

# $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup> (マイクロスライドVI<sup>0.4</sup>) および $\mu$ -Slide 8 well (マイクロスライド8ウェル) を用いたマクロファージの培養

## 1 概要

以下のアプリケーションノートは、ibidi社の $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup>および $\mu$ -Slide 8 wellを用いたRAW-264.7 (マウスマクロファージ細胞株) の培養プロトコルについて示します。本プロトコルは、接着時間、細胞密度、細胞形態のデモンストレーションとして特別な細胞株に対して使用する一例となっておりますが、各実験条件に合わせて改変して使用することが可能です。

## 2 材料

本プロトコルでは、以下の材料を使用します。

- RAW-264.7 (マウスマクロファージ)
- 培地 : RPMI 1640 (2 mM Lグルタミンおよび10% FBS含有)
- $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup> (ibiTreat)
- $\mu$ -Slide 8 well (ibiTreat)
- アクチャーゼ (PAA Laboratories GmbH)
- リン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) 1本

## 3 細胞培養および材料の調製

細胞を $\mu$ -Slideに播種する前に、通常のプロトコルに従って培養してください。

$\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup> : スライドと培地をインキュベータ内で37°C、5% CO<sub>2</sub>にて一晩かけて平衡化させます。この平衡化は、時間の経過とともに気泡が発生するのを防止するために不可欠です。このため、適量の培地を50mL容器に満たし、キャップをゆるく締めておきます。 $\mu$ -Slide 8 wellのようなオープン式では、気泡は大気中に出て行きます。

$\mu$ -Slideを取り出して、 $\mu$ -Slide専用ラックに入れ、細胞懸濁液を調製しながらルアーアダプターとウェルにそれぞれキャップをします。

## 4 細胞の播種

細胞の剥離：培養フラスコの培地を吸引し、細胞をPBSで1回洗浄します。アキュターゼ3～5mLを添加し、インキュベータ内にフラスコを入れて細胞を素速く剥離させます。RAW-264.7細胞株の場合、剥離には約8分かかります。アキュターゼを使用すると、剥離した細胞の生存率が非常に高くなります。

### 4.1 μ-Slide VIへの細胞播種

μ-Slide VI<sup>0.4</sup>の推奨細胞濃度：

最終細胞数を $0.3 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>にするために、濃度を $6 \times 10^5$ 個/mLに調製します。ピペットの先端をチャンネルの入口に直接置いて、細胞懸濁液30μLをすべてのチャンネルに注入します。懸濁液がチャンネルの中を流れやすくするために、スライドを少し傾けることもできます。

スライドにフタをして、37℃、5% CO<sub>2</sub>で30分間培養して細胞を接着させます。リザーバーに新鮮培地60μLを注入します。ピペットの先端を直接チャンネルの入口に向けないようにしてください。スライドをインキュベータに戻します。

