

How to Session

- Cardiomyocyte Culture in Experimental Study

Jang-Whan Bae MD, PhD.

Regional Cardiovascular Disease Center

Division of Cardiology, Department of Internal Medicine

Chungbuk National University Hospital

준비과정

준비과정

- 동물

- Neonatal rat
 - 1, 2 day-old SD or Wistar rat: n=20

- 기구

- Tissue scissors, forceps

- 준비 시약

- 70% alcohol
- Ads buffer 1 L (pH 7.35): 200 ~ 300 cc
 - 1 Liter Ads buffer
 - NaCl 6.8 gm (116 mM), 4.76 gm HEPES (20 mM), 0.12 gm NaH_2PO_4 (10 mM), 1.0 gm D-glucose (5.5 mM), 0.4 gm KCl (5 mM), 0.1 gm MgSO_4 (0.8 mM)
 - Enzyme solution: 50 cc
 - 50 mL Ads buffer + Type II collagenase 0.0243 gm (65 U/mL) + Pancreatin 0.03 gm (0.6 mg/mL)
 - Syringe filtering (0.2 μm), 4°C

준비과정

- 배양액
 - Plating media
 - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 340 mL
 - M199 85 mL
 - PS (Penicillin-Sterptomycin) 5 mL
 - FBS (Fetal Bovine Serum) 25 mL
 - HS (Horse serum) 50 mL
 - Maintenance media
 - DMEM 400 mL
 - M199 100 mL
 - PS 5 mL

준비과정



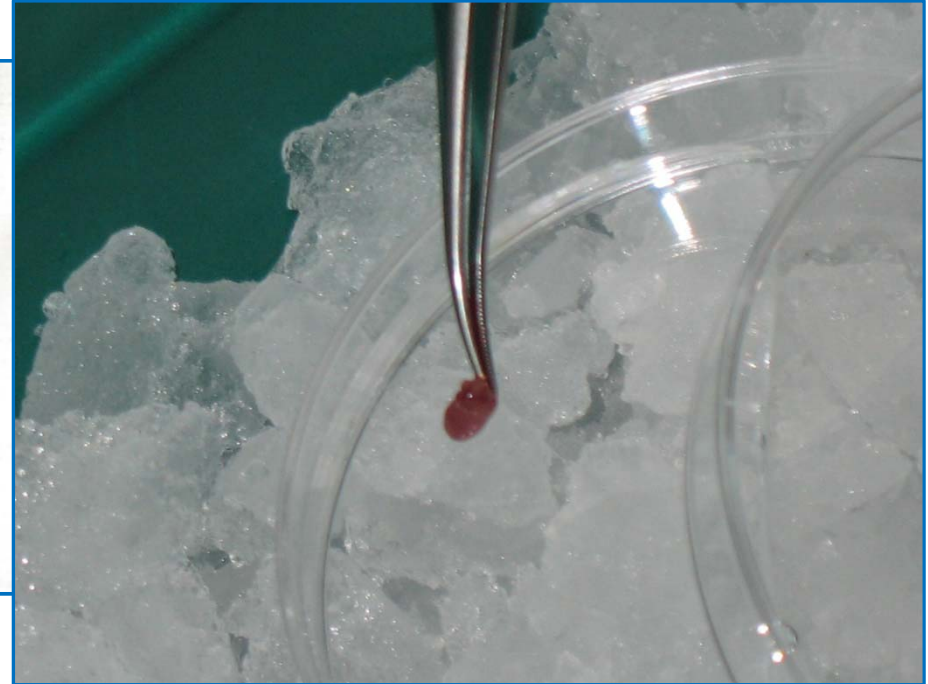
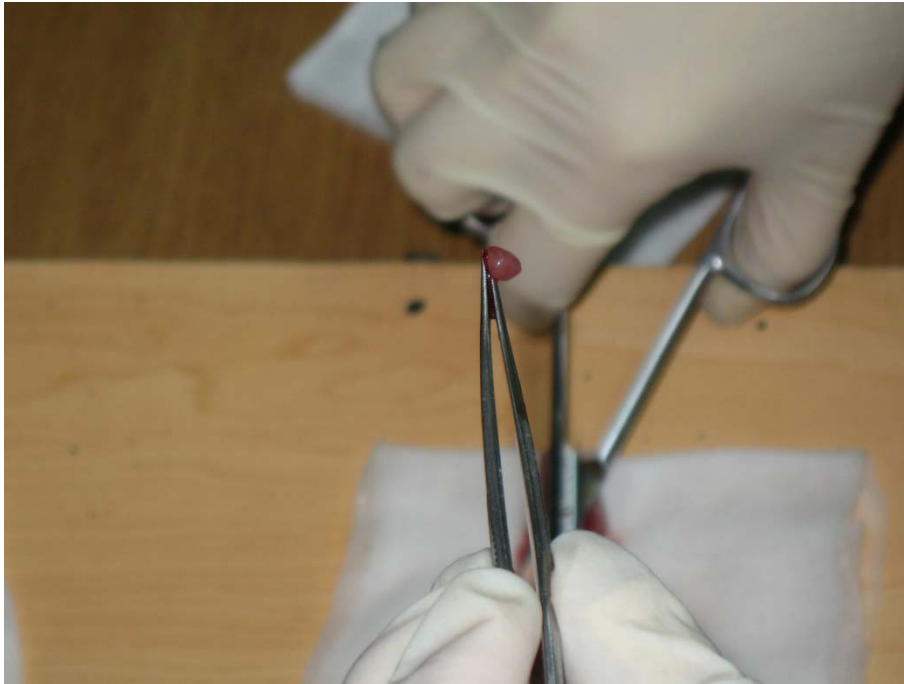
Neonatal rat CMC obtaining

