICELL8 Single-Cell System 解析用の心筋細胞を調製するために使用したプロトコールを参考に作成しています。

ICELL8 を用いて心筋細胞のシングルセル解析を行った例を紹介したテクニカルノートは [こちら](#) »

本プロトコールは英語版プロトコールの和訳です。オリジナルの英語版プロトコールは [こちら](#) »

イントロダクション

初代の成体マウス心筋細胞は、デリケートで、時に多核細胞が含まれており、単離の難しい細胞型です。また、細胞のサイズも極めて大きいため、マイクロフルイディクスやドロップレットをベースとした scRNA-seq 法では解析が難しいことが難点でした。ICELL8 システムは、大きなサイズの細胞の分注に対応できる大口径ノズルを特長としており、心筋細胞の単離に適したシステムです。さらに、ICELL8 システムでは、ユーザーがウェル内に単離された心筋細胞の画像を確認し、その後の処理を行うかどうかを決定することができることも大きな利点です。本プロトコールでは、ICELL8 システムで分注及び解析を行う準備として、成体マウスの心臓から心筋細胞を単離する方法についてご説明します。単離プロトコールは、主に、2017 年の O'Connell, Rodrigo 及び Simpson による文献 (O'Connell *et al.*, 2007) を参考にしています。

プロトコール

A. 灌流バッファの調整

本プロトコールにおける灌流バッファの組成は、O'Connell のプロトコールとは若干異なります (下記の組成表を参照)。調製する灌流バッファの総容量は、お使いになる灌流装置の容量 (mL) の 2 倍に 10 mL を足した容量です。全プロセスで下記のバッファを使用しますが、各段階で他の添加物も使用します。

1. 下記の通り、灌流バッファを調製します。

- 113 mM NaCl
- 4.7 mM KCl
- 0.6 mM KH₂PO₄
- 0.6 mM Na₂HPO₄
- 1.2 mM MgSO₄ × 7H₂O
- 12 mM NaHCO₃
- 10 mM KHCO₃
- 10 mM HEPES
- 30 mM タウリン

下記は、使う直前に添加します。

- 10 mM 2,3-ブタンジオン-モノキシム (BDM) *
- 5.5 mM グルコース

注記 : BDM は、心収縮の抑制に使用します。単離プロセスを通じて Ca²⁺がない状態を作ることも重要です。

B. サンプルの採取

このサブプロトコールを実施するユーザーを補助するため、類似する視覚的なプロトコール ([Judd, Lovas, and Huang 2016](#)) をご参考ください。このサブプロトコールを開始する前に、お使いの灌流装置に十分な灌流バッファーを準備してください。また、灌流バッファー中でリパーゼ酵素を最終濃度 0.25 mg/mL に再懸濁し、灌流バッファーと同量の消化バッファー（組織消化用）を準備し、氷冷してください。さらに、仔ウシ血清 10%の灌流バッファーを 10 mL 準備し（消化を止める用）、氷冷してください。

1. マウスの腹膜にヘパリン及び麻酔を注射します。マウスの意識消失後、心臓を取り出し、右心室で結紮し、動脈にカニューレを挿入します（カニューレの先端が大動脈弁のすぐ上に来るように）。直ちに灌流バッファーで灌流を開始してください。
2. 灌流開始の約 30 分後、灌流速度が上昇したら、流入していた灌流バッファーを消化バッファーに換え、消化を開始させます。
3. 顕微鏡で液中の解離細胞を確認し、消化の進捗を確認します。消化の合計時間は、心臓の特性（マウスの年齢、線維化ステージなど）によって異なります。棒状構造のシングルセルが認められ、心臓が変色、膨張、弛緩したら、次のステップに進んでください。
4. この時点で、心臓を灌流装置から外し、消化バッファー 10 mL を入れた時計皿に置きます。
5. 心臓をピンセットでばらばらにし、10-mL ピペットで極めてゆっくりと優しくバッファーを組織に移しながら、心臓を分解します。心筋細胞は極めてデリケートですので、激しいピペットリングは避けてください。
6. 溶液を 50-mL ファルコンチューブに移します。同量の新鮮な灌流バッファー+血清（事前に準備）を添加して、消化を止めます。血清の最終濃度は 5%にしてください。
7. 数分後、大半の心筋細胞が底に沈殿します。上澄み液の大半（沈殿していない心筋細胞を含有）を慎重に 15-mL チューブに移し、500G で 1 分間遠心分離してください。このステップは、できるだけ多くの心筋細胞を回収するために行います。
8. 上澄み液（平滑筋及び線維芽細胞を含有）を流し、得られたペレットをステップ 6 の 50-mL チューブに注ぎます。
9. 100- μ M シーブで細胞懸濁液をろ過します。
10. バッファー中に 100 倍に希釈した細胞懸濁液を使って、Sedgewick-Rafter カウンティングチャンバー又は標準的な血球計で細胞をカウントします。顕微鏡で、細胞残屑と共に棒状細胞や円形細胞が検出されます。棒状細胞のみを健康な心筋細胞とみなし、良好なサンプルでは、棒状細胞が円形細胞より多くなります。ステップ C.5.a で必要となるため、ここで細胞数を記録してください。