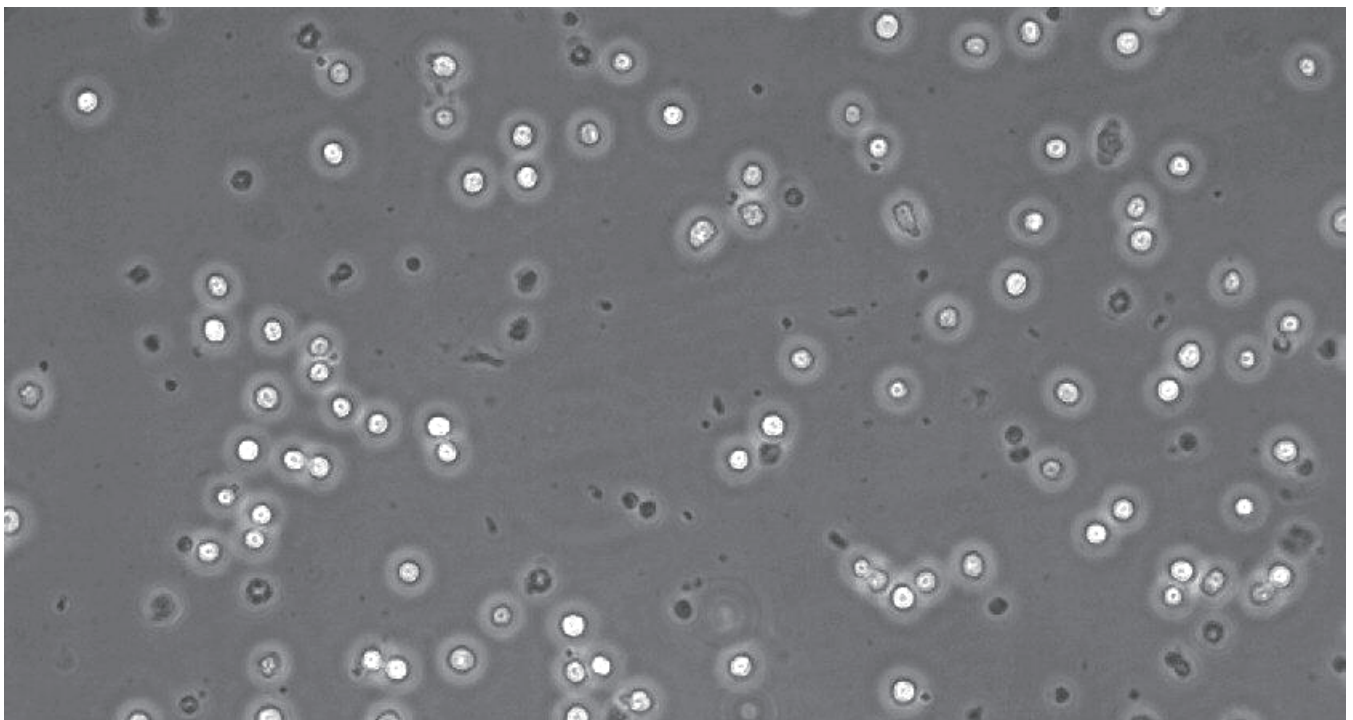
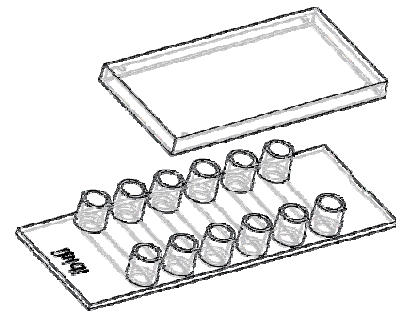