Instruments and reagents

- **순서**

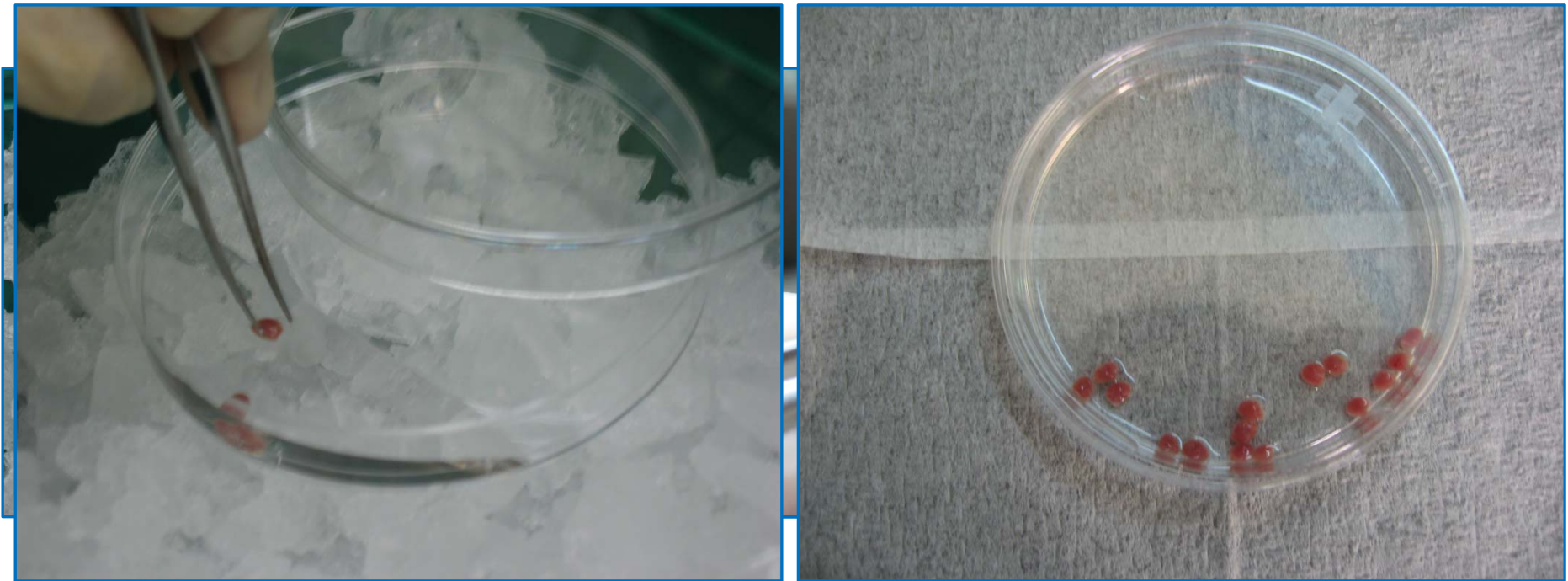
- Ads buffer를 5 mL 정도 담아 plate에 담아 얼음위에 올려둔다.
- 70% 알코올을 100 cc beaker 두 개에 담아 조직 절제용 기구들을 소독하고 모든 기구는 멸균 상태에서 사용한다.

