

Isolation of Mouse Peritoneal macrophage (PEC)

2016. 10 ver.1

by Tommy & Takeda

①Thioglycollate 注射

1. <準備> 4% Thioglycollate 培地作成。
 - ① BD Difco™ Fluid Thioglycollate Medium 4 g を MQW 100 mL に溶かす。
 - ② オートクレーブで滅菌、5 mL ずつ遠沈管に分注する。

☞作成後 1 週間放置したのちに使用する。(不溶物を沈降させるため)

☞液の半分以上が赤褐色になった場合(=酸化)使用しないこと。(酸化していると綺麗な細胞が取れない)
2. (Day 0) 8~12 週齢のマウスに 4% TGC を 2 mL 腹腔内注射を行う (Fig. 1).
 - ① 4%TGC をあらかじめ注射器(27G needle)に充填しておく。
 - ② マウスを左手で保定、腹部を 70% エタノールで消毒する。
 - ③ マウスを逆さにした状態で下腹部あたりに注射する。

②PEC 回収

3. <準備> マウス解剖用はさみ、ピンセット、10 mL 注射器、23G 注射針、PBS (10 mL/mouse)、50 mL 遠沈管、セルストレイナー (40 mm)、70% エタノール、エタノール用容器

☞使用する PBS や細胞を回収する遠沈管は必ず氷上でしっかり冷やしておく。
4. (Day 2~3) マウスを頸椎脱臼法にて速やかに安楽死させる (Fig. 2)。
5. 70% エタノールが入った容器にマウスを浸し、全身をよく消毒する。
6. マウスを仰向けに寝かせ、腹部の中央に小さな切れ込みを入れる (Fig. 3)。
7. 手でマウス表皮を上下に引っ張り腹膜を露出させる (Fig. 3)。
8. 氷冷 PBS を注射器に 10 mL 充填する。臓器、特に腸管を傷つけないために PBS を徐々に吐き出しながら、注射の針を脾臓の下付近からゆっくり挿入する。その後 PBS をゆっくりと全量注入する (Fig. 4)。
9. 注射器を用いて注入した PBS をゆっくり回収する。8 mL 程度回収できれば良い (Fig. 4)。
10. セルストレイナーにかけながら、氷上に刺してある遠沈管に細胞を回収する。
11. 4℃ 1500 rpm×10 min で遠心を行う。
12. 細胞を計数し、ディッシュに播種する。(計数中も細胞は氷上で冷やしておくこと)

☞細胞数 : 2.0×10^6 /12 well、 7.0×10^5 /24 well 培地 : 8% FBS/RPMI 1640
13. 30 min 後、PBS で 2 回洗浄し、接着していない細胞を除去することで腹腔マクロファージを得る。

(Fig. 1) 4% TGCの腹腔内注射



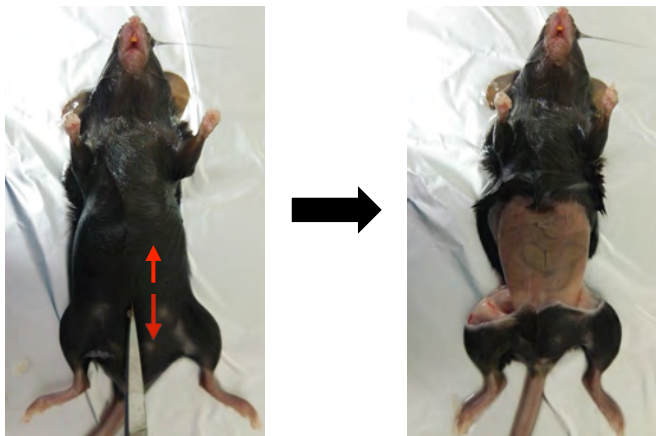
- ① ケージの網に乗せる。
- ② 右手でマウスの尻尾を掴み、自分の手前側にマウスを軽く引っ張ると、マウスが逃げようとするために体が伸びる。
- ③ 左手の親指と人差し指でマウスの背中から首のあたりをつまみ、尻尾を左手の小指にかけることでマウスを保定する。
- ④ 腹部を70% エタノールでしっかり消毒する。
- ⑤ 頭を下にした状態で図の赤○あたりに浅く注射針を刺す。
- ⑥ 腹膜に平行な方向に針を5 mm程度刺す。
- ⑦ 針を腹膜に対して垂直に立て刺す。
- ⑧ TGCをゆっくり注入する。
- ⑨ 優しく針を引き抜く。

(Fig. 2) 頸椎脱臼法



- ① 片手でマウスの尻尾を持ち網に乗せる。
- ② マウスの尻尾を少し後ろに引っ張ることで、マウスが前足で網をつかんだ状態を作り出す。
- ③ 逆の手の親指と人差し指でマウスの背中を軽く押さえ、徐々に頭の方に指を滑らせていく。
- ④ マウスの耳の裏側(矢印)で頭を固定する。
- ⑤ 尻尾を斜め上45度の方向に引っ張り頸椎を外す。

(Fig. 3) 腹膜を露出させる



- ① 図のハサミの先端部あたりの毛をピンセットで軽くつまむ。
- ② 2 mm程度の小さな切れ込みを入れる
- ③ 指で赤矢印の方向に表皮を引っ張り右図位まで腹膜を露出させる。

(Fig. 4) PEC回収



針を入れる位置は脾臓の少し下 (ハサミの先端あたり)。冷えたPBS 10 mLを充填し、徐々にPBSを吐き出しながらゆっくり針を挿入する。PBSをゆっくり全量注入した後、臓器を傷つけないように針先に注意しながら注入したPBSをゆっくり回収する。