図1：播種後1時間のμ-Slide VI<sup>0.4</sup> (ibiTreat) 内のRAW-264.7

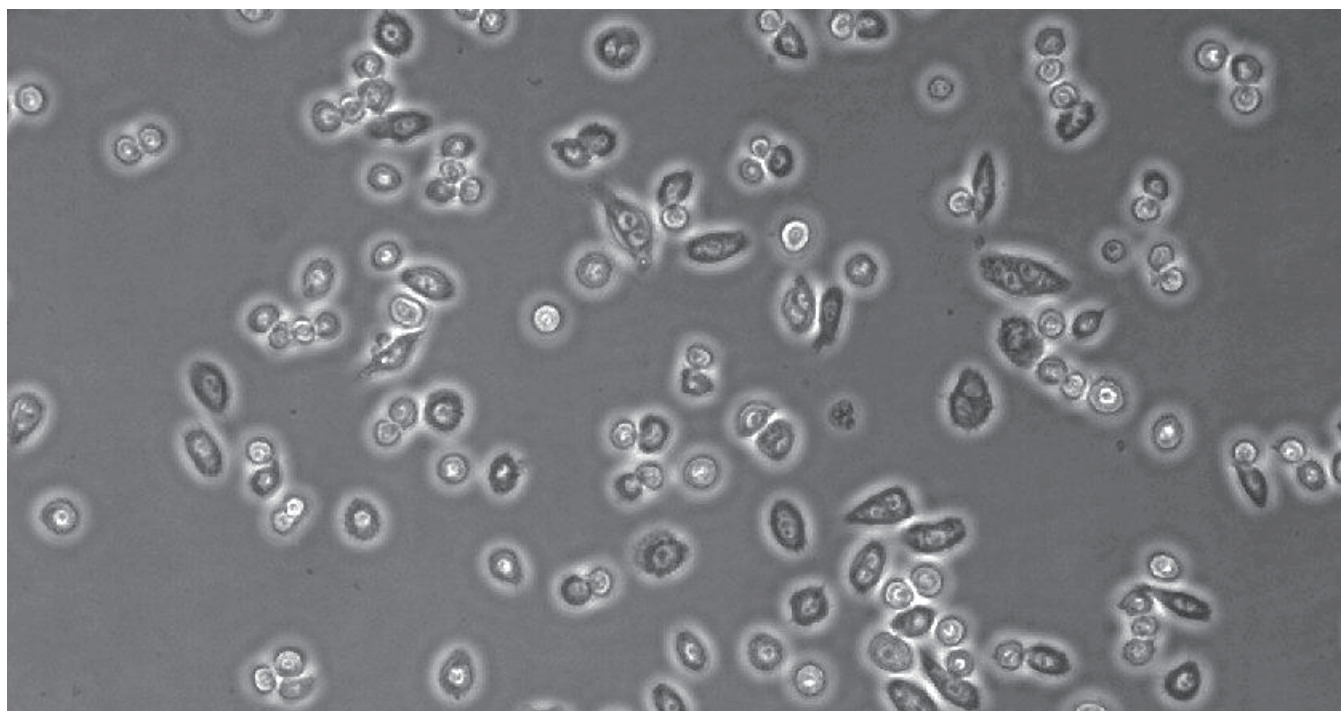


図 2 : 24 時間培養後の μ-Slide VI<sup>0.4</sup> (ibiTreat) 内の RAW-264.7

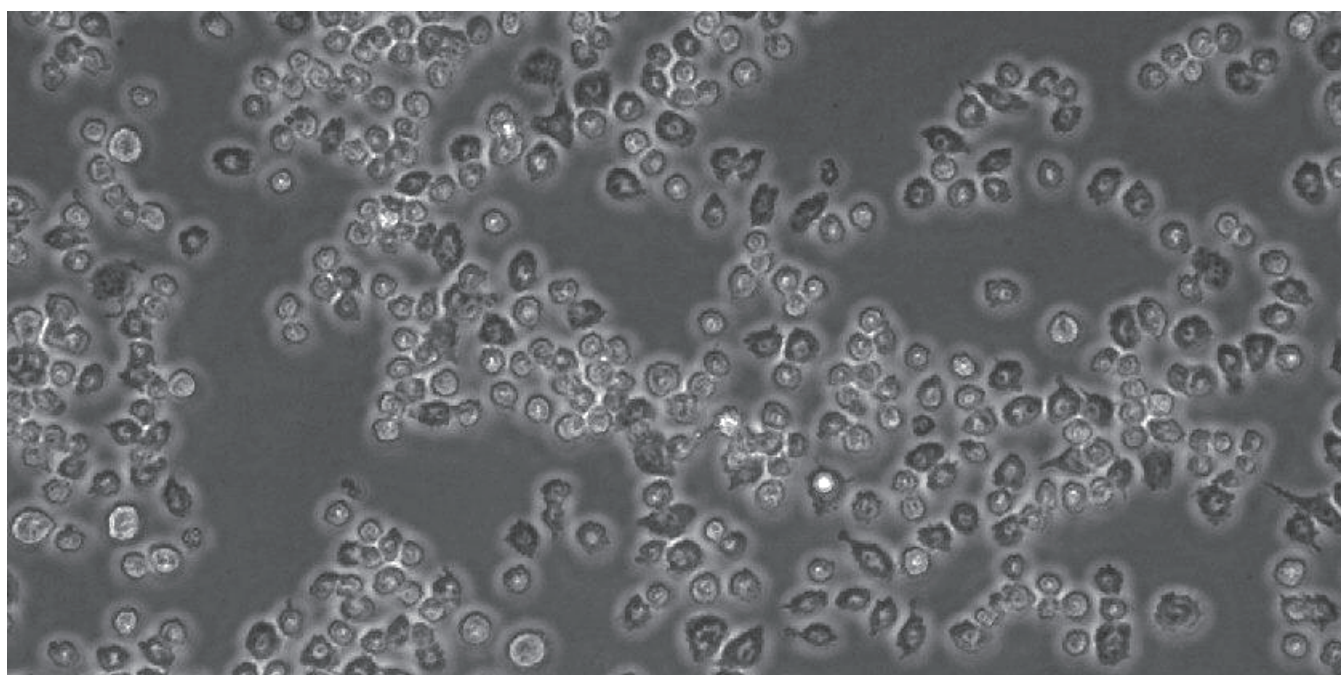


図 3 : 4 日間培養後の μ-Slide VI<sup>0.4</sup> (ibiTreat) 内の RAW-264.7

μ-Slide VI<sup>0.4</sup>を用いた細胞培養に関する詳細は、製品の取扱説明およびアプリケーションノート3 (マイクロチャンネル内での細胞増殖) も参照してください。