Obtaining rat hearts



심실 준비와 세척

- 모아진 심장은 Ads buffer로 흡입, 세척하고 심실부위만 남기도록 심방을 도려낸 후 Ads buffer로 2회 이상 흡인, 세척한다.



심실 조직 잘게 다지기 (mincing)

- 모아진 심실 조직을 조직 가위를 이용하여 plate에서 잘게 다진다. 이 단계는 세포의 수확률 결정에 관계되는 중요한 단계이다



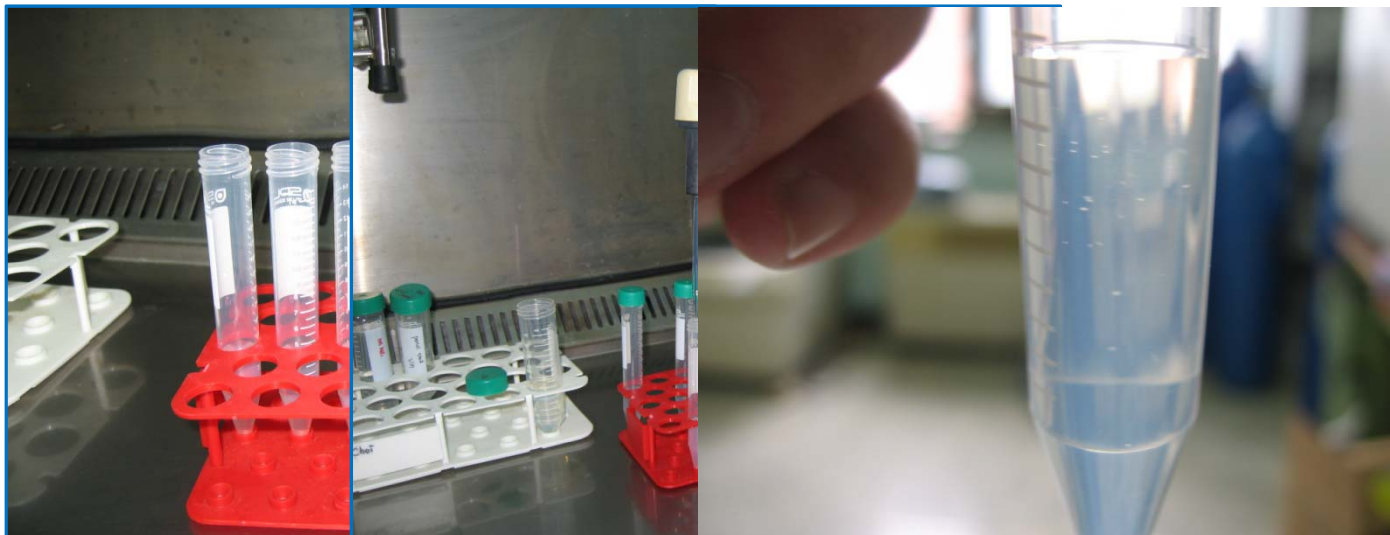
다진 심실 조직의 처리

- 배양접시에 20% FBS를 7cc 담아 CO₂ incubator에 넣어둔다.
- 미리 준비해 둔 Enzyme solution 7cc를 50 mL conical tube에 담고 다진 심실 조직을 conical tube에 옮겨 담아 37°C, 60 rpm, 10분간 shaking incubation을 하고 상층액은 버린다.
- 이후 다시 Enzyme solution 7cc을 채우고 같은 조건으로 30분간 2회, 20분간 2회 총 4회의 shaking incubation을 한 후 각 단계마다 얻어진 상층액을 미리 준비해둔 배양접시의 FBS에 모은다.



Percoll stock의 준비

- 마지막 20분간 2회의 shaking incubation을 하는 동안 Percoll stock을 준비한다. Percoll stock은 22.5 mL의 Percoll에 2.5 mL의 기준 농도 10배의 Ads buffer를 추가하여 총 25 mL로 만들고 4°C에 보관한다.
- Top solution은 9 mL Percoll + 11 mL Ads buffer, Bottom solution은 13 mL Percoll + 7 mL Ads buffer의 방식으로 만든다.
- 15 mL conical tube 다섯개에 Top solution을 4 mL 씩 분주하고 Pasteur pipet으로 Bottom solution을 3 mL 씩 천천히 추가하여 총 7 mL의 Percoll이 담긴 다섯 tube를 준비한다.