C. 細胞の染色及びカウント

1. 室温で計 5 分間、細胞染色を行います。細胞懸濁液に、細胞質を標識するための CellTracker 染料 1 μ M（1-mM ストック溶液を 1000 倍に希釈）と Hoechst 染料（1 mL あたり 1 滴）を添加します。細胞が沈殿し始めたら、染料添加後にチューブを反転させます。ピペットリングしないでください。
2. 細胞を灌流バッファーで洗浄します。100G で 30 秒間細胞を遠心分離した後、上澄み液をピペットで取り出します。（あるいは、室温で約 5 分間、心筋細胞を沈殿させます。）灌流バッファー 1 mL を添加し、反転させて再懸濁します（ピペットリングしないでください）。灌流バッファーを各 1 mL 使い、洗浄を 2 回行います。

任意：必要な場合は、蛍光顕微鏡で染色を確認してください。細胞質は赤、核は青に染色されています。

3. 分注を行う細胞の希釈率を算出するには、最終細胞濃度が重要です。細胞懸濁液の総容量を記録します。以下のいずれかの選択肢を用いて細胞をカウントしてください。

a. 理論式：単離プロセスを通じた生存率は 40%程度になる傾向がありますので、分注する最終細胞数は、ステップ B.10 の単離後に得られた最初の細胞数を用いた以下の計算式に基づいて算出することができます。

$$\text{最終細胞濃度} = (c * 0.375) (u / f)$$

c = ステップ B.10 でカウントした最初の細胞数/mL

f = mL、洗浄後に細胞の再懸濁を行った最終容量

u = mL、染色に用いた容量（例：2 mL）

b. 実数値：カウンティングチャンバー又は標準的な血球計

D. ICELL8 システムによる細胞の分注

ICELL8 システムのユーザーマニュアルに記載の運用・分注に関する指示をご参照ください。

1. 分注前に、細胞を $\lambda 0.25$ （200 nL あたり 1 細胞）に希釈します。本溶液 1 mL の調製には、RNase 阻害剤 0.4 U/ μ L 及び 5 倍の二次希釈剤を使用します。

注記：

- ・ 心筋細胞には、他の細胞型に使われる通常の λ より低い λ を使用します。また、希釈剤の濃度も通常より高くなっています。
- ・ 陰性対照及び陽性対照については、ユーザーマニュアルに従って RNase 阻害剤 0.4 U/ μ L 及び 1 倍の二次希釈剤を使用してください。

2. 8 個のサンプルウェルにそれぞれ 35 μ L の細胞懸濁液を添加して、ソースプレート準備します。ソースプレートに基準混合物、陽性対照及び陰性対照を添加してください。
3. ソフトウェアで適切なオプションを選択し、サンプル分注プロセス中に一時停止ステップを追加します。最初の分注後、ユーザーに一時停止が作動したことを知らせるメッセージがソフトウェアによって表示されます。この時点で、分注プラットフォームからソースプレートを取り出し、サンプルウェル 8 個の細胞懸濁液をそれぞれ 35 μ L の新鮮な細胞懸濁液と入れ替え、慎重にソースプレートを分注プラットフォームに戻します。