## 4.2 μ-Slide 8 wellへの細胞播種

μ-Slide 8 wellの推奨細胞濃度：

最終細胞数を $0.3 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>にするために、濃度を $1.1 \times 10^5$ 個/mLに調製します。細胞懸濁液300 μLをすべてのウェルに注入します。スライドにフタをして、37°C、5% CO<sub>2</sub>で培養します。その後新たな培地は不要です。

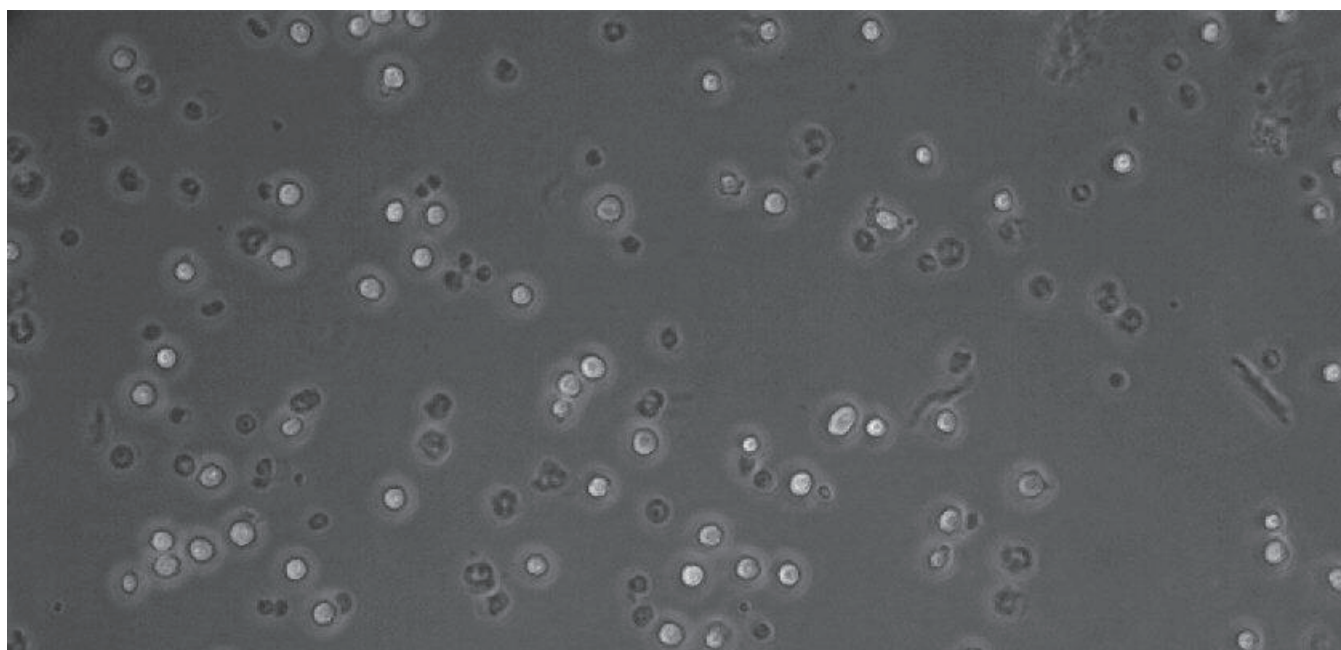
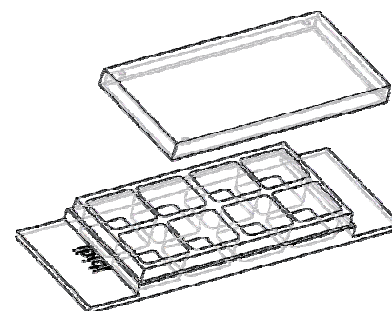