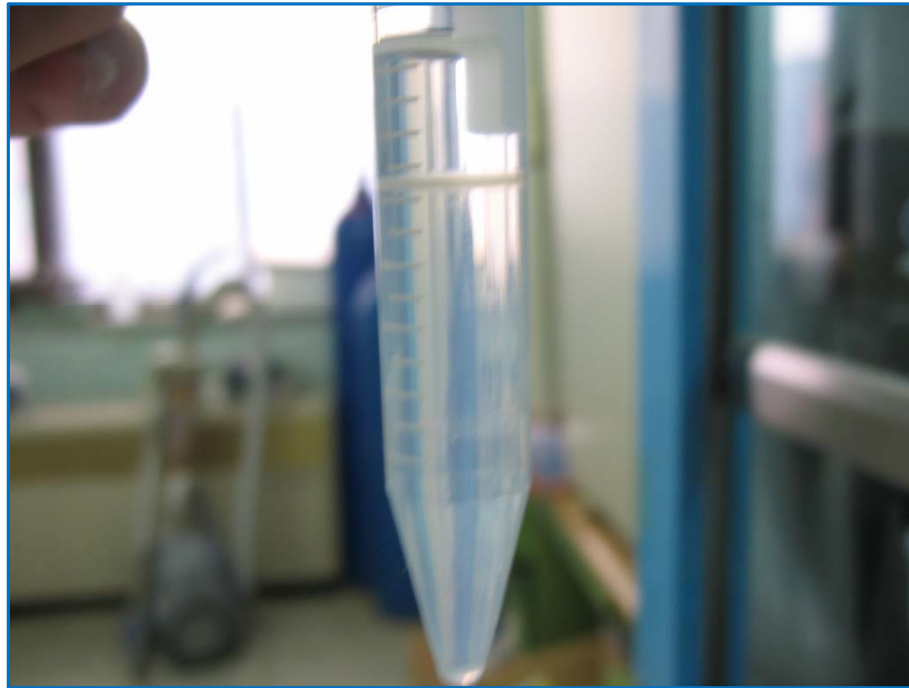


심근세포의 원심분리

- Shaking incubation이 끝나면 얻어진 세포액을 모아 15 mL conical tube 2~3개에 모으고 실온에서 5분간, 1200 rpm으로 원심분리를 한다.
- 원심분리를 한 후 Ads buffer 1mL로 resuspension을 하고 하나의 tube에 모아 총 10 mL이 되도록 Ads buffer를 추가한다.
- 10 mL의 세포액을 2 mL씩 미리 준비한 Percoll gradient tube에 벽을 타고 흘러내리도록 하고 이후 28°C, 3000 rpm으로 30분간 원심분리를 시행한다.
- 두 개의 세포층이 나타나는데 윗 층은 비심근세포, 아래층은 심근세포가 모여있다. 1 mL pipet으로 심근세포층만 골라내서 50 mL tube에 모아둔다.

심근세포의 분리

- Percoll gradient를 이용한 심근세포의 분리



심근세포 배양준비

- 50 mL tube에 모아진 심근세포에 Plating media와 Ads buffer를 1:1의 비율로 채우고 가볍게 상, 하로 전도시킨 후 실온에서 1200 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 상층액은 제거하고 pellet을 plating media 1 mL로 resuspension한다.
- 배양접시에 9 mL의 Plating media를 담고 위의 1 mL의 세포액을 첨가하여 100 mm 배양접시에 담아 37°C, 5% CO₂ incubator에서 90분간 incubation한다.