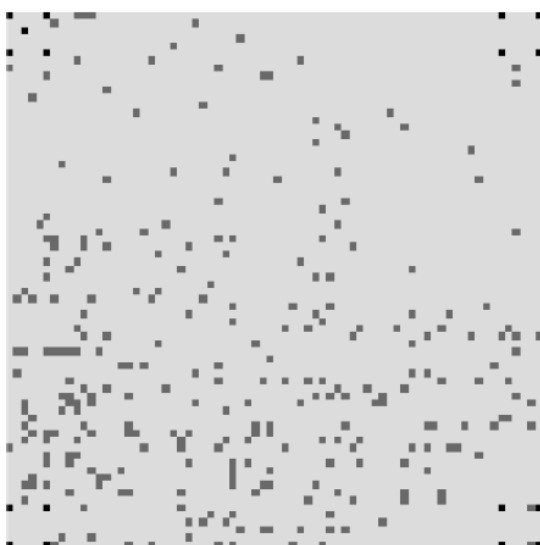
注記：ICELL8 cx Single-Cell System では一時停止の作動が異なる場合があります。機能を使用されたい場合はお問い合わせください。

4. 次に、[スタート]を押してプロトコールを再開します。一時停止プロンプトが表示されます。一時停止後、全てのウェルの細胞懸濁液を廃棄し、1 ウェルにつき 35 μ L の新鮮な細胞懸濁液を新たに添加してください。ピペッティング操作と細胞分注の間の待ち時間をできるだけ短縮するようにしてください。

重要：このステップは必須です。心筋細胞は、サイズが大きいため、すぐに底に沈殿します。一時停止ステップを導入しない場合、最初の分注で多くの細胞が吸引され、分布が不均一となります（図 1）。

ICELL8 細胞分注後における心筋細胞の分布

Without pause steps



With pause steps

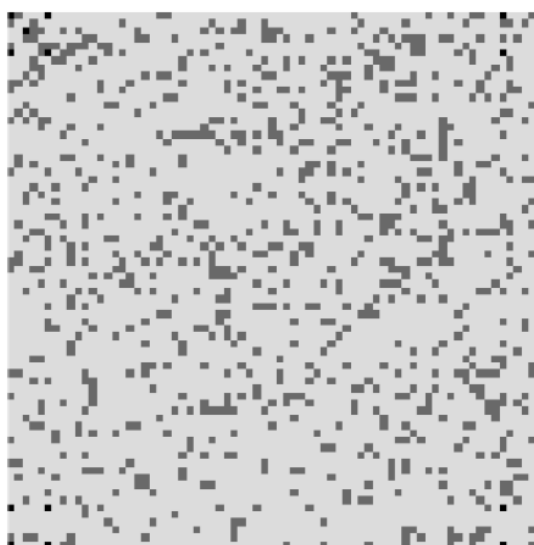


図 1. 上記イメージのグレーは、細胞を含むウェルの分布を一時停止ステップがある場合とない場合で示しています。

一時停止ステップを追加することで、細胞の単離率は著しく向上します。

5. 全ての分注が完了したら、300 G で 3 分間プレートスピンをし、画像取得に移ります。

E. 画像とマニュアルによる選別

画像ソフトウェアのユーザーマニュアルに記載のマニュアル選別に関する指示をご参照ください。

1. CellTracker 染料を検出するため、チャンネル設定を調整します。「ガンマ」を 0.8 に、「最小自動コントラスト範囲」を 255 に設定してください。本プロトコールでは、事前に設定された「DAPI」及び「Texas Red」チャンネルは使用しません。画像を最適化するには、赤色のチャンネルで露光量を調整してください。