図 4：播種後 1 時間の μ-Slide 8 well (ibiTreat) 内の RAW-264.7

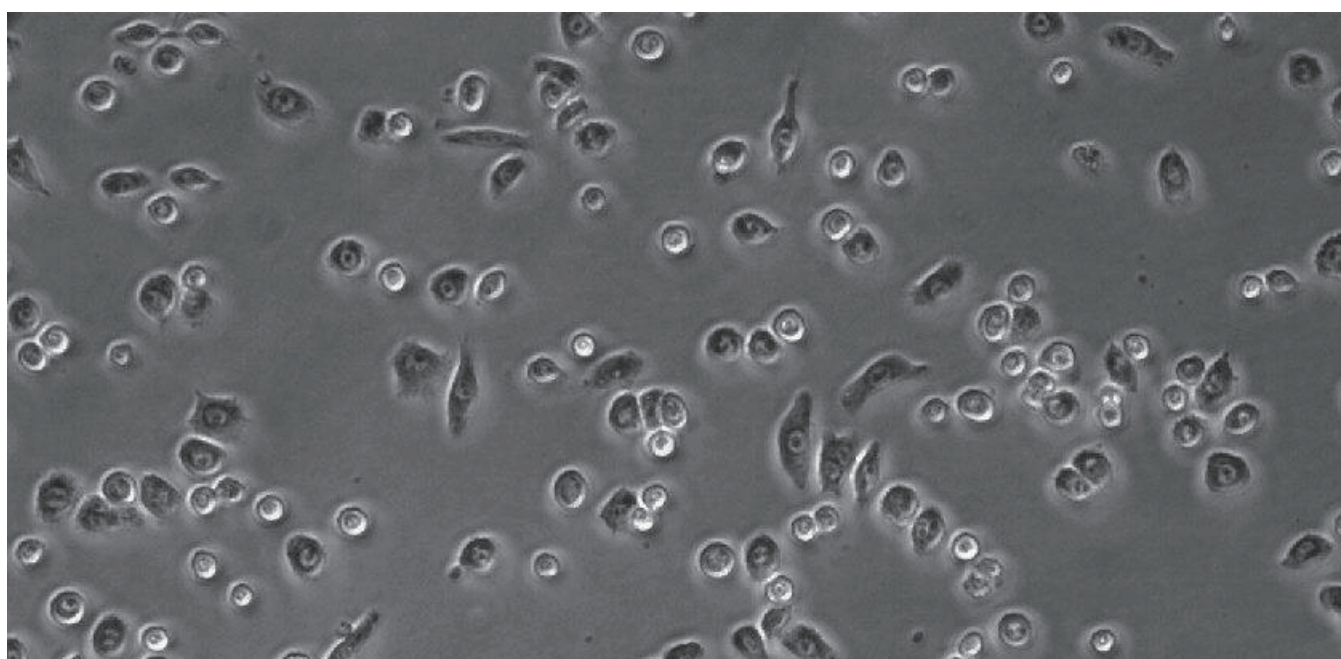


図 5：24 時間培養後の μ-Slide 8 well (ibiTreat) 内の RAW-264.7

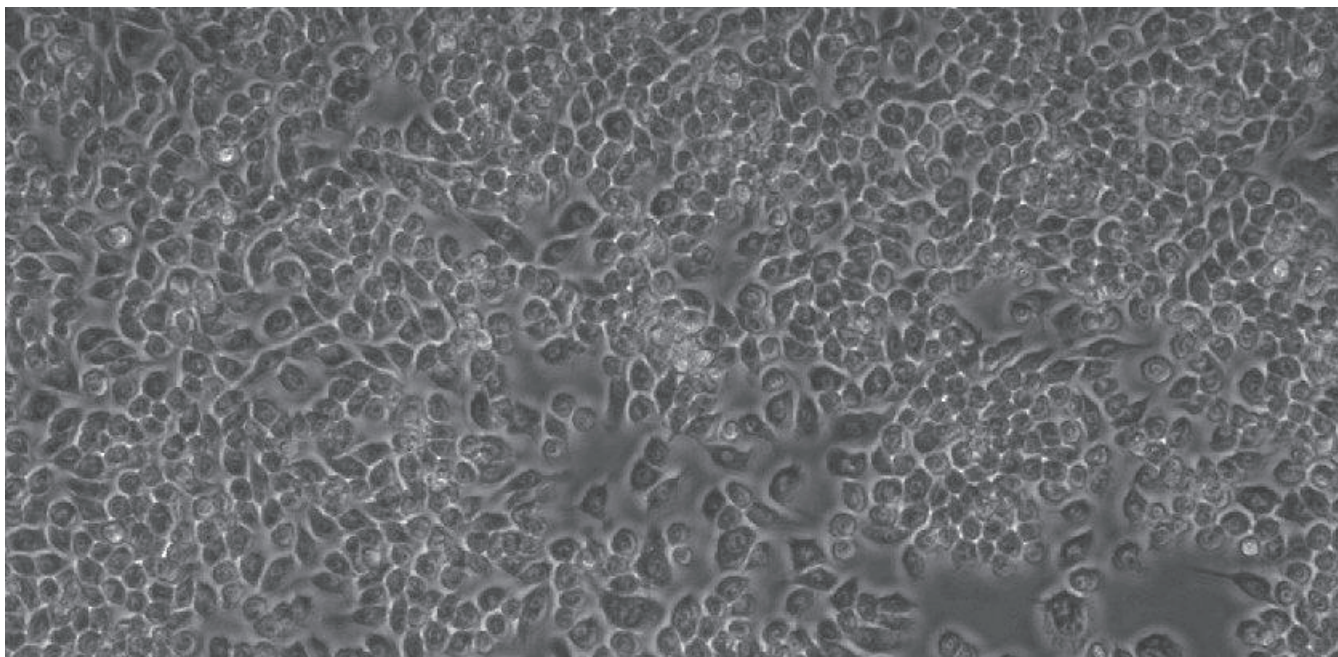


図 6 : 4 日間培養後の μ-Slide 8 well (ibiTreat) 内の RAW-264.7

μ-Slide 8 wellを用いた細胞培養に関する詳細は、製品の取扱説明も参照してください。細胞分布を均一にするために、μ-Slide VI<sup>0.4</sup>のようなチャンネルスライドを使用することを推奨します。μ-Slide 8 wellでは、細胞密度は、細胞を播種するときの取扱いによって、ウェルの表面全体のスポット間で異なります。

## 5 免疫蛍光染色

細胞を通常どおり同じ溶液で固定し、染色してください。チャンネルスライドを用いた免疫蛍光染色のプロトコルは、**アプリケーションノート2**に明記されています (μ-Slide Iを用いた免疫蛍光染色)。

注 : μ-Slide で染色中は液体の取扱いに注意してください。

**μ-Slide VI<sup>0.4</sup>** : 液体を交換する場合、チャンネル内部まで廃液せずに、最初に両リザーバー内の液体のみ吸引します。吸引装置で操作をしている場合、チャンネルの入口に直接吸引装置の先端を置かないように注意してください。チャンネルを新たな溶液 100 μL で 3 回洗い流してください。一方のリザーバーから新たな溶液を添加し、チャンネルを通してその溶液をもう一方のリザーバーに流し、両リザーバーが空になるまでもう一方のリザーバーから溶液を吸引します。**チャンネルが絶対に乾燥しないように注意してください。**

**μ-Slide 8 well** : μ-Slide 8 well では特別な注意は必要ありません。他のシャーレやウェルプレートを使用する場合と同様に液体を交換してください。



以下の物質を用いた細胞核およびアクチンフィラメントの染色の一例を以下に示します。

細胞核：DAPI (ジアミジノフェニルインドール-二塩酸塩)、SIGMA社、32670

アクチンフィラメント：ファロイジン、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate、LONZA社、PA-3010

