



マウス個体からの膵島単離

Author 石崎 玲、泉 哲郎
群馬大学生体調節研究所 遺伝生化学

Link <https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molend/>

Published 2011.10.17

Last Update 2011.10.17

Keywords insulin, islet

概要・原理

膵島は膵臓内に存在し1%ほどの容積を占める島状の組織である。膵島の9割はb細胞であり、これらはinsulinを分泌する。マウス個体から膵島を単離するには膵臓の大部分を占める膵外分泌細胞を除く必要がある。ここで紹介する方法は膵管からのcollagenaseの注入とそれに続くピペティングにより膵外分泌腺を崩し、その中から細胞塊を作っている膵島をピペットで一つずつ拾う方法である。この方法で単離した膵島はperifusion法によるインスリン分泌試験やtrypsin処理することによって単相培養に用いることができる。

装置・器具・試薬

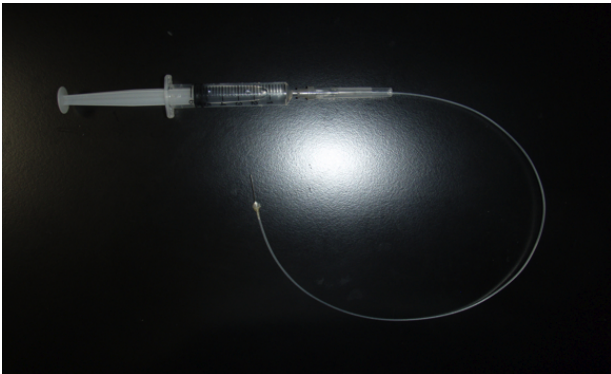
機器

37度水浴・実体顕微鏡・膵管アプローチ用シリンジ（図1）
pick up用すい口tube（図2）・解剖器具・pick up用シャーレ

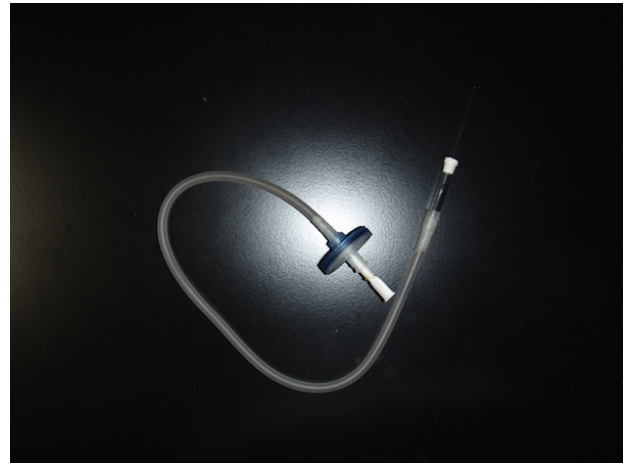
試薬

Hank's solution (SIGMA)
x50 collagenase solution
collagenase (SIGMA) 500,000unit
0.5g BSA; 20% glycerol /20ml Hank's solution
(6000unit分 250mlをHank's12mlに加えて500unit/mlで使用する。)
RPMI1640 (SIGMA)

詳細



【 fig. 1 】



【 fig. 2 】

1. 1xにしたcollagenaseを膵管アプローチ用のシリンジ（図1）に4ml入れ針の先まで液を満たす。50ml tubeにcollagenaseを1ml入れon ice。
2. マウスを頸椎脱臼させ、仰向けに台に固定する。大きく開腹し、腸を右にどけて膵管を露出させる。
3. 十二指腸に小さな切り込みを入れそこからcollagenase注入用の針を膵管にアプローチする。針を膵管に挿入できたら胆管のできるだけ上部をクレメンで止めてcollagenase液を注入する。
4. 膵臓が膨らんだ状態のまま5秒ほど針を保持してから針を抜く。直腸のあたりから膵臓を切り離していく。
5. 切りだした膵臓を1mlのcollagenaseの入った50ml tubeに移して37度で25分間（15 shake/min）振とう。
6. P1000tipの先端を直径3mmぐらいになるようにcutし切り口をライターであぶる。60回ほどpipettingを行い、膵臓をほぐす。
7. Hank's液を加えておよそ10mlとして、そのうち5mlをシャーレに移す。Pick upは二回に分けて行う。
8. 実体顕微鏡下でisletをpick upする。Pick upしたisletはRPMIを入れた6cm Dishに移す。
9. さらに二回新しいRPMIを入れたDishにisletを移し外分泌細胞を可能な限り除く。

工夫とコツ

3において膵臓が尾部まできれいに膨らまないとisletの収率が悪い。

膵管から注入するcollagenase液は室温になじませておく。それ以外の試薬類は常時氷上で冷やした状態で使用する。

膵管アプローチ用シリンジについて



先端の針は27Gのものをやすりでトリミングしたものを2本用意する。1本は根もとのプラスチックを壊して金属を露出させる。

2本の針をHPLC用のtubeで接続しボンドで止めて作成。

pick up用すい口tubeについて

ASPIRATING TUBE (VITREX)とPIPET HOLDER (VITREX)を接続して使用。コンタミ防止用に途中に0.2mm Disk filterをはさむ。

ガラス管は採血用のガラス管をバーナーで適当な太さに加工して使用。

参考文献