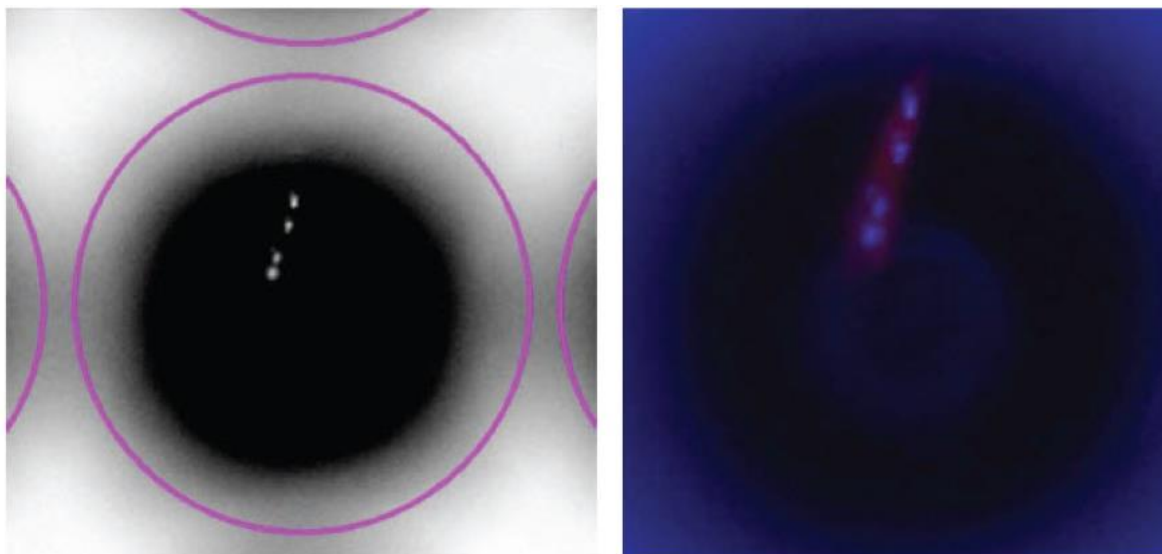


図 2 ICCELL8 Chip のウェル中で単離された棒状体の多核心筋細胞の可視化

注記：二核心筋細胞と単核心筋細胞の典型的な比率は 80 : 20 です。マニュアルによる選別には、以下の基準が推奨されています：単核細胞、二核細胞及び多核細胞は棒状体であり、核は細胞質と重複している必要があります。

F. ライブラリー作製

詳細なライブラリー作製方法については、ICELL8 3' DE Kit ユーザーマニュアルをご参照ください。本プロトコールには、以下の変更を適用してください。

- ・細胞溶解中に、チップを 72℃ で 5 分間温めて予熱ステップを行い、その後すぐに氷冷してください。これは、適正な細胞溶解に重要なステップです。
- ・2 倍の濃度の Triton X-100 で RT-PCR 反応を準備してください。

必要な試薬・器具

- ・2,3-ブタンジオン-モノキシム (Sigma-Aldrich 社、カタログ番号 B0753) を含む灌流バッファーの成分
- ・リベラーゼ T-Flex 研究用グレード (Roche 社、カタログ番号 05989132001)
- ・仔ウシ血清 (Sigma-Aldrich 社、カタログ番号 C8056-100ML)
- ・EASYstrainer 細胞シーブ (Greiner Bio-One 社、カタログ番号 542000)
- ・Graticules S52 Sedgewick Rafter カウンティングチャンバー (ガラス製) (Spi Supplies 社、カタログ番号 01010-AB)
- ・CellTracker Red CMTPX 染料 (Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号 C34552)

参考文献

Judd, J., Lovas, J. & Huang, G. N. Isolation, Culture and Transduction of Adult Mouse Cardiomyocytes. J. Vis. Exp. (2016).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091965/>

O'Connell, T. D., Rodrigo, M. C. & Simpson, P. C. in Cardiovasc. Proteomics 271–296 (Humana Press, 2007).

Yekelchyk, M., Guenther, S., Preussner, J. & Braun, T. Mono- and multi-nucleated ventricular cardiomyocytes constitute a transcriptionally homogenous cell population. Basic Res. Cardiol. 114, 36 (2019).

<https://doi.org/10.1007/s00395-019-0744-z>

製品情報

製品コード	製品名	容量
640190	ICELL8® cx Single-Cell System	一式

© 2019 Takara Bio Inc. All Rights Reserved.

本紙で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販または譲渡、およびこれらのための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。本紙に記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

タカラバイオ株式会社

首都圏支店 TEL : 03-3271-8553 FAX : 03-3271-7282

関西支店 TEL: 077-565-6969 FAX : 077-565-6995

テクニカルサポートライン、受託窓口 TEL : 077-565-6999 FAX : 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

Clontech **Takara** cellartis