- 1) 細胞を3.7% PFA/PBS (pH 7.4) で室温にて10分間固定します。
- 2) 細胞をPBSで3回洗浄します。
- 3) 細胞をTriton X 100 (0.1%) で5分間インキュベートします。
- 4) 細胞をPBSで3回洗浄します。
- 5) 細胞を1% BSA/ PBSで20分間インキュベートします。
- 6) 細胞をPBSで3回洗浄します。
- 7) 細胞を濃度0.2 μMのPhalloidin Alexa Fluor 488で20分間インキュベートします。
- 8) 細胞をPBSで3回洗浄します。
- 9) 細胞をDAPI (0.5 μg/mL) で10分間培養します。
- 10) 細胞をPBSで3回洗浄します。
- 11) チャンネルを完全に吸引し、ibidi Mounting Mediumを再注入します。これで、サンプルを顕微鏡で観察できる準備が整いました。サンプルは冷暗所で数週間保存できます。

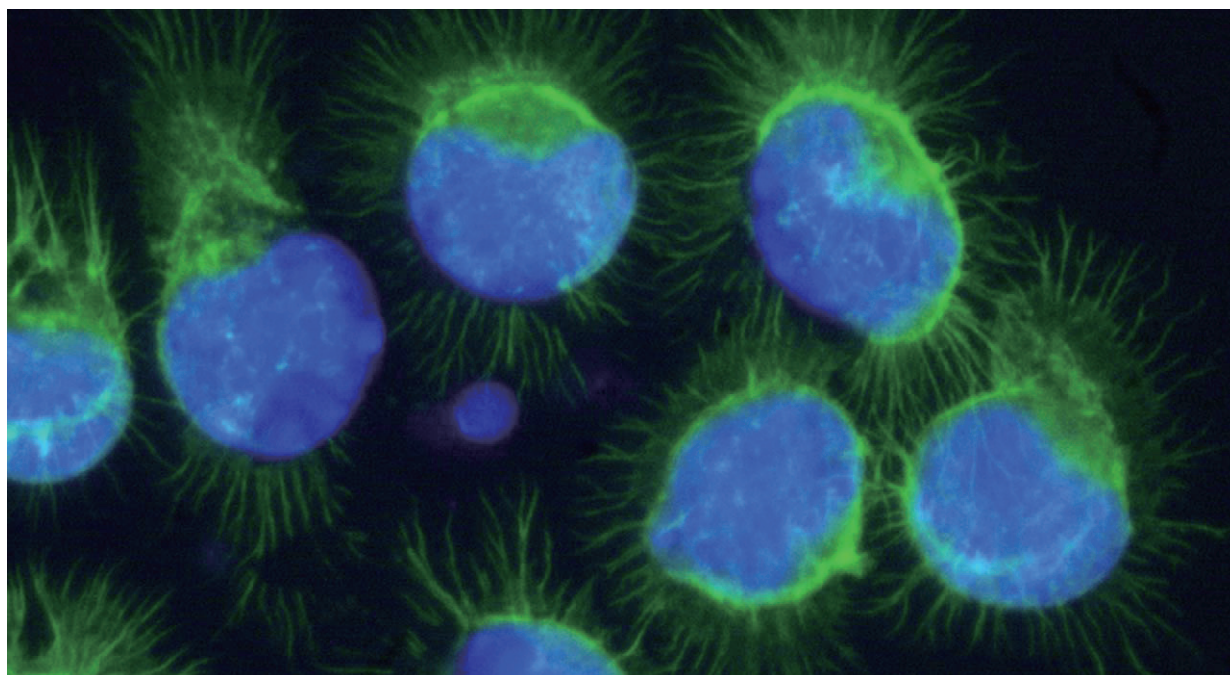


図7：DAPI (核、青) および Phalloidin Alexa Fluor 488 (アクチンフィラメント、緑) で染色した μ-Slide VI<sup>0.4</sup> 内の RAW-264.7