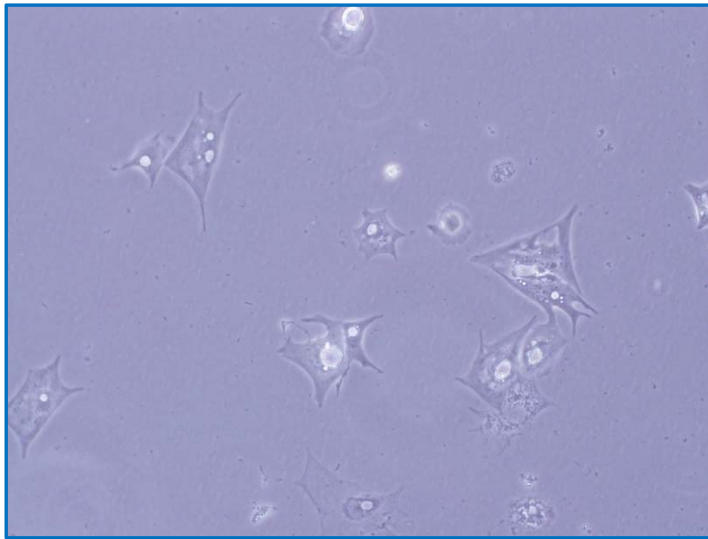
심근세포 개수 계산

- Incubation한 세포를 꺼내어 가볍게 교반하고 15 mL tube에 모은 후 실온, 1200 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 상층액은 버리고 Plating media 1 mL로 resuspension을 한다.
- Resuspension을 한 세포액 10 μ L에 Plating media 990 μ L를 첨가하여 세포 개수를 세고 배양접시에 1% gelatin을 코팅하여 Plating media 에서 배양을 시작한다.
 - 세포 밀도는 1×10^6 /mL이 되도록 한다.
 - Plating media는 60 mm 접시에 2 mL, 100 mm 접시에 7 mL, 150 mm 접시에 15~16 mL를 담는다.
 - 60 mm 접시에 5×10^5 세포를 분주하고 6 well plate에는 각 well 당 3×10^5 세포를 분주한다.

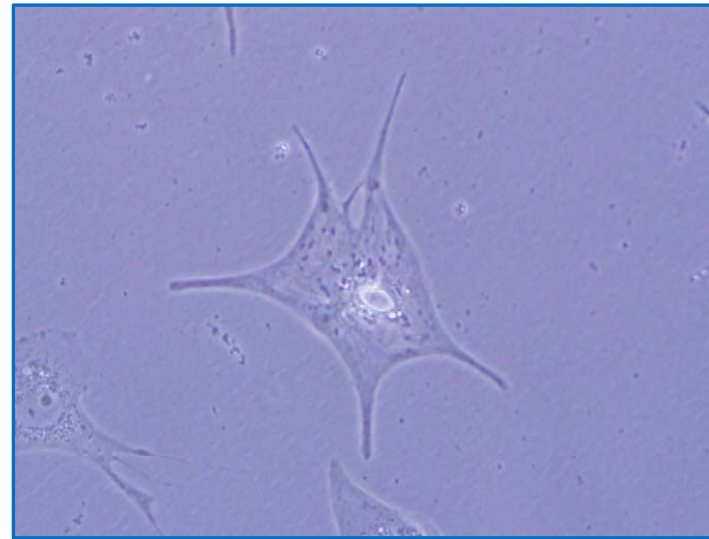


심근세포의 유지배양

- 16~24시간 후에는 Plating media를 제거하고 8 mL의 maintenance media로 세척을 한 후 Plating media를 교체한다. 이후 Plate media는 48시간 마다 교체한다. 배양기의 환경은 5% CO₂, 습도 90%, 온도 37°C이다.
- 세포의 모양과 박동성의 관찰을 위하여 현미경으로 72시간 정도에 세포를 관찰한다. 최소 90% 이상의 심근세포 순도를 유지하는 것이 다음 연구의 기본이 된다. 대개 10일 정도 박동성 심근세포가 관찰된다.



X 200



X 400

심근세포의 박동성

- 72시간 후 박동성과 세포의 모양을 검경한다.



주의사항

- **심근세포는 열과 압력에 민감하다.**
 - Mincing을 할 때는 꼭 항상 얼음위에서 진행한다.
 - 원심분리의 속도는 1200 rpm을 넘어서는 안 된다.

결론

- **심근세포의 획득과 배양**

- 심근세포 생리나 심근세포의 허혈성, 심부전 연구의 기본이 된다.
- 다양한 방법의 심근세포 획득과 배양법이 있다.
- 연구실의 연구 방향과 특성에 맞는 방법의 수립이 중요하고 반복적인 획득, 배양과정에서 얻어진 노하우로 프로토콜을 확립하고 수정해 나가는 과정이 필요하다.